



Universidad de Concepción
Facultad Farmacia

PROYECTO FONDECYT:

EFFECTO DE LA VITAMINA C EN MODELO DE HIPOXIA

***IN VITRO* CON CÉLULAS ENDOTELIALES**

MICROVASCULARES DE CEREBRO HUMANO Y EN

MODELO DE ACCIDENTE CEREBROVASCULAR

***ISQUEMICO IN VIVO* CON RATONES GULO**

KNOCKOUT.

POR SOLANGE PILAR ARRIAGADA CANCINO

Tesis presentada a la Facultad de Farmacia de la Universidad de Concepción
para optar al título profesional de Bioquímica

Profesor Guía

Coralía Isabel Rivas Rocco
Universidad de Concepción

Profesor Patrocinante

Coralía Isabel Rivas Rocco
Universidad de Concepción

Profesor co-Guía

Eveling Grace Inostroza Pérez
Universidad de Concepción

Marzo, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2022, Solange Pilar Arriagada Cancino

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos a los docentes que fueron parte de mi formación como Bioquímica. A mis amigos por todo el apoyo emocional que me brindaron durante estos años de estudio. A mi perro Glotín por acompañarme en innumerables noches de estudio.

Finalmente, un especial agradecimiento a la Dra. Coralia Rivas y a la Dra. Eveling Inostroza, por brindarme sus conocimientos y motivarme a seguir en el camino de la investigación que es lo que realmente me apasiona.

Muchas Gracias.

Para Glotin.

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	V
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	VIII
RESUMEN.....	IX
1. FORMULACIÓN DE PROYECTO.....	1
1.1. ACIDENTE CEREBROVASCULAR	1
1.2. ISQUEMIA CEREBRAL	2
1.3. CÉLULAS ENDOTELIALES.....	3
1.4. MUERTE CELULAR DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN ACV.....	5
1.4.1. Apoptosis de Células Endoteliales.....	6
1.4.2. Necroptosis de Células Endoteliales	7
1.5. HIPOXIA	9
1.6. ESTRÉS OXIDATIVO POR HIPOXIA	11
1.7. ANTIOXIDANTES	12
1.8. VITAMINA C	13
1.9. TRANSPORTADORES DE ACIDO ASCÓRBICO SVCTs	15
2. PROPUESTA DE INVESTIGACION	18
3. HIPOTESIS.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	21
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	21
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	22
6.1. Objetivo 1: Estandarización de modelo de hipoxia <i>in vitro</i> con línea celular HBMEC.	22
6.1.1. Cultivo Celular.	22
6.1.2. Cámara de Hipoxia.....	22

6.1.3.	Dosis Letal 50% (LD50).....	23
6.1.4.	Viabilidad.....	23
6.2.	Objetivo 2: Evaluar niveles de ROS, expresión de proteínas alteradas y tipo de muerte celular (apoptosis y Necroptosis) en HBMEC sometidas a hipoxia (1%O ₂).....	25
6.2.1.	Evaluación Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).	25
6.2.2.	Evaluación de Expresión de proteínas.....	25
6.2.2.1.	Western Blot.....	25
6.2.2.2.	Inmunofluorescencia.	26
6.2.2.3.	Evaluación de la expresión relativa de ARN mensajero (ARNm) por RT-qPCR.....	27
6.2.3.	Evaluación de Muerte Celular.....	28
6.3.	Objetivo 3: Determinar efecto de Vitamina C sobre viabilidad, aumento de ROS, expresión de proteínas y muerte celular inducida por hipoxia al 1%O ₂ en HBMEC.	29
6.3.1.	Administración de Vitamina C <i>in vitro</i>	29
6.3.2.	Evaluación de efecto Vitamina C <i>in vitro</i>	29
6.4.	Objetivo 4: Evaluar efecto de Vitamina C en modelo de ACV con ratones i-gulono-c-lactone oxidase (Gulo) knockout.....	30
6.4.1.	Modelo Animal de ACV.....	30
6.4.2.	Administración y Evaluación del Efecto de Vitamina C <i>in vivo</i>	31
7.	PLAN DE TRABAJO	32
8.	ANEXO	33
8.1.	Antecedentes del equipo de trabajo para ejecutar la propuesta	33
9.	JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:	37
9.1.	Personal Técnico:	37
9.2.	Personal de Apoyo:.....	37
9.3.	Becas para tesistas/ memorista	37
9.4.	Viajes al extranjero	38

9.5. Viajes nacionales	38
9.6. Gastos de operación general:	39
9.7. Equipamiento	41
9.8. Infraestructura y mobiliario	41
10. RECURSOS DISPONIBLES:	42
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

INDICE DE ILUSTRACIONES

8.1.1.	Figura 1: Diferenciación HBMEC.	33
8.1.2.	Figura 2: Captación de AA por HBMEC.....	34
8.1.3.	Figura 3: Niveles relativos de ARN de SVCT1 y SVCT2 en células HBMEC diferenciadas.....	35
8.1.4.	Figura 4: Inmunofluorescencia de SVCT1 y SVCT2 en células HBMEC diferenciadas.....	36

RESUMEN

Los Accidentes cerebrovasculares (ACV) afectan a 15 millones de personas al año a nivel mundial, donde un tercio de estas fallece y el otro tercio queda con secuelas permanentes. En Chile es la principal causa de muerte y el 60% de los casos son de tipo isquémico, se producen debido a la oclusión de una arteria cerebral que impide el flujo normal de la sangre generando una reducción de la concentración de nutrientes y oxígeno. Esta disminución de oxígeno desencadena diferentes mecanismos a nivel celular los cuales dan como consecuencia un desbalance redox con un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando altos niveles de estrés oxidativo que provocan daño y muerte celular a nivel cerebral. Dentro de las células que se ven afectadas por el ACV se encuentran las células endoteliales, las cuales son parte de la unidad neurovascular de la barrera hematoencefálica (BHE) y son las encargadas de formar el endotelio vascular y regular el paso de sustancias entre la sangre y el cerebro, por lo que la muerte de las células endoteliales vasculares cerebrales facilita la destrucción de la integridad y función de la BHE.

Como en el ACV la muerte celular es desencadenada por el aumento del ambiente oxidante se infiere que regular el aumento de estrés oxidativo puede podría ser un posible blanco terapéutico. Para combatir el daño oxidativo existen

los antioxidantes como la vitamina C, la cual no es producida endógenamente por los humanos, esta presenta su forma reducida como ácido ascórbico (AA) y en su forma oxidada como ácido dehidroascorbico (DHA). El AA es un potente reductor capaz de neutralizar radicales libres y presenta transportadores en diferentes órganos llamados SVCTs. Hay evidencia científica de que los transportadores SVCT2 aumentan su expresión en procesos isquémicos en células de endotelio cerebral de ratón, por lo cual en el presente estudio nos planteamos como objetivo determinar la capacidad de la vitamina C para revertir el daño y muerte celular causado por hipoxia en células de endotelio microvascular de cerebro humano. Para esto se estandarizará un modelo de hipoxia *in vitro* que consiste en un cultivo de células de endotelio microvascular humano que al diferenciarlas son capaces de expresar uniones estrechas características de una barrera hematoencefálica, se determinara cuanto es capaz la vitamina C de disminuir el daño oxidativo producido por hipoxia. Evaluaremos la viabilidad celular por el método de exclusión de tinción azul de tripán, MTT y citometría de flujo, determinando niveles de ROS por citometría de flujo, evaluando la expresión de proteínas alteradas por la hipoxia y los transportadores SVCTs mediante Western Blot, RT-PCR e inmunofluorescencia. También estudiaremos un modelo *in vivo* de ratón GULO knockout con oclusión de la arteria media (OAM), administraremos la vitamina C intravenosa e intranasal y determinaremos si la vitamina C es capaz revertir el daño inducido por la OCM. Para ello evaluaremos la integridad de la BHE (analizando la

expresión de proteínas formadoras de las uniones ocluyentes como ocludina y claudina), la presencia de los transportadores de vitamina C, SVCT1 y SVCT2 tanto en las células endoteliales como en los otros componentes celulares del parénquima cerebral (astrocitos y neuronas).

Estos resultados permitirán dilucidar la importancia del rol de la vitamina C y sus transportadores de ácido ascórbico (SVCTs) en las células endoteliales microvasculares de cerebro humano bajo un estado de hipoxia tanto en un contexto de modelo *in vitro* como *in vivo* asemejando un ACV. En caso de que la vitamina C revierta el daño y la muerte celular inducida por hipoxia estaríamos en presencia de un posible blanco terapéutico para el tratamiento de daño cerebral provocado por altos niveles de estrés oxidativo en un ACV.

1. FORMULACIÓN DE PROYECTO

1.1. ACIDENTE CEREBROVASCULAR

Los accidentes cerebro vasculares (ACV) afectan a 15 millones de personas en el mundo anualmente. De estos un tercio fallece y otro tercio queda con secuelas permanentes según reportes de la organización mundial de salud (OMS). En Chile el ACV es la principal causa de muerte con 24.964 casos nuevos al año, lo que significa 69 casos por día y se calcula que de estos casos fallece una persona por hora. Además, es la segunda causa de mortalidad prematura en Chile, con 2.310 defunciones en el 2013 en personas entre 30 y 69 años, y la primera causa específica de años de vida saludables perdidos por discapacidad y muerte prematura en mayores de 74 años. Por todo lo anterior, el ACV se constituye como un problema crítico de Salud Pública (MINSAL, 2014).

Los ACV se generan cuando el flujo de sangre de una zona del cerebro se detiene, ocasionando la disminución de nutrientes y oxígeno en la región afectada. Dependiendo del tiempo que se mantenga esta afección se puede generar un daño permanente en las células cerebrales que ocasionaran las secuelas y la muerte de pacientes.

Los ACV se clasifican en dos tipos, hemorrágicos e isquémicos, los primeros son menos frecuentes donde se rompe un vaso sanguíneo del cerebro originando un derrame (derrame cerebral), mientras que el segundo representa el 65% de los

ACV que ocurren en Chile (MINSAL, 2013), los cuales generalmente ocurren por la oclusión de la arteria cerebral media (Rahme et al., 2012) en la cual un ateroma o un trombo obstaculiza el paso de la sangre generando una inmediata reducción del flujo cerebral en el área de irrigación correspondiente (isquemia focal). Esta reducción del flujo sanguíneo no es homogénea en el sector afectado (Arango-Davila et al., 2004), y puede cambiar en minutos u horas generando un estado de hipoxia en las células cerebrales de la zona afectada. El impacto de la isquemia cerebral depende de la gravedad y la duración de la reducción del flujo sanguíneo. Por consiguiente, una isquemia poco grave pero prolongada produce cambios equivalentes a una isquemia corta y grave (Mies et al., 1991).

