



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dra. Maite A. Castro G.
INSTITUTO : Bioquímica y Microbiología
FACULTAD : Ciencias

“EVALUACIÓN DEL ÁCIDO FOSFOASCÓRBICO COMO UN AGENTE NEUROPROTECTOR DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico.

DAYANA ESTEFANÍA PÉREZ ACUÑA

VALDIVIA-CHILE

2016

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera dar las gracias a la Dra. Maite Castro por recibirme en su laboratorio, por sus consejos, ayuda, buena disposición y principalmente por la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. También quisiera agradecer a Aníbal Acuña, Adriana Covarrubias, Felipe Beltrán, Abraham Rosas, Anitsi Loaisa, Leandro Torres, Macarena Solís, Eduardo Papic, Isidora Vicencio, Juan Villalobos, Gonzalo Mayorga, Makarena Yañez y Daniel Fernandez, quienes con su simpatía, alegría y amistad hicieron agradables las largas jornadas de trabajo. En especial, agradecer a Adriana, Felipe, Aníbal y Leandro por sus palabras de apoyo y enorme paciencia para ayudarme y guiarme en la realización de los experimentos realizados en esta tesis.

Además, extendiendo mis agradecimientos a María Clara Jara y al Dr. Federico Bátiz del Instituto de Anatomía, histología y patología por su tiempo y ayuda con el tratamiento de muestras histológicas presentadas en este trabajo.

A Natacha y Daniela, por ser mis amigas y compañeras por más de 8 años, apoyando mis locuras y aconsejándome cuando mis decisiones son inadecuadas.

Quisiera decir gracias a mi familia. A mis padres, Ana y José, por sus años de esfuerzo e infinito amor, sin los cuales no hubiese tenido la oportunidad de llevar a cabo mis objetivos y sueños. A mis hermanos mayores, Ian, Elena, Alexia, quienes con paciencia, comprensión y cariño me han apoyado, aun si eso les significa hacer sacrificios. Las palabras y los días nunca serán suficientes para decirles gracias.

Finalmente quisiera agradecer al Instituto de Bioquímica y Microbiología, al Centro Interdisciplinario de Estudios del Sistema Nervioso (CISNe) y a la fuente de financiamiento FONDECYT 1151206 que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

1. ÍNDICE CONTENIDOS

	PÁGINA
1. ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
2. ÍNDICE DE FIGURAS	v
3. ÍNDICE DE TABLAS	vii
4. ABREVIATURAS	viii
5. RESUMEN	1
5.1 Abstract	2
6. INTRODUCCIÓN	3
6.1 Enfermedades Neurodegenerativas	3
6.2 Enfermedad de Huntington	3
6.2.1 Descripción y epidemiología	3
6.2.2 Etiología	4
6.2.3 Manifestación Clínica	4
6.2.3.1 Descripción de corea	5
6.2.4 Diagnóstico	5
6.2.5 Tratamiento	5
6.2.6 Huntingtina	6
6.2.7 Modelos animales de enfermedad de Huntington	7
6.2.7.1 Modelo YAC128	7

6.3 Vitamina C	8
6.3.1 Descripción general	8
6.3.2 Funciones biológicas	9
6.3.2.1 Ácido ascórbico en el sistema nervioso central	9
6.3.2.2 Ácido ascórbico y metabolismo energético cerebral	10
6.3.3 Ácido fosfoascórbico	13
7. HIPÓTESIS	17
8. OBJETIVOS	17
8.1 Objetivo general	17
8.2 Objetivos específicos	17
9. MATERIALES Y MÉTODOS	18
9.1 Reactivos	18
9.2 Equipos	19
9.3 Métodos	20
9.3.1 Suplementación de ratones YAC128 con ácido ascórbico y ácido 2- fosfoascórbico	20
9.3.2 Análisis de sintomatología motora en ratones YAC128	21
9.3.2.1 Ensayos rotarod	21
9.3.2.2 Ensayos footprint	21
9.4 Determinación de ácido ascórbico por cromatografía de alta resolución HPLC	22

9.4.1 Preparación de estándares de ácido ascórbico y curva de calibración	22
9.4.2 Obtención y preparación de muestras de suero y Estriado	22
9.4.3 Condiciones de detección de ácido ascórbico	23
9.4.4 Curva de calibración de ácido ascórbico	24
9.5 Preparación de tejidos	24
9.5.1 Fijación de tejidos	24
9.5.2 Deshidratación, inclusión y corte de tejidos	24
9.5.3 Desparafinación, hidratación y tinción de muestras	24
9.5.4 Inmunofluorescencia	25
9.6 Análisis estadístico	25
10. RESULTADOS	27
10.1 Evaluación de sintomatología motora en ratones YAC128 suplementados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico	27
10.1.1 Ensayos rotarod	27
10.1.2 Ensayo footprint	29
10.2 Análisis de pérdida neuronal en estriado de ratones YAC128 y controles WT	34
10.3 Determinación de ácido ascórbico en suero y estriado por cromatografía de alta resolución HPLC	36
10.3.1 Análisis de soluciones control	36

10.3.2 Preparación de estándares y curva de calibración	36
10.3.3 Determinación de ácido ascórbico en suero	41
10.3.4 Determinación de ácido ascórbico en homogeneizado de estriado	42
10.4 Evaluación toxicológica de tejido renal y hepático mediante hematoxilina & eosina	45
11. DISCUSIÓN	47
12. CONCLUSIÓN	53
13. BIBLIOGRAFÍA	54

2. ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Desarrollo de la patología en modelo YAC128.	8
Figura 2. Oxidación de ascorbato (AscH-) por dos oxidaciones sucesivas. de un electrón para formar el radical ascorbil (Asc*-) y ácido dehidroascórbico (DHA).	9
Figura 3. Estrés oxidativo y baja expresión de GLUT3 contribuyen a la falla metabólica en enfermedad de Huntington (HD).	11
Figura 4. Flujo de ácido ascórbico entre astrocitos y neuronas esta disminuido en modelo de ratón de la enfermedad de Huntington.	12
Figura 5. Estructura molecular del ácido fosfo-L-ascorbico como sal trisódica.	14
Figura 6. Ácido ascórbico inhibe el transporte de glucosa vía propiedades moleculares intrínsecas que son independientes del efecto antioxidante	15
Figura 7. Esquema del diseño experimental.	26
Figura 8. Evaluación de coordinación motora en ensayo rotarod en animales YAC128 y controles de camada (WT).	29
Figura 9. Patrones de pisadas en ensayo footprint de animales YAC128 y sus controles de camada wild type (WT) de 7-8 meses de edad.	30
Figura 10. Cuantificación de los patrones de pisadas obtenidos en el ensayo footprint a 7-8 meses de edad.	31
Figura 11. Patrones de pisadas para ensayo footprint de animales YAC128 y sus controles de camada wild type (WT) de 11-12 meses de edad.	32

Figura 12. Cuantificación de los patrones de pisadas obtenidos en el ensayo footprint en animales YAC128 y controles de camada WT de 11-12 meses de edad.	33
Figura 13. Evaluación de degeneración estriatal en ratones WT y YAC128 a 7-8 meses de edad.	35
Figura 14. Cromatogramas de los componentes presentes en las distintas soluciones para el análisis de ácido ascórbico.	38
Figura 15. Cromatogramas de las distintas concentraciones para curva de calibración ácido ascórbico a 260nm mediante HPLC.	39
Figura 16. Curva de calibración de ácido ascórbico a 260 nm mediante HPLC.	40
Figura 17. Cromatogramas para el análisis de ácido ascórbico en muestras de suero a 260 nm mediante HPLC.	41
Figura 18. Cromatogramas para el análisis de ácido ascórbico en muestras de lisado de estriado a 260 nm mediante HPLC.	43
Figura 19. Determinación de niveles de ascórbico en lisados de estriado de ratones YAC128 y controles de camada WT mediante HPLC.	44
Figura 20. Evaluación histológica de tejido hepático proveniente de ratones tratados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico.	45
Figura 21. Evaluación histológica de tejido renal proveniente de ratones tratados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico.	46

3. ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Composición fase móvil para la detección de ácido ascórbico por HPLC a 260nm.	23
Tabla 2. Ensayo de coordinación motora utilizando rotarod.	28
Tabla 3. Curva de Calibración de ácido ascórbico a 260nm mediante HPLC.	40
Tabla 4. Determinación de ácido ascórbico a partir de homogenizados de estriado de ratones YAC128 y sus controles de camada WT.	44

4. ABREVIATURAS

4-CIN: ácido alfa ciano 4 hidroxicinamico

ASC: ácido ascórbico

ATP: adenosin trifosfato

BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro

DARPP-32: fosfoproteína neuronal regulada por dopamina y AMPc

DHA: ácido dehidroascórbico

DOG: deoxiglucosa

DTT: ditioneitol

EPSC: corrientes post-sinápticas excitatorias

GLUT: transportador facilitativo de hexosas

HAP1: proteína asociada a huntingtina

HD: enfermedad de Huntington

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

IB: buffer de incubación

MCT: transportador de monocarboxilato

MSN: neuronas espinosas medias

P-ASC: ácido fosfoascórbico

PBS: solución buffer fosfato

PFA: paraformaldehído

RM: resonancia magnética

ROS: especies reactivas de oxígeno

SNC: sistema nervioso central

SVCT: transportador de vitamina C

TC: tomografía computarizada

WT: wild type

YAC: yeast artificial chromosome

5. RESUMEN

La enfermedad de Huntington es un trastorno genético caracterizado por neurodegeneración en el estriado que se manifiesta como alteraciones motoras conocidas como corea, deterioro cognitivo y demencia, progresando inevitablemente en la muerte del paciente. El ácido ascórbico, conocido ampliamente por sus propiedades antioxidantes, se encuentra en altas concentraciones en el sistema nervioso central, actuando como antioxidante y modulador del metabolismo neuronal. En modelos animales y celulares de enfermedad de Huntington se han observado alteraciones metabólicas y estrés oxidativo asociado a fallas en la homeostasis de ácido ascórbico. El ácido fosfoascórbico es un derivado estable del ácido ascórbico que posee las mismas cualidades neuromoduladoras del metabolismo neuronal, sin tener efecto antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si la administración de una mezcla de ácido fosfoascórbico/ácido ascórbico es capaz de enlentecer la progresión de la sintomatología motora de un modelo murino de enfermedad de Huntington, YAC128. Para ello se administró ácido fosfoascórbico y ácido ascórbico en dosis de 150mg/kg de cada uno dos veces por semana desde los 3 meses hasta los 12 meses de edad. Se evaluó la biodisponibilidad cerebral de ácido ascórbico mediante HPLC y la coordinación motora mediante análisis de la huella y de rotarod en animales de 7-8 y 11-12 meses de edad. En ninguno de los grupos estudiados se observó una mejora en las habilidades motoras, así como tampoco se observó un aumento en la concentración cerebral de ácido ascórbico, indicando que la vía de administración, o bien la dosis utilizada, no son adecuadas.