1.2. ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia generada por el ACV ocasiona en el cerebro una desregulación y activación de distintos mecanismos en respuesta al daño generado. Es así como el tejido cerebral isquémico sigue una serie de eventos secundarios que incluyen alteraciones vasculares, celulares y moleculares. La respuesta vascular a la isquemia activa las células endoteliales y regula al alza los leucocitos circulantes (Huang et al., 2006) y las moléculas de adhesión, incluidas las selectinas E- (superficie endotelial), P- (superficie plaquetaria), L- (superficie leucocitaria), ICAM-1 e integrinas. Los leucocitos pueden viajar a través de las células endoteliales hasta el cerebro al interactuar a través de estas moléculas de adhesión y secretar citoquinas pro inflamatorias en el cerebro. Por lo tanto, la

respuesta inflamatoria aguda después de un accidente cerebrovascular conduce a interacciones entre plaquetas, leucocitos, linfocitos y células endoteliales que son responsables de la lesión de la barrera hematoencefálica (BHE) y la infiltración de células inmunitarias en el parénquima cerebral (R. Zhang et al., 1998). La BHE lesionada puede favorecer aún más la fuga hacia el cerebro, causando edema y empeorando la lesión tisular. Esta cascada de activación proinflamatoria que busca recuperar la zona afectada termina siendo dañina y altera el equilibrio del microambiente celular que conduce a la activación de vías deletéreas que incluyen diferentes mecanismos de muerte celular. Por lo tanto, la respuesta inflamatoria al sitio lesionado no siempre es beneficiosa. Por el contrario, puede tener un efecto catalítico sobre la lesión post isquémica en curso. Más importante, la inflamación en el cerebro inicia la liberación de citoquinas y radicales libres que generan aún más daño celular.

1.3. CÉLULAS ENDOTELIALES

Todo el daño que se ocasiona por el ACV en el cerebro repercute finalmente de forma negativa en la barrera hematoencefálica (BHE), la cual es una estructura celular y bioquímica compuesta por astrocitos, pericitos, microglías, membrana basal y células endoteliales las cuales en conjunto son denominados unidad neurovascular (NVU) (Serlin et al., 2015).

Las células endoteliales antes mencionadas que se encuentran en el cerebro cumplen el rol de formar el endotelio cerebrovascular, este es un tejido

extremadamente activo responsable de regular el tráfico de células, sustratos y otras moléculas a través de la barrera hematoencefálica, es responsable de controlar el tono vasomotor y mantener la homeostasis en la interfaz sangre-pared vascular. Las células endoteliales son células de epitelio plano simple que se pliegan sobre sí mismo formando los vasos y microvasos de la BHE (Aird, 2007a, 2007b). Las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMEC) que componen los microvasos de la BHE son capaces de regular el transporte paracelular a través de uniones estrechas (Wong et al., 2013), las cuales evitan el ingreso o salida de moléculas que puedan dañar de alguna manera el cerebro (Van Itallie & Anderson, 2006). Las uniones estrechas en la microvasculatura del cerebro evitan el transporte paracelular de la mayoría de las moléculas y restringen severamente el transporte de iones pequeños. El transporte transcelular es el responsable de la mayor parte del tráfico molecular entre el sistema vascular y el cerebro (Wong et al., 2013). Las uniones estrechas son un complejo que consta principalmente de proteínas transmembrana (occludina, E-cadherina y claudinas principalmente), proteínas accesorias citoplasmáticas (ZO-1/2/3, ZONAB, etc) y proteínas del citoesqueleto, que son indispensables para mantener la integridad de la BHE (C. Li et al., 2021).

En diversos estudios se ha asociado la alteración local de uniones estrechas con patologías del sistema nervioso central, la disfunción de las células endoteliales vasculares cerebrales es considerado una característica patológica de la destrucción de la BHE (Blanchette & Daneman, 2015). Esta disfunción del

endotelio encargado de las propiedades reguladoras puede jugar un rol importante en la fisiopatología de la isquemia o hipoxia cerebral (Wang et al., 2018). Además, son el lugar principal para la producción de especies reactivas de oxígeno (Fraser, 2011), median el estrés oxidativo y de esta forma contribuyen a la destrucción de la BHE (C. Li et al., 2021). Por lo anterior, las células endoteliales microvasculares son esenciales para proteger el cerebro y su correcto funcionamiento.

La protección de la NVU se considera un componente esencial de la terapia de un ACV y la evidencia reciente ha demostrado que tratar específicamente el endotelio cerebral no solo puede mejorar la disfunción endotelial sino también reducir la lesión parenquimatosa (Ridder et al., 2015; Shi et al., 2017; C. S. Yang et al., 2019) y de esta forma reducir el daño que esta patología ocasiona.

1.4. MUERTE CELULAR DE CÉLULAS ENDOTELIALES EN ACV

Como se mencionó anteriormente, la muerte de las células endoteliales microvasculares cerebrales facilita la destrucción de la integridad y función de la BHE. En los ACV la muerte de estas células es ocasionada principalmente por la disminución del flujo de nutrientes y oxígeno (isquemia e hipoxia), estrés oxidativo y disfunción endotelial propiamente tal, donde, si se logra más daño del que se restaura se puede iniciar el mecanismo de muerte celular (Sekerdag et al., 2018). Existen diferentes tipos de muerte celular tanto programados como no programados, siendo la más estudiada por décadas en este tipo de patologías la

apoptosis. Sin embargo, en estudios recientes se ha reportado que la lesión cerebral isquémica va seguida de la muerte celular necroptótica, lo que contribuiría a su patología (Ni et al., 2018; S. Zhang et al., 2017). Lo que vuelve interesante su estudio en este tipo de células endoteliales.

1.4.1. Apoptosis de Células Endoteliales

Una de las vías más reconocidas de muerte células por la cual mueren las células endoteliales microvasculares cerebrales después de un accidente cerebrovascular isquémico es la apoptosis (Galluzzi et al., 2017). La apoptosis consiste en una muerte programada que mantiene el balance fisiológico entre proliferación y eliminación celular (Carranza-Aguilar et al., 2020). Las células al detectar ligandos inductores de muerte, material genético, especies reactivas de oxígeno (ROS), mediadores inflamatorios, toxinas, fármacos u otras sustancias que indiquen daño, son capaces de activar mecanismos que tienen como finalidad llevarla a su propia destrucción. (Gordeziani et al., 2017)

Una vez que la célula entra en apoptosis induce la activación de caspasas, que son proteasas con un residuo de cisteína que fragmentan proteínas inmediatamente después de los residuos de aspartato. Las caspasas provocan el colapso de los componentes subcelulares, la condensación y fragmentación del ADN y la disminución del tamaño celular y nuclear. En este tipo de muerte, la integridad de la membrana plasmática se mantiene intacta hasta que comienza la formación de cuerpos apoptóticos, cuya función es contener el material celular

y evitar que éste actúe como desencadenante de la muerte de otras células. Una vez finalizada la apoptosis, otras células especializadas fagocitan los cuerpos apoptóticos. De esta forma la célula muere sin generar ningún efecto inflamatorio que pueda desencadenar mayores consecuencias. (Saraste & Pulkki, 2000; Y. Yang et al., 2015)

En el caso de un ACV isquémico donde se presenta un estado de hipoxia, este genera la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial (MPT) en la célula. La desregulación mitocondrial a su vez induce la liberación de proteínas proapoptóticas como el citocromo C y la proteína Smac/DIABLO que activan a la caspasa 9.(P. Li et al., 2017) Esto desencadena la activación de la caspasa 3, enzima que tiene como rol la fragmentación del ADN, la degradación de proteínas del citoesqueleto, la formación de cuerpos apoptóticos y la expresión de ligandos que inducen el reclutamiento de células fagocíticas (Elmore, 2007).

1.4.2. Necroptosis de Células Endoteliales.

En varios estudios de modelos animales han demostrado que la lesión cerebral isquémica va seguida de la muerte celular necroptótica, lo que contribuye a su patología (Ni et al., 2018; S. Zhang et al., 2017). La necroptosis es una forma de necrosis programada independiente de la caspasa la cual se caracteriza morfológicamente por inflamación de los organelos celulares y ruptura de la membrana celular mediada por vías de señales de muerte (Vandenabeele et al., 2010). Estos cambios morfológicos son similares a los que se presentan en la

necrosis, pero la necroptosis puede activarse por ligandos diferentes y está regulada por proteínas específicas. Las principales funciones de este tipo de muerte celular son: asegurar la eliminación de células infectadas por patógenos, promover un estado inflamatorio mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), e inducir el reclutamiento de células fagocíticas al sitio de daño, entre otras (Dhuriya & Sharma, 2018). La muerte celular necroptótica se produce por la activación de receptores de membrana como los tipo toll (TLR3/4), o los de muerte (death receptors o DRs). La activación de estos receptores induce la activación de quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina (RIPKs, receptor-interacting protein kinases) y que interactúan con otros receptores. Las proteínas RIPK1 y RIPK3 se oligomerizan para formar un complejo intracelular denominado necroptosoma, el cual induce la activación de la proteína MLKL (mixed lineage kinase domain like pseudokinase). Esta proteína se transporta a la membrana celular para inducir su ruptura y, en consecuencia, la liberación del contenido citoplasmático (Hanson, 2016). Se ha sugerido que la necroptosis es un mecanismo complementario a la apoptosis en algunas enfermedades neurodegenerativas (Caccamo et al., 2017; Carranza-Aguilar et al., 2020).

Por lo anterior señalado, la necroptosis es un importante mecanismo de muerte celular programada y actúa como regulador vital en enfermedades (Galluzzi et al., 2017). En un estudio del 2019 se evaluó la activación de la muerte de células endoteliales cerebrovasculares por necroptosis en un modelo de accidente

cerebrovascular isquémico en ratón (Chen et al., 2019), donde se determinó que esta muerte fue inducida por $TNF\alpha$ derivado de microglías, lo cual ocasionó el aumento de la permeabilidad de la BHE y la lesión cerebral isquémica. Como este mecanismo de muerte celular se ha comenzado a estudiar hace pocos años, aún faltan estudios que determinen otras vías por las cuales pueda estar relacionado un ACV con la necroptosis, posiblemente la hipoxia sea un factor que pueda estar involucrado en esta vía.