Adicionalmente, se realizaron estudios histológicos de hígado y riñón a partir de los cuales se descartó efectos tóxicos de la mezcla ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico en estos tejidos.

Por consiguiente, se concluye que la biodisponibilidad de ácido ascórbico cerebral es muy baja cuando se utiliza una mezcla de ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico en la dosis estudiada mediante vía peritoneal. Esto último, impide determinar el potencial terapéutico de ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico como fármacos neuroprotectores. De este modo, es imposible demostrar o refutar la hipótesis propuesta en este trabajo. Futuros estudios, considerando nuevas vías de administración, deberán ser implementados.

5.1 ABSTRACT

Huntington's disease is a genetic disorder characterized by striatal neurodegeneration, with symptomatic manifestations such as motor abnormalities known as chorea, cognitive impairment and dementia, progressing unavoidably towards death. Ascorbic acid, widely known for its antioxidant properties is highly concentrated in the central nervous system where it exerts functions as antioxidant and modulator of neuronal metabolism. The metabolic impairment and oxidative stress observed in animal and cellular models of Huntington's disease have been associated with a failure in ascorbic acid homeostasis. Phospho-ascorbic acid is an ascorbic acid analogue that lacks the antioxidant properties while maintaining the ability to modulate neuronal metabolism. The aim of the present work was to evaluate whether the administration of a mixture of ascorbic acid and phosphoascorbic acid was able to delay the progression of the motor symptomatology in a mouse model of Huntington's disease, YAC128. Ascorbic and phosphoascorbic acid were administrated at a dose of 150 mg/kg each, twice a week starting from 3 months of age until 12 months. Ascorbic acid bioavailability in the brain was analyzed through HPLC and motor tests were performed by rotarod and footprint assays at 7-8 months and 11-12 months of age. Neither improvement in motor behavior nor increase in brain ascorbic acid concentration were observed in any of the groups studied, indicating that either the administration route or the dose was not appropriate. Additionally, no toxic effects of the dose of ascorbic/phosphoascorbic acid administration were observed through histological analysis of the liver and kidney.

We conclude that the brain bioavailability of ascorbic acid is too low when a mixture of ascorbic/phosphoascorbic acid is administrated by intraperitoneal route at the dose used in this study. Therefore, we can neither confirm nor refute the proposed hypothesis. The therapeutic potential of ascorbic and phosphoascorbic acid as a neuroprotective cocktail in Huntington's disease is yet to be determined. Future studies considering new administration routes and/or dosage should be carried out.

6. INTRODUCCIÓN

6.1 Enfermedades Neurodegenerativas

El término degeneración es un concepto utilizado en el aspecto clínico y patológico para describir los procesos de muerte neuronal, pérdida de mielina y de tejidos, que conducen a degeneración estructural y funcional progresiva del sistema nervioso central. Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan tanto por la pérdida celular o daño funcional asociado a células, o sistemas; por ejemplo la corteza cerebral, sistema motor, aparato extrapiramidal, o cerebelo, los cuales son representativos de estructuras que son los objetivos de daño en esta clase de enfermedades (1). En este grupo de patologías se encuentran la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, y Huntington, las cuales han experimentado un incremento en la morbilidad y mortalidad, especialmente en países desarrollados como resultado del envejecimiento y aumento de la expectativa de vida en la población (2).

Actualmente, las terapias disponibles para estas patologías alivian la sintomatología y no están orientadas a detener el proceso neurodegenerativo subyacente. En el horizonte de los tratamientos farmacológicos, el objetivo es prevenir o retrasar el proceso de neurodegeneración (3).

6.2 Enfermedad de Huntington

6.2.1 Descripción y epidemiología

La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo de carácter hereditario caracterizado por la aparición de movimientos involuntarios debilitantes (4), conocidos como “corea”, disfunción psiquiátrica y cognitiva, el cual progresa inexorablemente a discapacidad y posteriormente la muerte (5). El nombre de esta enfermedad conmemora los estudios realizados por el médico George Huntington, quien en su trabajo publicado en 1872 dio una descripción concisa y gráfica de la patología basado en los estudios llevados a cabo previamente por su padre y abuelo en East Hamptom, Long Island (1).

Este trastorno tiene lugar a lo largo del mundo en todos los grupos étnicos y su tasa de prevalencia es de aproximadamente 10 a 13 por 100.000 habitantes (6). Usualmente los síntomas no aparecen hasta la adultez, edad en la cual estos pacientes han, a menudo, formado sus propias familias, traspasando la enfermedad de generación en generación (7). A pesar de que el comienzo de la

enfermedad se manifiesta usualmente entre los 35 y 45 años, una forma infantil está presente en algunas ocasiones y también es pesquizable en individuos adultos mayores (5).

6.2.2 Etiología

La enfermedad de Huntington es causada por una repetición trinucleotídica “CAG” expandida en el gen IT15 del cromosoma 4, también conocido como HTT, el cual codifica para la proteína Huntingtina (8). La expansión del triplete CAG ocasiona la expresión de Huntingtina mutante la cual contiene una secuencia de glutamina anormalmente larga (6). En sujetos sanos esta secuencia varía entre las 9 y 37 repeticiones, mientras que individuos con síntomas de la enfermedad de Huntington poseen más de 40. Se ha observado que la edad de aparición de la sintomatología se correlaciona con el número de repeticiones directamente (7), es decir, cuanto más larga es la repetición, más temprana es la edad de aparición de la enfermedad (4).

Huntingtina mutante exhibe propiedades tóxicas que ocasionan disfunción y muerte neuronal (6), especialmente en el núcleo caudado, el putamen (estriado) y la corteza cerebral (9). Se ha observado que esta proteína mutante forma agregados en el núcleo de las neuronas, acumulándose preferentemente en células del estriado y zonas de la corteza cerebral. Sin embargo, la situación parece ser más compleja al encontrarse la mayor parte de los depósitos de huntingtina en neuronas corticales, mientras que la pérdida neuronal es predominante en estriado (1).

6.2.3 Manifestación clínica

La sintomatología en la enfermedad de Huntington suele comenzar entre los 30 y 55 años, aunque un 5-10% de los pacientes presentan un inicio antes de los 20 correspondiente a Huntington juvenil, así mismo algunos pacientes comienzan a manifestar la enfermedad a edades más tardías. Los síntomas comprenden una combinación de trastornos del movimiento, alteraciones psiquiátricas y deterioro cognitivo. Al principio, el trastorno de movimiento predominante es corea, que más tarde es acompañado de parkinsonismo y distonia. Entre las manifestaciones psiquiátricas se encuentran cambios de personalidad, impulsividad, comportamiento agresivo, depresión y psicosis paranoide. Los cambios cognitivos tienen como resultado una “demencia subcortical” progresiva con un trastorno de la atención, concentración, capacidad de juicio y resolución de problemas (9).

6.2.3.1 Descripción de corea

Entre los movimientos de tipo involuntario que son típicos de la sintomatología de esta enfermedad encontramos aquellos denominados corea (4), proveniente de la palabra griega para danza, *chorus* (10). El término corea denota espasmos musculares de tipo rápido e irregulares que ocurren involuntaria e imprevisiblemente en diferentes partes del cuerpo (7), y que a menudo cambian de una parte a otra en una secuencia impredecible (9). Los movimientos coreiformes son frecuentes y se asemejan a fragmentos de movimientos normales voluntarios (4) por lo cual los pacientes pueden incorporarlos dentro de éstos para enmascararlos (9).

6.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico se basa en la historia clínica del paciente y la comprobación de una transmisión vertical de herencia autosómica dominante. Las pruebas de neuroimagen (TC y RM) ponen en manifiesto atrofia del núcleo caudado y de la corteza cerebral. La confirmación de enfermedad de Huntington, así como el diagnóstico presintomático pueden efectuarse mediante técnicas de genética molecular que demuestran la expansión patológica del triplete CAG en el gen IT15 (11)

6.2.5 Tratamiento

El tratamiento permite aliviar algunas manifestaciones, pero no retrasa la aparición ni la progresión de los síntomas. Los únicos fármacos que se han demostrado eficaces en el control de la corea son los antagonistas de dopamina (neurolépticos) y los inhibidores del almacenamiento y liberación de la dopamina como tetrabenazina y reserpina (11). El antagonista de dopamina haloperidol, en dosis diarias de 2-10 mg es efectiva parcialmente en suprimir las alteraciones del movimiento, pero debido al riesgo de discinesia tardía debería utilizarse en dosis pequeñas, solo si el trastorno es funcionalmente incapacitante. Fármacos como reserpina y tetrabenazina suprimen la corea en cierto grado pero sus efectos secundarios usualmente sobrepasan sus efectos deseados. Las consecuencias sociales y psicológicas requieren terapia. El uso de antidepresivos es ampliamente indicado por la alta incidencia de depresión y suicidio, pero su eficacia no es clara (1).

6.2.6 Huntingtina

La proteína huntingtina con un número normal de 23 repeticiones contiene un total de 3.144 aminoácidos, con un peso molecular de 348 kDa. Huntingtina es una proteína que posee múltiples funciones, incluyendo su rol en el desarrollo del sistema nervioso, su función como integrador del tráfico vesicular, regulador de la expresión génica, su habilidad de influenciar la producción y transporte de BDNF (brain-derived neurotrophic factor), y adhesión celular. La pérdida de modulación de huntingtina normal en respuesta a la expansión de la repetición de polyQ podría tener también un rol en la enfermedad de Huntington. Por otro lado al ser una enfermedad de ganancia de función tóxica, las nuevas actividades de huntingtina traídas por la expansión de polyQ deben estar de alguna manera asociadas a las alteraciones en la estructura de la proteína (12) (6). Sin embargo, el alcance de los efectos provenientes de la pérdida de función versus el fenotipo de ganancia de función aún no es claro (12).

Huntingtina se asocia con una variedad de organelos, incluyendo el núcleo, retículo endoplasmático, complejo de Golgi, vesículas sinápticas y mitocondria (13). Huntingtina exhibe un alto número de dominios de interacción proteína-proteína, encontrándose hasta el momento que interactúa con más de 200 proteínas (12). Existen estudios que han identificado las funciones de proteínas que interactúan con huntingtina. Según dichos estudios, estas proteínas pueden ser agrupadas como proteínas que están involucradas en la transcripción, en señalización intracelular, tráfico, endocitosis y metabolismo. La identificación de estas proteínas sugiere que huntingtina podría funcionar como una proteína de andamiaje involucrada en orquestar conjuntos de proteínas para procesos de señalización celular y transporte (13).

Un gran número de proteínas que interactúan con huntingtina participan en el tráfico axonal basado en microtúbulos. La proteína asociada a huntingtina 1 (HAP1) ayuda a mediar las interacciones entre huntingtina, proteínas motoras microtubulares y sus cofactores, incluyendo kinesina, dineína y dineína. En ratones knock-out condicionales para huntingtina el tráfico vesicular y mitocondrial está alterado en ambas direcciones, y se observa degeneración cerebral progresiva (12).