1.5. HIPOXIA

La hipoxia que es generada junto a la isquemia se define como una disminución transitoria o permanente en el suministro de oxígeno a un nivel insuficiente para mantener la función celular en una zona determinada del organismo (McGarry et al., 2018; Saeed et al., 2007). Y como consecuencia, en la zona afectada se puede producir daño tisular (Brahimi-horn & Pouysségur, 2009). Por lo tanto, la hipoxia cerebral hace referencia a un reducido suministro de oxígeno en una zona del cerebro, el cual afectara a las distintas células que lo componen (unidad neurovascular). En diversos estudios se ha evaluado el efecto de la hipoxia en distintas líneas celulares, en un estudio del 2017 se evidenció en modelos de hipoxia *in vitro* (3 días 0.5% oxígeno) que esta falta de oxígeno reduce significativamente la viabilidad e incrementa la apoptosis de las células endoteliales microvasculares de cerebro humano (Mata-greenwood et al., 2017).

En respuesta a la baja oxigenación tisular como ocurre durante el accidente cerebrovascular isquémico, las células activan los factores inducidos por hipoxia (HIF) para mejorar la transcripción de diversos genes, algunos de estos implicados en la glucólisis, la angiogénesis y la supervivencia celular, lo que promueve la adaptación al estrés hipóxico/isquémico (Kaelin & Ratcliffe, 2008). HIF es un complejo heterodimérico que se compone de una subunidad α y una subunidad β , estos en presencia de oxígeno (normoxia) no son capaces de formar el complejo debido a las proteínas dependientes de oxígeno prolin-4-hidroxilasa (PHD) y factor inhibidor HIF (FIH), las cuales hidroxilan la subunidad α en residuos de prolina y asparagina (Alizadeh et al., 2018). La PHD da como resultado el reclutamiento de la ubiquitina ligasa de la proteína E3 de von Hippel-Lindau y degradación proteosómica inmediata de HIF-1 α y -2 α (Epstein et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Cuando la oxigenación disminuye durante la hipoxia, PHD y FIH son menos activos generando HIF- α hipohidroxilado, el cual se acumula y transloca al núcleo para formar el complejo HIF por dimerización con HIF-1 β . Posteriormente, HIF recluta a su coactivador p300/CBP y se une específicamente a los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE), donde cumplirá su rol como factor de transcripción de una gran cantidad de genes sensibles al HIF (Brahimi-horn & Pouyssegur, 2009; Davis et al., 2019; Lando et al., 2002). Algunos de los genes más estudiados y conocidos dependientes de HIF son VEGF-A (angiogénesis), GLUTs (glucólisis), BCL2/Bnip3 (apoptosis),

entre otros, estos genes cumplirán el rol de compensar el daño que está siendo generado por el estado de hipoxia en la célula.

1.6. ESTRÉS OXIDATIVO POR HIPOXIA

La condición de hipoxia en el cerebro favorece el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto ocurre debido a que durante un estado deficiente de oxígeno, en las mitocondrias de las células que están generando energía por fosforilación oxidativa cambian la oxidación de sustratos relacionados con NAD (complejo I) a oxidación de succinato (complejo II) (Lukyanova et al., 2018), generando ROS cuando el complejo I / III se inhibe o las concentraciones de succinato son bajas (Quinlan et al., 2012). A concentraciones más altas, ROS causa estrés oxidativo (McGarry et al., 2018), un estado en el que las sustancias prooxidantes y antioxidantes están desequilibradas. Este aumento descontrolado de ROS genera la inactivación de PHD favoreciendo la estabilización de HIF-1 α (Hamanaka & Chandel, 2009), el cual podrá translocar al núcleo como se mencionó anteriormente. Además, esta sobreproducción de ROS inducida por la hipoxia genera daño oxidativo (Saeed et al., 2007), provocando oxidación de moléculas biológicas, incluidas el ADN, los lípidos celulares y las proteínas (McGarry et al., 2018), dando como consecuencia una función celular deteriorada y una viabilidad celular disminuida (Apostolova & Victor, 2015; Kidwell et al., 2000; F. Li et al., 2000; Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

1.7. ANTIOXIDANTES

Se dice que existe "estrés oxidativo" cuando existe una excesiva exposición a oxidantes y/o una capacidad antioxidante disminuida (González-Mangado & Morera Prat, 2001), generalmente ocurre cuando hay altos niveles de ROS o radicales libres, estas son moléculas cuya estructura atómica presenta un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera una alta inestabilidad.

Un mecanismo que tiene el organismo para combatir este estrés oxidativo es utilizar moléculas antioxidantes, las cuales juegan un rol fundamental. Estas son moléculas capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Flora et al., 2015). Se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales posea una afinidad mayor que otra molécula para interaccionar con un Radical libre o ROS (Mayor Oxilia, 2010). Los antioxidantes pueden ser enzimáticos, donde catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que reaccionan con los Radicales libres, o no enzimáticos que actúan directamente colisionando con el radical libre, cediendo un electrón, oxidándose y transformándose en un radical libre débil no tóxico (Birben et al., 2012). Además, los antioxidantes se clasifican en endógenos (se encuentran en el organismo y son sintetizados por sus células) y exógenos (que ingresan a través de la dieta). Dentro de los exógenos tenemos vitaminas, de las cuales hay

evidencia clínico epidemiológica que existe un beneficios al consumirlas, ya sea dietario o como suplemento (Coronado H. et al., 2015; Villagrán et al., 2019).

1.8. VITAMINA C

La vitamina C es un nutriente esencial en la fisiología y patología humana que posee un gran efecto antioxidante lo que lo convierte en un importante nutriente de la naturaleza que está presente en todos los seres vivos (Mandl et al., 2009; H. Yang, 2013). La mayoría de los mamíferos pueden sintetizarla a partir de la glucosa a través de la vía hexurónica que termina con la oxidación de la gulonolactona en l-ascorbato por la enzima gulonolactona oxidasa (GULO) (Muñoz-Montesino et al., 2021). Sin embargo, los humanos y algunas otras especies han perdido la capacidad de sintetizar esta vitamina debido a varias mutaciones en el gen GULO, lo que provoca el requisito obligatorio de obtener vitamina C de la dieta (Mandl et al., 2009; H. Yang, 2013).

La vitamina C es necesaria en muchos eventos fisiológicos, incluida la homeostasis redox, la síntesis de neuropéptidos y colágeno, la desmetilación de histonas, la desglicanación de proteoglicanos y la regulación del factor de transcripción inducible por hipoxia en donde actúa como cofactor enzimático de la enzima 2-oxoglutarato y Fe²⁺ dependiente de dioxigenasa que favorecerá la activación de PHD (Linowiecka et al., 2020; Muñoz-Montesino et al., 2021).

El antioxidante exógeno soluble más abundante en el cuerpo humano es la vitamina C (Tu et al., 2017), esta está presente en su forma oxidada y reducida,

el ácido dehidroascórbico (DHA) y el ácido ascórbico (AA) respectivamente. El DHA presenta una vida media corta de aproximadamente 15 segundos (Rivas et al., 2008), por lo que ingresa a las células rápidamente y es metabolizado a AA por reductasas, siendo sumamente efectivo contra peróxidos, hidroxilos, peroxinitrilos y súper oxido radicales (Carr & Frei, 1999). Además, el AA posee el beneficio de oxidarse parcialmente, generando ácido semi-dehidroascórbico que es un radical libre que puede tanto aceptar como ceder electrones y oxidarse aún más hasta DHA. Todo lo anterior señalado más esta propiedad química de oxidación reversible respalda las propiedades biológicas que posee el AA (Villagrán et al., 2019).

En el cuerpo humano el AA posee una concentración en el plasma de 30 a 60 μM (Capellmann et al., 1994), y en estudios de suplementación se determinó que los humanos necesitan aproximadamente 60-100 mg de vitamina C al día para mantener estos niveles normales en plasma y tejidos (Levine et al., 2020). La concentración en los tejidos varía según su requerimiento de AA, incluso hay algunos tejidos donde se puede encontrar 100 veces más concentrado que en el plasma, uno de estos tejidos es el cerebro, que además es vulnerable a los aumentos de ROS y RNS debido a la baja actividad de las enzimas antioxidantes de las neuronas y las altas concentraciones de lípidos peroxidables, hierro y consumo de oxígeno (Saeed et al., 2007), por lo cual, la vitamina C juega un rol sumamente importante como protector en las células cerebrales.

Para ingresar a la célula, el ácido dehidroascórbico y ácido ascórbico utilizan transportadores distintos, siendo los transportadores de la familia GLUTs, específicamente las isoformas GLUT 1, 2, 3, 4, 8 y 10 los capaces de transportar el DHA (Rumsey et al., 2000), y los co-transportadores (Na/AA) de la familia SVCTs los encargados de transportar al AA, SVCT1 y SVCT2 (Muñoz-Montesino et al., 2021; Rivas et al., 2008; Savini et al., 2008).

1.9. TRANSPORTADORES DE ACIDO ASCÓRBICO SVCTs

Como se mencionó anteriormente, el AA es transportado por la familia de transportadores de solutos SLC23 (co-transportadores de sodio/vitamina C), de esta familia se han descrito hasta la fecha dos miembros funcionales, SVCT1 y SVCT2. Los genes que codifican SVCT1 y SVCT2 en humanos son SLC23a1 y SLC23a2 respectivamente, están ubicados en cromosomas distintos y las proteínas que codifican tienen tamaños distintos, 598 aminoácidos para SVCT1 y 650 aminoácidos para SVCT2 (Muñoz-Montesino et al., 2021). Las proteínas SVCTs se expresan de manera diferencial, SVCT1 expresada en tejidos epiteliales donde controla la homeostasis del ácido ascórbico en todo el cuerpo, mientras que SVCT2 se expresa más ubicuamente, es funcionalmente activo en el cerebro, tejido neuroendocrino, pulmón y otros órganos (Gess et al., 2013; Rivas et al., 2008). SVCT1 y SVCT2 son co-transportadores de AA y Na⁺, con una KM aparente para el AA de 100μM y 20μM respectivamente (Godoy et al., 2007).