6.2.7 Modelos animales de enfermedad de Huntington

Dentro del conjunto de animales utilizados en el estudio de sistemas biológicos el ratón de laboratorio es uno de los preferidos en el área dada sus características únicas. A nivel anatómico, bioquímico, celular y molecular el ratón comparte características con el humano, así mismo como funciones cerebrales, por lo cual muchos análisis emplean modelos murinos con el objetivo de obtener una aproximación del comportamiento humano bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, y para el desarrollo de intervenciones terapéuticas o toxicológicas (14).

En el estudio de la enfermedad de Huntington el escenario no es diferente. Posterior al descubrimiento de la mutación responsable de la enfermedad muchos estudios fueron vinculados a la búsqueda de modelos que representen el curso de la patología, siendo por lejos el ratón el más comúnmente utilizado para el modelamiento de esta enfermedad. Hasta la fecha se han diseñado a lo menos 20 modelos entre los que destacan el R6/2, N171-Q82, BACHD, Hdh150 y YAC128 (15)

6.2.7.1 Modelo YAC128

El ratón YAC128 es un modelo de la enfermedad de Huntington diseñado a partir de un cromosoma artificial de levadura, el cual expresa una forma completa de huntingtina humana con 128 repeticiones de la secuencia CAG. Este modelo desarrolla anormalidades motoras y atrofia cerebral asociado a la pérdida estriatal (16). En la caracterización del fenotipo conductual de ratones YAC128 se ha descrito que presentan diferencias en el ensayo rotarod a los 4 meses de edad (figura 1), donde los animales wild type (WT) poseen la habilidad de permanecer en el cilindro rotatorio por mayor tiempo que los transgénicos, igualmente los últimos presentan déficit cognitivo al ser sometidos al ensayo del laberinto de agua de Morris (17).

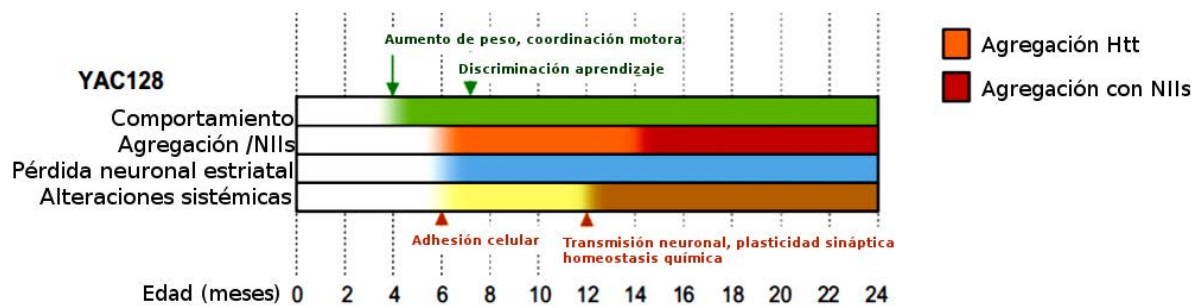


Figura 1. Desarrollo de la patología en modelo YAC128. La figura muestra los distintos puntos de inicio para el fenotipo conductual, formación de agregados de huntingtina e inclusiones neuronales intranucleares (NIIs), pérdida estriatal y anormalidades sistémicas (Extraído y modificado de Brooks *et al.* 2012).

6.3. Vitamina C

6.3.1 Descripción general

El término vitamina C es usado comúnmente para describir a todos los compuestos que exhiben cualitativamente la actividad biológica de ácido ascórbico (19) ya sea completa o parcialmente (20). La vitamina C es una lactona de seis carbonos sintetizada a partir de glucosa en el hígado de la mayoría de los mamíferos, con la excepción de humanos, primates no humanos y conejillos de india. Consecuentemente, cuando los humanos no consumen vitamina C a partir de la dieta se presenta un estado de deficiencia que ocurre con un amplio espectro de manifestaciones clínicas (21). El resultado de la deficiencia de esta vitamina es el escorbuto, cuyos síntomas primarios son hemorragia en las encías, piel, hueso y articulaciones, y alteraciones en la cicatrización. Estos son acompañados por apatía, malestar y otros efectos en el comportamiento. El escorbuto es una condición letal si no es tratada apropiadamente (21).

El principal compuesto natural con actividad de vitamina C es el L- ácido ascórbico (19). El ácido L- ascórbico es soluble en agua y a pH fisiológico más del 99% de éste se encuentra en su forma desprotonada, como L-ascorbato (22) (23), el que puede donar un átomo de hidrógeno para producir el radical ascorbil. Este radical estabilizado por resonancia puede donar un segundo electrón para formar el segundo producto de oxidación de ascorbato, el ácido dehidroascórbico (DHA) (22).

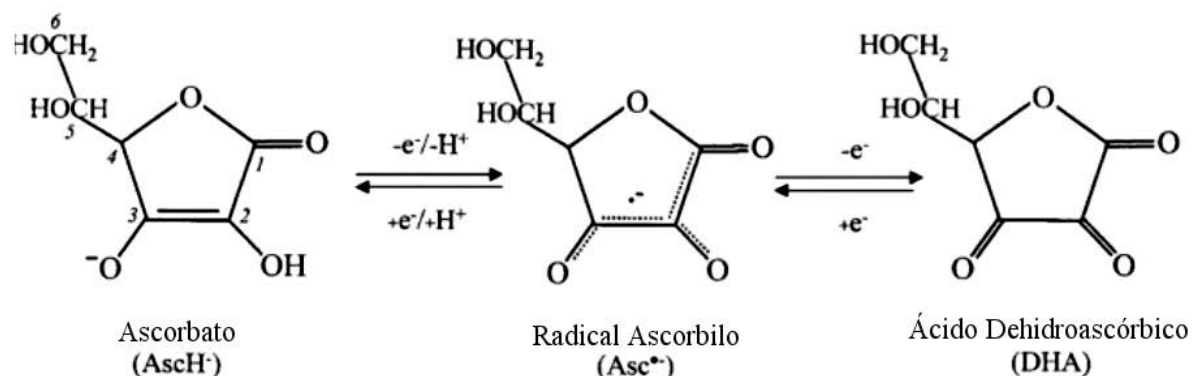


Figura 2. Oxidación de ascorbato (AscH⁻) por dos oxidaciones sucesivas de un electrón para formar el radical ascorbilo (Asc^{•-}) y ácido dehidroascórbico (DHA). El ácido L-ascórbico es ionizado a ascorbato, el cual puede donar un átomo de hidrógeno (H + e⁻) para producir el radical ascorbilo, estabilizado por resonancia, que puede donar un segundo electrón para formar ácido dehidroascórbico (DHA), o dismutar para generar ácido ascórbico y DHA (Extraído y modificado de Balz *et al.* 2003).

El ácido dehidroascórbico posee completa actividad de vitamina C pues es reducido a ácido ascórbico en el cuerpo (19) por al menos tres vías enzimáticas, dependientes e independientes de glutathione. Sin embargo, la reducción en humanos es solo parcial, por lo que no todo el ácido ascórbico oxidado es recuperado (21).

6.3.2 Funciones biológicas

Las funciones fisiológicas del ácido ascórbico están relacionadas principalmente con su eficacia como agente reductor o dador de electrones (22). Además de su rol previniendo el escorbuto, una de las funciones más claras de esta vitamina es modular un número importante de reacciones enzimáticas (20). En humanos, el ácido ascórbico actúa como un dador de electrones para ocho diferentes enzimas, de las cuales tres participan en la hidroxilación del colágeno, dos son necesarias para la síntesis de carnitina, esencial para el transporte de ácidos grasos en la mitocondria para la generación de ATP, y de las tres restantes una participa en la biosíntesis de noradrenalina y dopamina, una incorpora grupos amida a hormonas peptídicas, y la última modula el metabolismo de la tirosina (21). Adicionalmente el ácido ascórbico es un importante antioxidante que puede reducir o eliminar superóxido, radical hidroxilo y otros radicales libres (20). Un antioxidante es

definido como “una sustancia que, presente a bajas concentraciones comparada con aquellas de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previene la oxidación de ese sustrato”. Muchas propiedades hacen de esta vitamina un antioxidante ideal en sistemas biológicos (22).

6.3.2.1 Ácido ascórbico en el sistema nervioso central

En nuestro cuerpo, la captura y distribución de ácido ascórbico está bajo un estrecho control homeostático siendo regulado primariamente por co-transportadores específicos dependientes de sodio (SVCT) 1 y 2. Dentro del organismo, el ácido ascórbico posee una farmacocinética no lineal, y una distribución diferencial en tejidos, lo cual incluye al cerebro que es capaz de retener preferencialmente vitamina C a expensas de otros órganos durante estados crónicos de deficiencia de esta molécula. Debido a la alta tasa de metabolismo, el cerebro es vulnerable a daño oxidativo, por lo que ácido ascórbico juega un rol crucial como antioxidante. Una serie de enfermedades a este nivel como Alzheimer y Huntington han sido asociadas a un desequilibrio redox (24).

El principal transportador de ácido ascórbico por las neuronas es SVCT2 (25), cuya expresión también se correlaciona con un metabolismo incrementado, y por lo tanto la formación de especies reactivas de oxígeno y requerimiento neuronal de antioxidante (24).

6.3.2.2 Ácido ascórbico y metabolismo energético cerebral

En un adulto el cerebro comprende el 2% de la masa corporal y utiliza el 25% (en reposo) del consumo de energía corporal, de la cual el 80% es utilizado para actividad neuronal. Esto hace del cerebro un órgano costoso en términos energéticos. Glucosa es una fuente esencial de energía para el cerebro. Ante ligeras disminuciones en los niveles de glicemia se evidencia deterioro cognitivo y confusión (26). Utilizando tomografía de emisión de positrones y [¹⁸F] fluorodeoxyglucosa en pacientes con enfermedad de Huntington se observó una marcada reducción del metabolismo de glucosa en el núcleo caudado en los sujetos sintomáticos (27).

Por largo tiempo se postuló que el consumo energético cerebral dependía únicamente de glucosa, sin embargo, evidencia señala que durante sinapsis glutamatérgicas las neuronas consumen preferentemente lactato liberado desde la glía, como resultado de la participación de un *switch* metabólico modulado por vitamina C en periodos de activación y reposo. Para que dicho *switch*

ocurra es necesario el flujo de ácido ascórbico (vitamina C reducida) entre neuronas y astrocitos (26).

Durante la activación de la vía corticoestriatal, glutamato es liberado al espacio sináptico donde es captado por los astrocitos, estimulando la liberación de lactato y ácido ascórbico desde estos. Las neuronas, que expresan SVCT2 toman el ácido ascórbico para atrapar los radicales libres generados en la neurotransmisión. A su vez dentro de las neuronas, el ácido ascórbico inhibe el consumo de glucosa por inhibición de GLUT3 (28) y estimula la captura de lactato por transportadores de monocarboxilato 2 MCT2 (Figura 3A) (26).