Con respecto a la presencia de estos transportadores en el cerebro, varios estudios han evidenciado la expresión de SVCT2 tanto en neuronas como en células gliales, además en las células de Schwann y células gliales del sistema nervioso periférico es la principal vía de transporte del ácido ascórbico (Gess et al., 2013). Si bien no existe en literatura evidencia de la presencia de los transportadores SVCTs en las células endoteliales microvasculares de cerebro humano, en nuestro laboratorio encontramos mediante inmunofluorescencia y PCR tiempo real la expresión tanto de SVCT1 como de SVCT2 en líneas celulares de endotelio cerebral humano (Guzmán Sepúlveda, 2004; Inostroza et al., 2017)(resultados no publicados).

En el año 2011 un estudio de Gess y colaboradores determinó que al inducir infarto cerebral a ratones ocluyendo la arteria cerebral media y post re-perfusión, aumentaban de manera significativa en los días posteriores al infarto la expresión del transportador SVCT2 en células endoteliales de cerebro (Gess et al., 2011). Este aumento podría estar indicando que, al ocurrir la isquemia y el posterior estado de hipoxia, el aumento de estrés oxidativo causa un aumento en la demanda de AA para neutralizar radicales libres.

En el 2017, Salazar y colaboradores evaluaron SVCT2 en distintas patologías cerebrales, en las cuales encontraron un aumento de la expresión de SVCT2 en astrocitos en todas las patologías estudiadas. Este aumento del transportador SVCT2 fue inversamente proporcional con los niveles plasmáticos de AA,

indicando que esta disminución plasmática se debe a la entrada de AA por medio de los transportadores al cerebro para disminuir el daño oxidativo que está ocurriendo a nivel cerebral (Salazar et al., 2017).

En base a la evidencia señalada, que muestra la presencia de los transportadores SVCT2 en células endoteliales de cerebro humano es posible inferir que también aumentan los niveles de expresión de SVCT2 después de un accidente cerebro vascular isquémico, por lo cual, se podría utilizar la vitamina C para favorecer la disminución del daño oxidativo causado por ROS o radicales libres y así prevenir las secuelas que este daño deja como consecuencia.

2. PROPUESTA DE INVESTIGACION

El presente proyecto se fundamenta en el problema generado por el accidente cerebrovascular, enfermedad que constituye la segunda causa de muerte en Chile y la principal causa de invalidez adquirida en el adulto, y que debido al envejecimiento de la población se encuentra en incremento continuo. Actualmente no posee un tratamiento capaz de revertir el daño causado por la hipoxia y estrés oxidativo, ocasionando la alta tasa de mortalidad y de pacientes con secuelas permanentes. La tasa de muerte celular depende de la gravedad del accidente cerebrovascular, dentro de las células afectadas por esta falta de oxígeno se encuentran las células endoteliales que conforman la red vascular (Xiang et al., 2019). Se ha demostrado que tratándolas específicamente en un accidente cerebrovascular puede mejorar la disfunción endotelial y así disminuir los daños que esto conlleva (Shi et al., 2017; C. S. Yang et al., 2019).

La vitamina C al ser un potente antioxidante es capaz de contrarrestar el estrés oxidativo provocado por la hipoxia en las células cerebrales, por consiguiente, los transportadores SVCTs de ácido ascórbico podrían jugar un rol fundamental en patologías con altos niveles de agentes oxidantes como los accidentes cerebrovasculares. Un marcado aumento en el potencial antioxidante podría ser una posible terapia para tratar un ACV, así como otras enfermedades neurovasculares. En la actualidad no existe literatura que compruebe si al igual que ocurre en ratones, aumenten la expresión de los transportadores SVCTs en

el endotelio cerebral humano bajo una condición de hipoxia generada por un accidente cerebrovascular. Tampoco se ha estudiado el posible efecto de administrar vitamina C como terapia para contrarrestar el daño ocasionado por la hipoxia y el estrés oxidativo tanto en las células endoteliales como en los diferentes tipos celulares que conforman el parenquima de cerebro humano. El estudio de estas aristas puede abrir las puertas a un nuevo blanco terapéutico para una patología que afecta a la población del país y hasta día de hoy no posee un tratamiento efectivo que mejore las probabilidades de sobrevivir.

3. HIPOTESIS

El estrés oxidativo ocasionado por la hipoxia en un accidente cerebrovascular provocara el aumento de la expresión de los transportadores de ácido ascórbico SVCTs para favorecer la entrada de vitamina C al medio intracelular de las células endoteliales microvasculares de cerebro humano, contrarrestando así el daño oxidativo. La administración de vitamina C favorece un aumento del potencial antioxidante, el cual revierte el daño oxidativo y la muerte celular producida por la hipoxia en células endoteliales microvasculares de cerebro humano.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad de la vitamina C para disminuir el daño oxidativo y la muerte celular causado por hipoxia en células endoteliales vasculares de cerebro humano.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estandarización de modelo de hipoxia *in vitro* con línea celular HBMEC.
2. Evaluar niveles de ROS, expresión de proteínas alteradas y tipo de muerte celular (apoptosis y Necroptosis) en HBMEC sometidas a hipoxia (1%O₂).
3. Determinar efecto de Vitamina C sobre viabilidad, aumento de ROS, expresión de proteínas y muerte celular inducida por hipoxia al 1%O₂ en HBMEC.
4. Evaluar efecto de Vitamina C en modelo de ACV con ratones i-gulono-c-lactone oxidase (Gulo) knockout.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1. Objetivo 1: Estandarización de modelo de hipoxia *in vitro* con línea celular HBMEC.

6.1.1. Cultivo Celular.

Se utilizará la línea celular HBMEC (human brain microvascular endothelial cells), estas células al ser diferenciadas de 12 a 14 días llegan a un plateau de proliferación (Fig1. Anexo) y comienzan expresar en su superficie proteínas de uniones ocluyentes lo cual es una de las principales características de las células endoteliales cerebrales. Datos obtenidos en nuestro laboratorio muestran que las HBMEC diferenciadas son capaces de captar vitamina C y expresan endógenamente los transportadores SVCT1 y SVCT2 (Fig2, Fig3 y Fig4. Anexo) (Guzmán Sepúlveda, 2004; Inostroza et al., 2017).

6.1.2. Cámara de Hipoxia.

Se utilizará un modelo de hipoxia *in vitro* físico (Mata-greenwood et al., 2017; Zhu et al., 2010), este es el modelo que más se asemeja a la hipoxia producida en un accidente cerebrovascular. Para ellos se utilizará una cámara de incubadora modular o cámara de hipoxia (Stem Cell Technologies) descrita en estudios de hipoxia (Sagrillo-fagundes et al., 2017). Este método consiste en desplazar el oxígeno existente en la incubadora con un flujo de gas que contiene 1%O₂;

5%CO₂; 94%N₂ a 40mmHg por 2 minutos, dejando al interior de la cámara un ambiente de hipoxia.

6.1.3. Dosis Letal 50% (LD50).

Para estandarizar el modelo de hipoxia se efectuarán distintos tiempos de hipoxia (6, 12, 24 y 48 horas) y se determinara la LD50 en HBMEC mediante la evaluación de la viabilidad celular. En este caso el LD50 consiste en la cantidad de tiempo de hipoxia necesaria para matar a la mitad de un cultivo celular. Una vez sea determinado el LD50, se utilizará este para los experimentos correspondientes a evaluar vitamina C.

6.1.4. Viabilidad.

La viabilidad celular se evaluará mediante las técnicas exclusión de tinción azul de tripán (Piñero Eça et al., 2009), MTT y citometría de flujo con el kit LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (invitrogen). El primero es un colorante empleado para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras, por lo tanto, solo las células muertas se teñirán de color azul el cual se podrá observar bajo al microscopio. Las células serán contabilizadas en una cámara de Neubauer que facilita el conteo de células por cuadrantes y permite una estimación de la cantidad de células que hay por mL. El MTT es un ensayo colorimétrico que evalúa la actividad metabólica celular

(Stockert et al., 2018), que en condiciones definidas refleja el número de células vivas presentes, ya que estas metabolizan el tinte de tetrazolio MTT a su forma insoluble que posee un color purpura, el cual es posible medir por absorbancia en un espectrofotómetro. Finalmente, el kit LIVE/DEAD™ se basa en determinar la viabilidad de las células en una población basada en la actividad de la esterasa y la integridad de la membrana plasmática, así discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM verde fluorescente para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática; los datos serán analizados con el programa FLOWJO.

Como control positivo de este modelo se utilizará cloruro de cobalto (competidor de hierro que comúnmente se utiliza para efectuar hipoxias químicas) (Davis et al., 2019; Sethi et al., 2018). Como control negativo del modelo se utilizará las células en estado de normoxia.

6.2. Objetivo 2: Evaluar niveles de ROS, expresión de proteínas alteradas y tipo de muerte celular (apoptosis y Necroptosis) en HBMEC sometidas a hipoxia (1%O₂).

6.2.1. Evaluación Especies Reactivas de Oxígeno (ROS).

Se medirán las especies reactivas de oxígeno inmediatamente después de que haya transcurrido el tiempo de hipoxia determinado para observar como es el avance del daño celular posterior a un estado hipóxico, esto se evaluará por citometría de flujo con el kit CellROX™ Green Flow Cytometry Assay Kit (invitrogen). El reactivo es permeable a las células y no fluorescente mientras está en el estado reducido, al reaccionar con ROS este se oxida y muestra una intensa señal fluorogénica que tiene una absorción/emisión máxima de 508/525 nm, se mantiene en el núcleo y en el citoplasma. Cuando se utiliza junto con la tinción de células muertas SYTOX™ Red que contiene el kit, las células con y sin estrés oxidativo se pueden distinguir con fiabilidad de las células muertas con ayuda del citómetro de flujo. Los datos serán analizados con el programa FLOWJO.

6.2.2. Evaluación de Expresión de proteínas.

6.2.2.1. Western Blot.

De la misma forma antes señalada se cultivarán las células y posterior a la hipoxia se determinarán los niveles de expresión de las proteínas HIF- α , GLUT1, VEGF-

A, ocludina, Claudina, E-cadherina, ZO-1, SVCT1 y SVCT2, mediante westernblot.

Para esto, primero se extraerán las proteínas del cultivo celular tratados con buffer rippa mas inhibidores de proteasa, las muestras de proteínas denaturadas se correrán por electroforesis en geles de agar al 8% y 10% dependiendo del peso de la proteína objetivo. Se utilizarán los anticuerpos primarios: anti HIF- α (AF1935 Systems), anti GLUT-1 (Santa Cruz Biotechnology), anti VEGF-A (Santa Cruz Biotechnology), anti ocludina (326621 USBiological), anti Claudina (342554 USBiological), anti E-cadherina, anti ZO-1 (493926 USBiological), anti SVCT1 (SC9921 Santa Cruz Biotechnology), anti SVCT2 (SC-30114 Santa Cruz Biotechnology), anti β -tubulina (SC-17787 Santa Cruz Biotechnology) anti β -actina (sc-47778 Santa Cruz Biotechnology). Se utilizarán los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa-699 y Alexa-799 (Jacson laboratories) para revelar las proteínas estudiadas.

6.2.2.2. Inmunofluorescencia.

Se evaluará los niveles de expresión y localización de los transportadores SVCTs y las proteínas de uniones estrechas (occludina, claudina, E-cadherina y ZO-1) por inmunofluorescencia para evaluar la integridad de las células endoteliales microvasculares cerebrales y determinar la ubicación los transportadores de ácido ascórbico bajo una condición de hipoxia. Se utilizarán los anticuerpos antes mencionados para westernblot y se utilizarán anticuerpos secundarios acoplados

a FITC, CY3 y CY5 para analizar las proteínas bajo microscopio de fluorescencia (Olympus).

6.2.2.3. Evaluación de la expresión relativa de ARN mensajero

(ARNm) por RT-qPCR.

Se evaluarán por RT-qPCR los niveles relativos de ARNm de las proteínas que podrían verse alteradas por la hipoxia.

Primero se extraerá el ARN total con el kit Absolutely RNA Miniprep Kit Catalog #400800 (la expresión relativa de ARNm será cuantificada a través del método de RT-qPCR en un equipo Agilent Technologies AriaMx Real Time PCR system). La pureza e integridad de las muestras de ARN serán verificadas por medición de la relación de absorbancia 260/280 nm, la relación de absorbancia debe ser > 2.0 a 260/280 nm.

Para PCR, la mezcla de reacción se preparará 15µl por muestra que contendrá 7,5µl de 2 × mezcla maestra Brilliant II SYBR Green QRT-PCR, 200nM de partidor sentido y anti-sentido, 10µl transcriptasa reversa (RT), ajustando el volumen final con H₂O libre de nucleasas. Posteriormente se agregará 100ng de ARN experimental a cada reacción. Las condiciones de RT-qPCR serán 50°C durante 30 minutos, 95 ° C durante 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95° C durante 30 s y 60° C durante 1minuto, seguido de un programa de curva de melting predeterminado en el equipo. La expresión relativa de ARNm será

normalizada con la expresión del ARNm de β actina. Los partidores que se utilizaran son: 5'-ACCTATGACCTGCTTGGTGC-3' 5'-AGTTTCTGTGTCGTTGCTGC-3' (HIF- α), 5'-CTGCTCAT-CAACCGCAAC-3' 5'-CTTCTTCTCCCGCATCATCT-3' (GLUT1), 5'-AACTATGACCATCGCCATC-3' 5'-GCCTGTACCTGTTGTGCACC-3' (ZO-1), 5'-GCCTTGCTTTCATACTTGAC-3' 5'-TGGAAGACATGTCACTGTTG-3' (SVCT1), 5'-AACTGCTATGTTTGTAGGGG-3' 5'-CAAATTGTACGACTCCATGC-3' (SVCT2), (β -tubulina) y 5'-ATTGCCGACAGGATGCAGAA-3' 5'-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3' (β -actina).

6.2.3. Evaluación de Muerte Celular.

La evaluación de muerte celular se efectuará posterior al proceso de hipoxia, se hará mediante la expresión de proteínas específicas de apoptosis y necroptosis. La expresión de estas proteínas se medirá mediante western blot utilizando la misma metodología señalada anteriormente. Los anticuerpos que se utilizaran son: para apoptosis anti-nucleasa potenciadora de la apoptosis (#PA5-22208 invitrogen) y para necroptosis anti-human-pMLKL (187091 Abcam)(Chen et al., 2019; Negroni et al., 2017; Zargarian et al., 2017).

6.3. Objetivo 3: Determinar efecto de Vitamina C sobre viabilidad, aumento de ROS, expresión de proteínas y muerte celular inducida por hipoxia al 1%O₂ en HBMEC.

6.3.1. Administración de Vitamina C *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente, la vitamina C es un potente antioxidante capaz de revertir daño celular mediante la neutralización de agentes oxidantes. Se efectuará una curva de concentración dosis-respuesta de ácido ascórbico, en donde se administrará las concentraciones 1, 10, 30, 50, 100, 300 y 1000 µM, luego de la inducción de hipoxia LD50. Los efectos de la vitamina C se evaluarán administrando las dosis 0, 2, 4 y 6 horas después del estado de hipoxia.

6.3.2. Evaluación de efecto Vitamina C *in vitro*.

3 y 24 horas posterior a la administración de vitamina C se determinará viabilidad celular, niveles de estrés oxidativo y tipo de muerte celular con los protocolos mencionados en el objetivo 2.

Además, se medirá la expresión de SVCT1, SVCT2 y las proteínas de uniones estrechas (occludina, claudina, E-cadherina y ZO-1) por inmunofluorescencia para evaluar el efecto que produce la vitamina C en la expresión de sus transportadores y evaluar la integridad de la BHE.

6.4. Objetivo 4: Evaluar efecto de Vitamina C en modelo de ACV con ratones i-gulono-c-lactone oxidase (Gulo) knockout.

6.4.1. Modelo Animal de ACV.

Se utilizarán ratones macho adultos i-gulono-c-lactone oxidase (Gulo) knockout, los cuales no sintetizan vitamina C endógenamente por lo que deben adquirirla por la dieta al igual que los humanos (Kook et al., 2014). A los ratones se les permitirá el libre acceso al agua y la comida antes de la cirugía. Los ratones se dividirán en 3 grupos: 1) Infartados con administración intranasal de vitamina C posterior al ACV. 2) Infartados con administración intravenosa de vitamina C posterior al ACV. 3) Infartados sin administración de vitamina C.

Se seguirá el siguiente protocolo de accidente cerebrovascular isquémico: 1) Anestesiarse al animal, se utiliza isoflurano al 2% y se mantiene con isoflurano al 1% en una mezcla de óxido nitroso al 70% y oxígeno al 30% (Gess et al., 2011). 2) Inducción isquemia cerebral focal transitoria, se utiliza una técnica de filamento intraluminal estándar modificada (Hata et al., 1998; Minnerup et al., 2009). Luego se procede a la oclusión de la arteria cerebral media izquierda (MCAO) inducida con un monofilamento de nailon 8-0 y recubierta con resina de silicona. El flujo sanguíneo cerebral se controla continuamente mediante una sonda Doppler láser para verificar la isquemia y la perfusión. Durante el experimento las temperaturas rectales se mantienen a $37^{\circ}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ con una almohadilla térmica controlada por termostato. Después de 30 min, se retira el filamento para

reperfundir el cerebro isquémico y se permite que los animales se recuperaran de la anestesia (Gess et al., 2011).

6.4.2. Administración y Evaluación del Efecto de Vitamina C *in vivo*.

Posterior al ACV isquémico efectuado en ratones se administrará la dosis de vitamina C (200 μ M y 1mM) y posterior al tiempo de supervivencia apropiado los animales serán profundamente anestesiados y perfundidos transcárdicamente con paraformaldehído (PFA) al 4%. Los cerebros se extraerán rápidamente del cráneo, se post fijarán en PFA al 4 % (3 h), se sumergirán en sacarosa al 10 % durante la noche, se congelarán y se almacenaron a -80 °C (Gess et al., 2011). En los tejidos obtenidos de la región isquémica y su control se evaluará viabilidad, niveles de ROS, expresión de transportadores (SVCT1 y 2) y la presencia de proteínas importantes para mantener la barrera hematoencefálica como ocludina, claudina, E-cadherina y ZO-1 para analizar daño del endotelio cerebral y el efecto de la vitamina C.

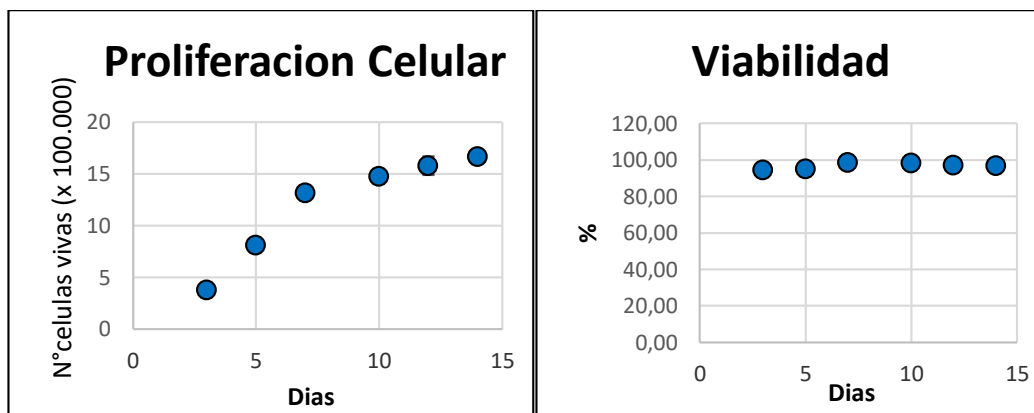
7. PLAN DE TRABAJO

	Año 1		Año 2		Año 3	
Objetivos	S1	S2	S1	S2	S1	S2
1. Estandarización de modelo de hipoxia <i>in vitro</i> con línea celular HBMEC.						
2. Evaluar niveles de ROS, expresión de proteínas alteradas y tipo de muerte celular (apoptosis y Necroptosis) en HBMEC sometidas a hipoxia (1%O ₂).						
3. Determinar efecto de Vitamina C sobre viabilidad, aumento de ROS, expresión de proteínas y muerte celular inducida por hipoxia al 1%O ₂ en HBMEC.						
4. Evaluar efecto de Vitamina C en modelo de ACV con ratones i-gulono-c-lactone oxidase (Gulo) knockout.						
Publicación de resultados						