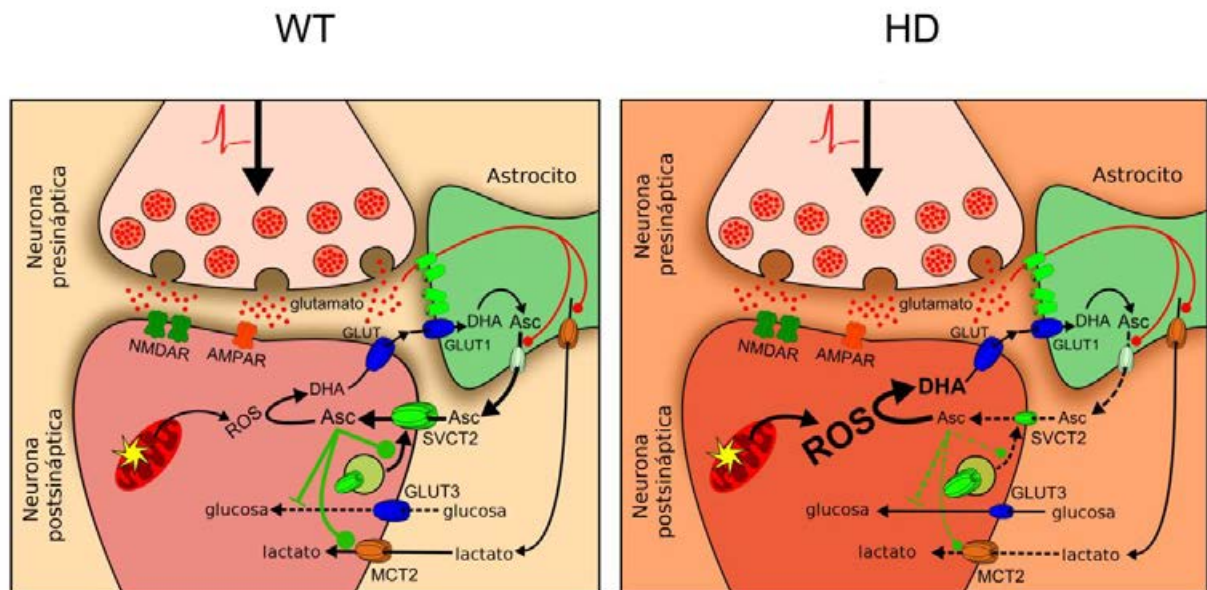


Figura 3. Estrés oxidativo y baja expresión de GLUT3 contribuyen a la falla metabólica en enfermedad de Huntington (HD). A) Durante activación de la vía corticoestriatal glutamato es liberado al espacio sináptico. Los astrocitos rodeando el espacio sináptico toman el glutamato, el cual estimula la salida de lactato y ácido ascórbico desde estas células. Las neuronas captan el ácido ascórbico vía transportador de ácido ascórbico SVCT2. El ácido ascórbico intracelular es utilizado para mantener el balance redox dentro de las neuronas. La actividad sináptica produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que son reducidas por el ácido ascórbico, el cual también inhibe la captura de glucosa por inhibición específica de GLUT3 y estimula el transporte de lactato. B) La liberación de ácido ascórbico desde astrocitos y captación de ácido ascórbico está alterada en enfermedad de Huntington, promoviendo la disminución en la concentración intracelular neuronal de ácido ascórbico y desbalance redox. El ácido ascórbico es

secuestrado para actuar más como antioxidante que modulador metabólico. La disminución en la expresión de GLUT3 en la membrana en células con enfermedad de Huntington contribuye a la falla metabólica (29).
Extraído y modificado de Covarrubias-Pinto, *et al.*, 2015

Evidencia en modelos animales de enfermedad de Huntington han demostrado que ocurre un deterioro en el flujo de ácido ascórbico entre astrocitos y neuronas, el cual precede la aparición de los síntomas y un impedimento en la captura neuronal de ácido ascórbico. Adicionalmente en modelos celulares se evidenció una disminución en la colocalización de SVCT2-HAP1 e impedimento del transportador SVCT2 para alcanzar la membrana plasmática (Figura 4) (30).