8. ANEXO

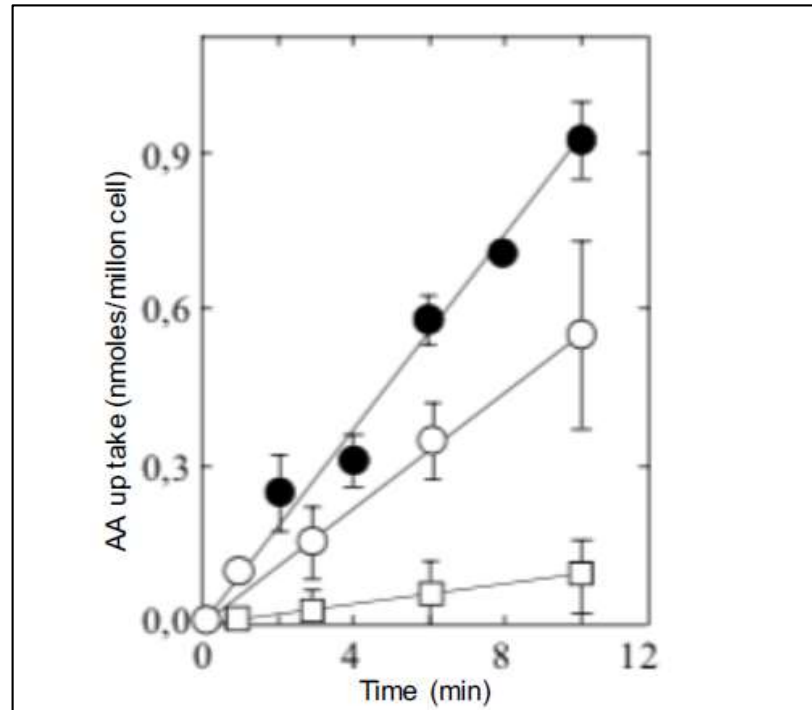
8.1. Antecedentes del equipo de trabajo para ejecutar la propuesta

8.1.1. Figura 1: Diferenciación HBMEC.



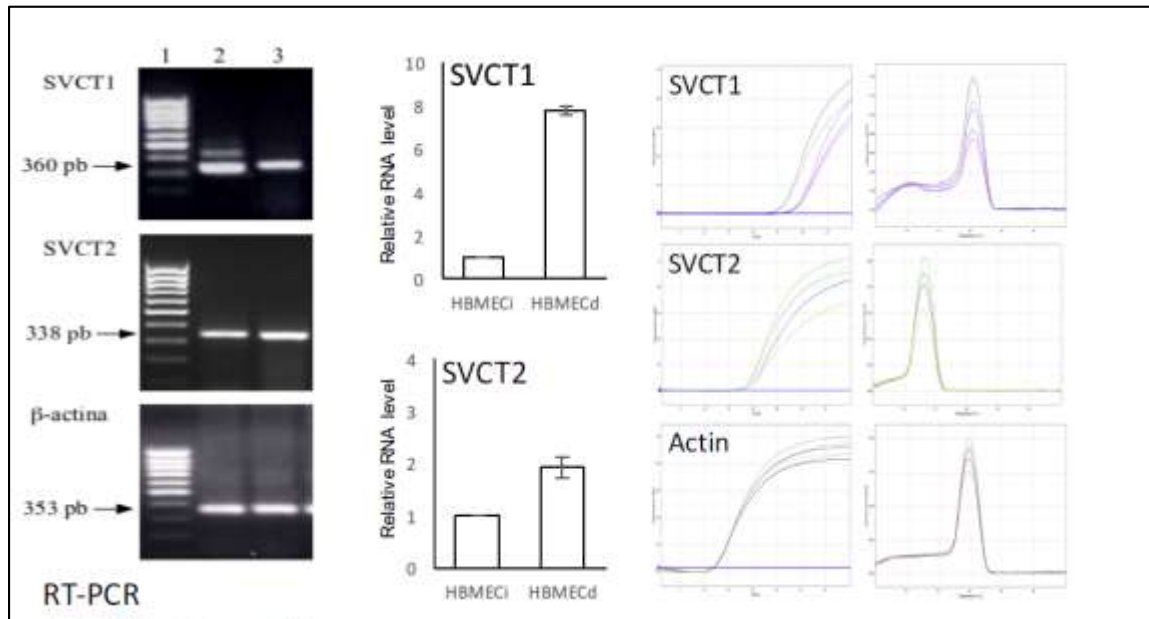
Las células fueron cultivadas por hasta 14 DIV, se contaron el número de células vivas (Fig izquierda) y la viabilidad usando el método de Azul de tripan (fig derecha). Los Gráficos muestran que es posible cultivar las células HBMEC por 14 días, estas aumentan su número en el tiempo y pasado los 10 DIV ya no aumentan significativamente el número de células y en cada condicion la viabilidad alcanzó casi el 100%.

8.1.2. Figura 2: Captación de AA por HBMEC.



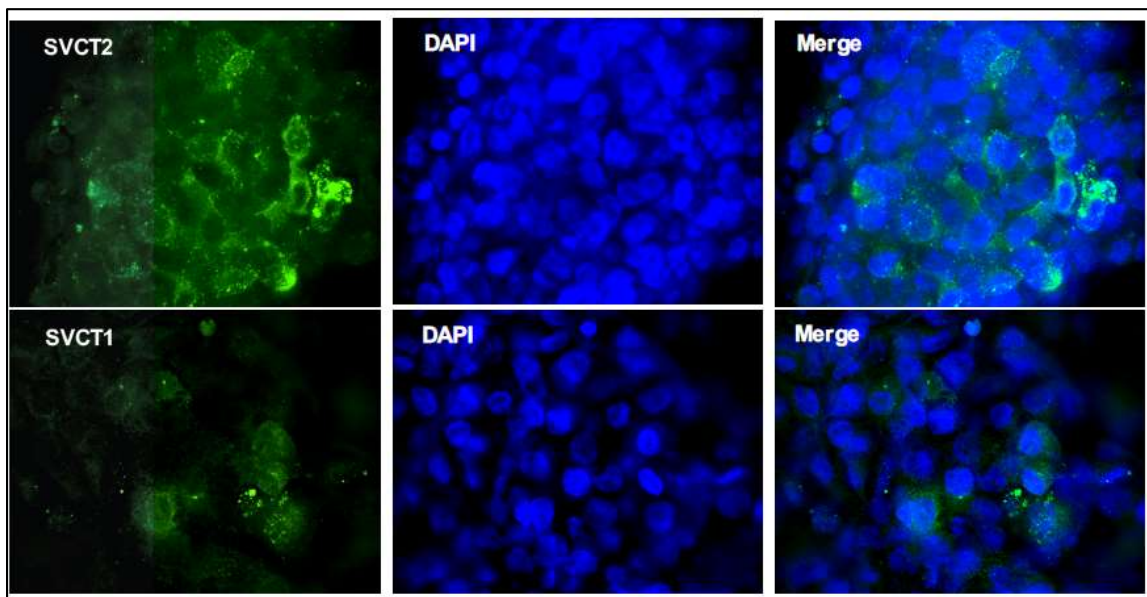
Evolución temporal de 500μM (círculos negros) y 50μM (círculos blancos) de ascorbato en la línea celular endotelial microvascular humana HBMEC. Los experimentos se realizaron a 37°C. Control (cuadrados blancos): 50μMAA en tampón de colina. El grafico muestra que las células endoteliales microvasculares de cerebro humano captan ácido ascórbico, lo cual indica la posible presencia de los transportadores SVCTs para la captación de este.

8.1.3. Figura 3: Niveles relativos de ARN de SVCT1 y SVCT2 en células HBMEC diferenciadas.



A: RT-PCR, 1: Ladder 2: Control (Caco-2) 3: HBMEC. **B:** Incremento de la expresión relativa de ARNm de SVCT1 y SVCT2 en células HBMEC diferenciadas. Los resultados demuestran la expresión de los transportadores de ácido ascórbico (SVCT1 y SVCT2) en células endoteliales microvasculares de cerebro humano (HBMEC) que presentan mayores niveles relativos de ARN mensajero en las células diferenciadas en contraste a las indiferenciadas.

8.1.4. Figura 4: *Inmunofluorescencia de SVCT1 y SVCT2 en células HBMEC diferenciadas.*



En verde marcado los transportadores SVCTs, en azul marcado los núcleos. En la figura se aprecia de manera precisa la presencia de los transportadores SVCT1 y SVCT2 en la membrana de las células de la línea celular de endotelio microvascular de cerebro humano. Sin embargo, falta la co-localización con otro marcador de membrana como GLUT1

9. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:

9.1. Personal Técnico: Personas que ejercen funciones de carácter técnico permanente a la investigación durante la ejecución del proyecto:

Personal Técnico	Horas de dedicación		Meses de dedicación			Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	Año 3	
Investigador principal	44	176	11	11	11	10.000

***Descripción de tareas:** Responsable del funcionamiento diario del laboratorio y apoyo en dirección a estudiantes

9.2. Personal de Apoyo: Personas que ejercen funciones de apoyo permanente a las actividades asociadas a la ejecución del proyecto:

Personal de Apoyo	Horas de dedicación		Meses de dedicación			Remuneración / Honorarios m(\$)
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	Año 3	
Técnico	22	88	11	11	11	6.600

***Descripción de tareas:** Personal administrativo, encargado de cotizaciones, compra de insumos, etc.

9.3. Becas para tesis/ memorista:

	Número de tesis a formar, justificar solicitud
Año 1	2 beca para tesis de pre y/o post grado para el desarrollo de objetivos del proyecto
Año 2	2 beca para tesis de pre y/o post grado para el desarrollo de objetivos del proyecto

Año 3	2 beca para tesis de pre y/o post grado para el desarrollo de objetivos del proyecto
--------------	--

9.4. Viajes al extranjero: Por concepto de reuniones científicas o congresos se financia como máximo un viaje por año.

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1					
Año 2					
Año 3	1.500	500	USA	5	Asistencia a congreso Neuroscience

9.5. Viajes nacionales:

	Pasajes m(\$)	Viáticos m(\$)	Destino	Nº Días	Propósito del viaje
Año 1	50	200	Puerto Varas	4	Asistencia a congreso Sociedad de Biología Celular de Chile
Año 2	50	200	Puerto Varas	4	Asistencia a congreso Sociedad de Biología Celular de Chile
Año 3					

9.6. Gastos de operación general:

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)	Año 3 m(\$)
Materiales	Para llevar a cabo el Proyecto son necesarios suministros de oficina (tales como papel, lápices marcador, cartuchos de tinta, etc.), material fungible de laboratorio (tales como placas de cultivo, puntas, frascos de cultivo, pipetas serológicas, raspador de células, etc), reactivos para la mantención de cultivos celulares, además de técnicas moleculares (medios de cultivo, suero fetal bovino, antibióticos, antimicóticos, agua libre de nucleasas, tripsina, etc.) y kits comerciales y anticuerpos para realizar inmunoensayos y técnicas moleculares (Kit de extracción de ARN, Takyon Mastermix, kit para citometría de flujo, etc.)	9.000	7.500	7.000
Capacitaciones				
Inscripción seminarios, congresos, talleres, etc.	Una vez al año se presentarán los resultados obtenidos en congresos de la especialidad como parte del proceso de discusión y apertura a otros miembros de la comunidad científica.	300	300	800
Publicaciones, Propiedad Intelectual e Industrial	Durante el segundo y tercer año se realizará una publicación científica con los resultados obtenidos en este proyecto. Algunas revistas científicas de interés tienen costos de publicación		1.500	1.500

Material bibliográfico y suscripciones				
Gastos en difusión				
Softwares	Se utilizaran softwares como Flowjo en citometría de flujo para análisis de datos, estos tienen un costo de licencia.	200	200	200
Costos de garantías de boletas, pólizas y pagarés				
Reparación y arriendo de equipos	Se utilizara el citómetro de flujo del departamento de microbiología de la universidad de concepción, el cual posee un costo de arriendo.	500	500	500
Movilizaciones y traslados				
Atención de reuniones				
Otros gastos de operación				
TOTAL:		10.000	10.000	10.000

9.7. Equipamiento:

	Nombre Equipamiento	Costo m(\$)(*)	Fundamente solicitud
Año 1	Impresora multifuncional con conexión wifi.	500	Impresora para sala de estudiantes. Útil para la impresión de documentos y trabajos que necesiten los estudiantes del laboratorio.
Año 2			
Año 3			

9.8. Infraestructura y mobiliario:

Subítem	Fundamente solicitud	Año 1 m(\$)	Año 2 m(\$)	Año 3 m(\$)
Acondicionamiento de espacios físicos				
Mobiliario	Muebles para almacenar productos de laboratorio	1.000		
Total:		1.000		

10. RECURSOS DISPONIBLES:

El laboratorio de Antioxidantes y Cáncer del departamento de Fisiopatología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, cuenta con la infraestructura y el equipamiento necesario para llevar a su totalidad el desarrollo de este proyecto, incluyendo:

- 1) Sala de cultivo celular: cuenta con dos gabinetes de flujo laminar, un gabinete de flujo vertical, un microscopio invertido, dos refrigeradores, una centrifuga y dos incubadoras con CO₂.
- 2) Laboratorio general: donde se encuentra todo el equipamiento básico para realizar técnicas de laboratorio con baja probabilidad de contaminación. Este incluye mesones, mueves con reactivos varios, 2 refrigeradores, una centrifuga con enfriamiento, un espectrofotómetro, cámaras para electroforesis con fuentes de poder, visualizadores de geles con UV, equipo para escanear membranas de western Blot, equipo Tecan Infinite M200 y dos equipos para hacer RTqPCR.
- 3) Sala de refrigeradores -80: esta cuenta con un refrigerador -80 para almacenar muestras y líneas celulares, una despensa y un refrigerador vitrina de dos puertas donde se dejan experimentos en frio.

- 4) Sala de microscopio confocal: en esta se encuentra exclusivamente el microscopio confocal utilizado para análisis de muestras con la técnica de inmunofluorescencia.
- 5) Sala de estudio para estudiantes del departamento de Fisiopatología: esta sala compartida cuenta con escritorios y asientos para todos los estudiantes de pregrado y postgrado de nuestro laboratorio, además cuenta con un computador para el uso exclusivo de nuestros estudiantes.

Además, dentro de las dependencias de la Universidad de Concepción se tendrá acceso a un citómetro de flujo de última generación BD LSR Fortessa X-20.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aird, W. C. (2007a). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation Research*, 100(2), 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>
- Aird, W. C. (2007b). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation Research*, 100(2), 174–190. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae>
- Alizadeh, E., Mammadzada, P., & André, H. (2018). The different facades of retinal and choroidal endothelial cells in response to hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123846>
- Apostolova, N., & Victor, V. M. (2015). Molecular strategies for targeting antioxidants to mitochondria: Therapeutic implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 22(8), 686–729. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5952>
- Arango-Davila, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G. P., & Pimienta-Jiménez, H. (2004). [Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice]. *Revista de Neurología*, 39(2), 156–165. <http://europepmc.org/abstract/MED/15264167>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blanchette, M., & Daneman, R. (2015). Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development*, 138, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.07.007>
- Brahimi-horn, M. C., & Pouyssegur, J. (2009). *HIF at a glance HIF at a Glance*. 2009, 1055–1057. <https://doi.org/10.1242/jcs.035022>
- Caccamo, A., Branca, C., Piras, I. S., Ferreira, E., Huentelman, M. J., Liang, W. S., Readhead, B., Dudley, J. T., Spangenberg, E. E., Green, K. N., Belfiore, R., Winslow, W., & Oddo, S. (2017). Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 20(9), 1236–1246. <https://doi.org/10.1038/nn.4608>
- Capellmann, M., Becka, M., & Bolt, H. M. (1994). A note on distribution of human plasma levels of ascorbic and dehydroascorbic acid. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 45(1), 183–187.

- Carr, A., & Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal*, 13(9), 1007–1024. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.9.1007>
- Carranza-Aguilar, C. J., Ruiz-Quiñonez, A. K., González-Espinosa, C., & Cruz-Martín-del-Campo, S. L. (2020). Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente*, 15(3), 97–112. <https://doi.org/10.35366/95960>
- Chen, A. Q., Fang, Z., Chen, X. L., Yang, S., Zhou, Y. F., Mao, L., Xia, Y. P., Jin, H. J., Li, Y. N., You, M. F., Wang, X. X., Lei, H., He, Q. W., & Hu, B. (2019). Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain–barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death and Disease*, 10(7). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1716-9>
- Coronado H., M., Vega Y León, S., Gutiérrez T., R., Marcela, V. F., & Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: Perspectiva actual para la salud humana. *Revista Chilena de Nutricion*, 42(2), 206–212. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>
- Davis, C. K., Jain, S. A., Bae, O., Majid, A., & Rajanikant, G. K. (2019). *Hypoxia Mimetic Agents for Ischemic Stroke*. 6(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00175>
- Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Epstein, A. C. R., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 107(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00507-4)
- Flora, G., Mittal, M., & Flora, S. J. S. (2015). Medical Countermeasures-Chelation Therapy. In *Handbook of Arsenic Toxicology* (pp. 589–626). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418688-0.00026-5>
- Fraser, P. A. (2011). The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.003>
- Galluzzi, L., Kepp, O., Chan, F. K.-M., & Kroemer, G. (2017). Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology*:

Mechanisms of Disease, 12(1), 103–130. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052016-100247>

Gess, B., Röhr, D., & Young, P. (2013). Ascorbic acid and sodium-dependent vitamin C transporters in the peripheral nervous system: From basic science to clinical trials. *Antioxidants and Redox Signaling*, 19(17), 2105–2114. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5380>

Gess, B., Sevimli, S., Strecker, J. K., Young, P., & Schäbitz, W. R. (2011). Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2 (SVCT2) expression and activity in brain capillary endothelial cells after transient ischemia in mice. *PLoS ONE*, 6(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017139>

Godoy, A., Ormazabal, V., Moraga-Cid, G., Zúñiga, F. A., Sotomayor, P., Barra, V., Vasquez, O., Montecinos, V., Mardones, L., Guzmán, C., Villagrán, M., Aguayo, L. G., Oñate, S. A., Reyes, A. M., Cárcamo, J. G., Rivas, C. I., & Vera, J. C. (2007). Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2: Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *Journal of Biological Chemistry*, 282(1), 615–624. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608300200>

González-Mangado, N., & Morera Prat, J. (2001). Oxidación celular y fármacos mucoactivos antioxidantes. *Archivos de Bronconeumología*, 37(10), 407–409. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(01\)75109-5](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(01)75109-5)

Gordeziani, M., Adamia, G., Khatisashvili, G., & Gigolashvili, G. (2017). Programmed cell self-liquidation (apoptosis). *Annals of Agrarian Science*, 15(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.11.001>

Guzman, C. (2004). EXPRESION POLARIZADA DE TRANSPORTADORES DE GLUCOSA Y VITAMINA C EN CELULAS INMORTALIZADAS DE MICROVASCULATURA CEREBRAL HUMANA. Tesis Doctoral no publicada. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 894–899. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005>

Hanson, B. (2016). Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biology and Therapy*, 17(9), 899–910. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1210732>

Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hesselbarth, D., Brinker, G., & Hossmann, K.-A. (1998). A Reproducible Model of Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice: Hemodynamic, Biochemical, and Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 18(4), 367–375. <https://doi.org/10.1097/00004647-199804000-00004>

Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and

- focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*, 66(3), 232–245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.surneu.2005.12.028>
- Inostroza, E., Guzman, K., Sotomayor, K., Villaseca, G., Vera, J. and Rivas, C. (2018). EXPRESSION AND DISTRIBUTION OF VITAMIN C TRANSPORTERS IN HUMAN BRAIN MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS. Presentado en la sesión de posters del Paris Redox World Congress 2018, Paris, Francia. No publicado.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y.-M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. von, Hebestreit, H. F., Mukherji, M., Schofield, C. J., Maxwell, P. H., Pugh, ‡ Christopher W, & Ratcliffe, ‡ Peter J. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468 LP – 472. <https://doi.org/10.1126/science.1059796>
- Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>
- Kidwell, C. S., Saver, J. L., Mattiello, J., Starkman, S., Vinuela, F., Duckwiler, G., Gobin, Y. P., Jahan, R., Vespa, P., Kalafut, M., & Alger, J. R. (2000). Thrombolytic reversal of acute human cerebral ischemic injury shown by diffusion/perfusion magnetic resonance imaging. *Annals of Neurology*, 47(4), 462–469.
- Kook, S. Y., Lee, K. M., Kim, Y., Cha, M. Y., Kang, S., Baik, S. H., Lee, H., Park, R., & Mook-Jung, I. (2014). High-dose of vitamin C supplementation reduces amyloid plaque burden and ameliorates pathological changes in the brain of 5XFAD mice. *Cell Death and Disease*, 5(2), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.26>
- Lando, D., Peet, D. J., Whelan, D. A., Gorman, J. J., & Whitelaw, M. L. (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: A hypoxic switch. *Science*, 295(5556), 858–861. <https://doi.org/10.1126/science.1068592>
- Levine, M., Ebenuwa, I., & Violet, P.-C. (2020). Vitamin C. In *Essential and Toxic Trace Elements and Vitamins in Human Health*. (Issue 13). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805378-2.00018-8>
- Li, C., Zhang, Y., Liu, R., & Mai, Y. (2021). Anagliptin Protected against Hypoxia/Reperfusion-Induced Brain Vascular Endothelial Permeability by Increasing ZO-1. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00242>
- Li, F., Silva, M. D., Liu, K. F., Helmer, K. G., Omae, T., Fenstermacher, J. D., Sotak, C. H., & Fisher, M. (2000). Secondary decline in apparent diffusion

- coefficient and neurological outcomes after a short period of focal brain ischemia in rats. *Annals of Neurology*, 48(2), 236–244. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200008\)48:2<236::AID-ANA14>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200008)48:2<236::AID-ANA14>3.0.CO;2-7)
- Li, P., Zhou, L., Zhao, T., Liu, X., Zhang, P., Liu, Y., Zheng, X., & Li, Q. (2017). Caspase-9: Structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*, 8(14), 23996–24008. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15098>
- Linowiecka, K., Foksinski, M., & Brożyna, A. A. (2020). Vitamin c transporters and their implications in carcinogenesis. *Nutrients*, 12(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12123869>
- Lukyanova, L. D., Kirova, Y. I., & Germanova, E. L. (2018). The Role of Succinate in Regulation of Immediate HIF-1 α Expression in Hypoxia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 164(3), 298–303. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-3976-2>
- Mandl, J., Szarka, A., & Bánhegyi, G. (2009). Vitamin C: Update on physiology and pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 157(7), 1097–1110. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00282.x>
- Mata-greenwood, E., Goyal, D., & Goyal, R. (2017). *Comparative and Experimental Studies on the Genes Altered by Chronic Hypoxia in Human Brain Microendothelial Cells*. 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00365>
- Mayor Oxilia, R. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Revista Del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23–29.
- McGarry, T., Binińska, M., Veale, D. J., & Fearon, U. (2018). Hypoxia, oxidative stress and inflammation. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 125, pp. 15–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.042>
- Mies, G., Ishimaru, S., Xie, Y., Seo, K., & Hossmann, K. A. (1991). Ischemic thresholds of cerebral protein synthesis and energy state following middle cerebral artery occlusion in rat. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 11(5), 753–761. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1991.132>
- Minnerup, J., Sevimli, S., & Schäbitz, W.-R. (2009). Granulocyte-colony stimulating factor for stroke treatment: mechanisms of action and efficacy in preclinical studies. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 1(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2040-7378-1-2>
- MINSAL. (2013). *Guía Clínica AUGÉ Accidente Cerebro Vascular Isquémico en personas de 15 años y más. Serie Guías Clínicas*.

<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7222754637e58646e04001011f014e64.pdf>

MINSAL. (2014). *Ataque Cerebro Vascular*.

Muñoz-Montesino, C., Peña, E., Roa, F. J., Sotomayor, K., Escobar, E., & Rivas, C. I. (2021). Transport of Vitamin C in Cancer. *Antioxidants and Redox Signaling*, 35(1), 61–74. <https://doi.org/10.1089/ars.2020.8166>

Negroni, A., Colantoni, E., Pierdomenico, M., Palone, F., Costanzo, M., Oliva, S., Tiberti, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2017). RIP3 AND pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells. *Digestive and Liver Disease*, 49(11), 1201–1210. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.08.017>

Ni, Y., Gu, W.-W., Liu, Z.-H., Zhu, Y.-M., Rong, J.-G., Kent, T. A., Li, M., Qiao, S.-G., An, J.-Z., & Zhang, H.-L. (2018). RIP1K Contributes to Neuronal and Astrocytic Cell Death in Ischemic Stroke via Activating Autophagic-lysosomal Pathway. *Neuroscience*, 371, 60–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.038>

Piñero Eça, L., Belmonte Ramalho, R., Sousa Oliveira, I., Oliveira Gomes, P., Pontes, P., Teixeira Ferreira, A., & Vaccari Mazzetti, M. P. (2009). Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cirurgica Brasileira*, 24(5), 400–404. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502009000500011>

Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., & Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27255–27264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>

Rahme, R., Curry, R., Kleindorfer, D., Khoury, J. C., Ringer, A. J., Kissela, B. M., Alwell, K., Moomaw, C. J., Flaherty, M. L., Khatri, P., Woo, D., Ferioli, S., Broderick, J., & Adeoye, O. (2012). *NIH Public Access*. 43(2), 550–552. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.635185>.How

Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

Ridder, D. A., Wenzel, J., Müller, K., Töllner, K., Tong, X. K., Assmann, J. C., Stroobants, S., Weber, T., Niturad, C., Fischer, L., Lembrich, B., Wolburg, H., Grand'Maison, M., Papadopoulos, P., Korpos, E., Truchetet, F., Rades, D.,

- Sorokin, L. M., Schmidt-Supprian, M., ... Schwaninger, M. (2015). Brain endothelial TAK1 and NEMO safeguard the neurovascular unit. *Journal of Experimental Medicine*, 212(10), 1529–1549. <https://doi.org/10.1084/jem.20150165>
- Rivas, C. I., Zúñiga, F. A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., & Vera, J. C. (2008). Vitamin C transporters. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 64(4), 357–375. <https://doi.org/10.1007/BF03174092>
- Rumsey, S. C., Daruwala, R., Al-hasani, H., Zarnowski, M. J., Simpson, I. A., Levine, M., Lloyd, W., Way, E., In, E., & Levine, M. (2000). *Dehydroascorbic acid (DHA), the first stable oxidation product of*.
- Saeed, S. A., Shad, K. F., Saleem, T., Javed, F., & Khan, M. U. (2007). Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Experimental Brain Research*, 182(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00221-007-1050-9>
- Sagrillo-fagundes, L., Laurent, L., Bienvenue-, J., & Vaillancourt, C. (2017). In Vitro Induction of Hypoxia / Reoxygenation on Placental Cells : A Suitable Model for Understanding Placental Diseases. *Methods in Molecular Biology*, 1710, 277–283.
- Salazar, K., Martínez, F., Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M. J., López-Gamero, A. J., Bonansco, C., Bongarzone, E. R., & Nualart, F. (2017). SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Molecular Neurobiology*, 55(7), 5439–5452. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0762-5>
- Saraste, A., & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528–537. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3)
- Savini, I., Rossi, A., Pierro, C., Avigliano, L., & Catani, M. V. (2008). SVCT1 and SVCT2: Key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*, 34(3), 347–355. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0555-7>
- Sekerdag, E., Solaroglu, I., & Gursoy-Ozdemir, Y. (2018). Cell Death Mechanisms in Stroke and Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Current Neuropharmacology*, 16(9), 1396–1415. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180302115544>
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., & Friedman, A. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 38, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.01.002>
- Sethi, K., Rao, K., Bolton, D., Patel, O., & Ischia, J. (2018). Targeting HIF-1 α to

- Prevent Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Does It Work? *International Journal of Cell Biology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9852791>
- Shi, Y., Jiang, X., Zhang, L., Pu, H., Hu, X., Zhang, W., Cai, W., Gao, Y., Leak, R. K., Keep, R. F., Bennett, M. V. L., & Chen, J. (2017). Endothelium-targeted overexpression of heat shock protein 27 ameliorates blood-brain barrier disruption after ischemic brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), E1243–E1252. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621174114>
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.02.005>
- Tu, H., Wang, Y., Li, H., Brinster, L. R., & Levine, M. (2017). Chemical Transport Knockout for Oxidized Vitamin C, Dehydroascorbic Acid, Reveals Its Functions in vivo. *EBioMedicine*, 23, 125–135. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.017>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2006). Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68, 403–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.131404>
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 700–714. <https://doi.org/10.1038/nrm2970>
- Villagrán, M., Muñoz, M., Díaz, F., Troncoso, C., Celis, C., & Mardones, L. (2019). Vitamina C (Artículo de Revisión / Review Article). *Revista Chilena de Nutrición*, 46(6), 800–808.
- Wang, F., Cao, Y., Ma, L., Pei, H., Rausch, W. D., & Li, H. (2018). Dysfunction of Cerebrovascular Endothelial Cells: Prelude to Vascular Dementia. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10(November), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00376>
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., Searson, P. C., Nadeau, J., & Sharma, H. S. (2013). *The blood-brain barrier: an engineering perspective*. <https://doi.org/10.3389/fneng.2013.00007>
- Xiang, J., Andjelkovic, A. V., Zhou, N., Hua, Y., Xi, G., Wang, M., Keep, R. F., & Arbor, A. (2019). Is there a central role for the cerebral endothelium and the vasculature in the brain response to conditioning stimuli? *Jianming*. 1(5), 220–232.

- Yang, C. S., Guo, A., Li, Y., Shi, K., Shi, F. D., & Li, M. (2019). DI-3-n-butylphthalide reduces neurovascular inflammation and ischemic brain injury in mice. *Aging and Disease*, 10(5), 964–976. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.0608>
- Yang, H. (2013). Conserved or Lost: Molecular Evolution of the Key Gene GULO in Vertebrate Vitamin C Biosynthesis. *Biochemical Genetics*, 51(5), 413–425. <https://doi.org/10.1007/s10528-013-9574-0>
- Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., & Fan, J. (2015). Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0>
- Zargarian, S., Shlomovitz, I., Erlich, Z., Hourizadeh, A., Ofir-Birin, Y., Croker, B. A., Regev-Rudzki, N., Edry-Botzer, L., & Gerlic, M. (2017). Phosphatidylserine externalization, “necroptotic bodies” release, and phagocytosis during necroptosis. *PLoS Biology*, 15(6), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002711>
- Zhang, R., Chopp, M., Zhang, Z., Jiang, N., & Powers, C. (1998). The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*, 785(2), 207–214. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)01343-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)01343-7)
- Zhang, S., Wang, Y., Xie, H., Yu, Q., Wu, J., Wu, Y., & Zhu, Y. (2017). Necroptosis and microglia activation after chronic ischemic brain injury in mice. *European Journal of Inflammation*, 15(2), 78–84. <https://doi.org/10.1177/1721727X17706855>
- Zhu, P., Ning, Y., Yao, L., Chen, M., & Xu, C. (2010). The proliferation, apoptosis, invasion of endothelial-like epithelial ovarian cancer cells induced by hypoxia. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-124>