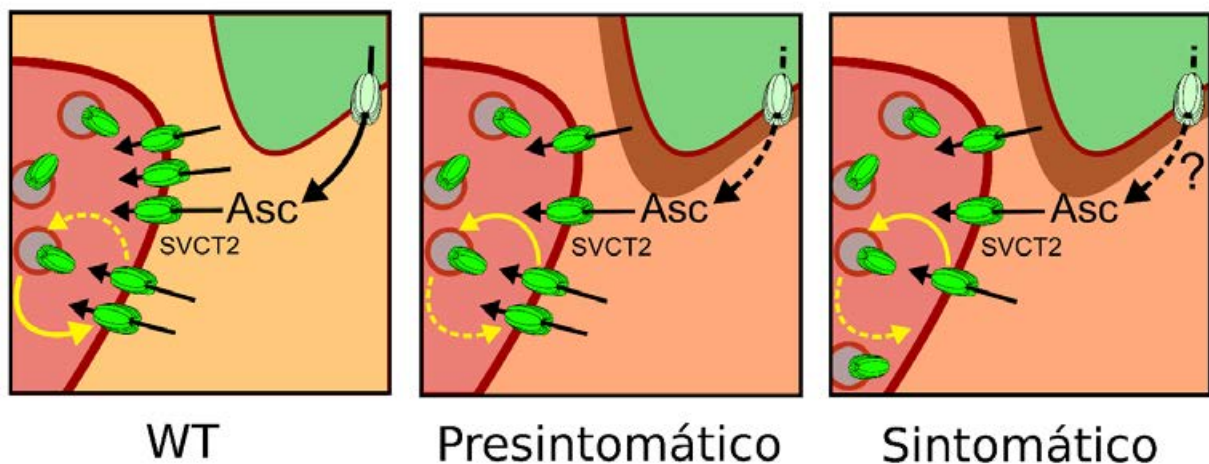


Figura 4. Flujo de ácido ascórbico entre astrocitos y neuronas esta disminuido en modelo de ratón de la enfermedad de Huntington. SVCT2 cicla constantemente hacia y desde la membrana plasmática. Cuando los astrocitos liberan ácido ascórbico, el incremento en la concentración en el extracelular induce una disminución en la endocitosis de SVCT2, incrementando el transportador en la membrana. En ratones HD en estadio pre-sintomático de la enfermedad se observa una falla en la liberación de ácido ascórbico desde células gliales. En contraste, en estadios sintomáticos se observa una falla en la translocación de SVCT2 a la membrana (30). Extraído y modificado de Acuña *et al.*, 2013.

Bajo condiciones de estrés oxidativo en enfermedad de Huntington, ácido ascórbico puede ser consumido, por lo cual no hay disponibilidad de éste para actuar como modulador metabólico (glucosa-lactato) (Figura 3B) (31, 32).

Estudios ex vivo, realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la suplementación con ácido ascórbico es capaz de revertir las deficiencias neuronales en modelos de enfermedades neurodegenerativas (30), lo que se observa como una restauración de la falla metabólica y una disminución del estrés oxidativo (29). Con estos resultados la administración de ácido ascórbico para prevenir la sintomatología de enfermedades neurodegenerativas aparece como una estrategia terapéutica atractiva. Si bien los resultados son alentadores, ensayos clínicos randomizados para la prevención de déficit cognitivo y enfermedades neurodegenerativas no han sido capaces de confirmar el beneficio de la suplementación y/o intervención con ácido ascórbico (24). Adicionalmente, los estudios realizados en modelos animales por Rebec y colaboradores (33) demostraron que el tratamiento con ácido ascorbico atenúa el fenotipo conductual en enfermedad de Huntington. Sin embargo, aun si el uso de ácido ascórbico para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas puede parecer prometedor, resultados obtenidos en estudios clínicos en pacientes con enfermedad de Parkinson (34-36) y esclerosis lateral amiotrófica (37) no han demostrado que el ácido ascórbico sea una herramienta beneficiosa en el tratamiento de estas enfermedades.

La modestia de estos resultados podría estar asociada a una baja biodisponibilidad de ácido ascórbico en el sistema nervioso pues si bien el ácido ascórbico, adquirido exclusivamente a través de la dieta, es capaz de alcanzar el tejido cerebral, la mayor parte es metabolizado y eliminado por la orina (22).

6.3.3 Ácido Fosfoascórbico

Existe un derivado no tóxico de ácido ascórbico, el ácido fosfoascórbico (Figura 5), que presenta alta estabilidad (38) y carece de actividad antioxidante (29). Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el ácido fosfoascórbico es capaz de aumentar la captación de ácido ascórbico por las células nerviosas y de modular el metabolismo neuronal por propiedades intrínsecas del ácido ascórbico que son independientes de su capacidad antioxidante (29).

Para evaluar el efecto intracelular de fosfoascorbato y ácido ascórbico en la habilidad de glucosa de sostener la actividad sináptica, consecuencia de la modulación en la captura de glucosa, se realizaron experimentos usando ya sea ácido ascórbico o fosfoascorbato junto a un anticuerpo anti SVCT2. Ambos fueron capaces de inhibir la capacidad de glucosa de mantener respuestas sinápticas. En concordancia con aquellos resultados, fosfoascorbato fue capaz de inhibir la captura de ^3H -deoxiglucosa (DOG) en la misma medida que el ácido ascórbico en células Q7 (control WT).

Sin embargo, fosfoascorbato inhibió la captura de DOG en células Q111 (modelo celular de HD) mientras ácido ascórbico no fue capaz de modularla en estas células (Figura 6).

En este contexto, la administración de ácido fosfoascórbico parece una propuesta interesante, pues permitiría aumentar la biodisponibilidad cerebral de ácido ascórbico, disminuyendo el estrés oxidativo y corrigiendo la falla metabólica que se observa en enfermedades neurodegenerativas.

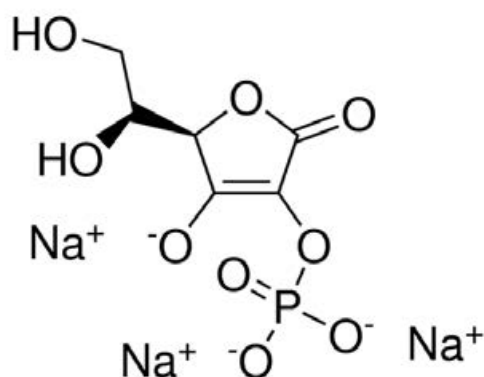


Figura 5. Estructura molecular del ácido fosfo-L-ascórbico como sal trisódica. A diferencia del ácido ascórbico, uno de los hidroxilos unido al anillo lactona ha sido remplazado por un grupo fosfato.

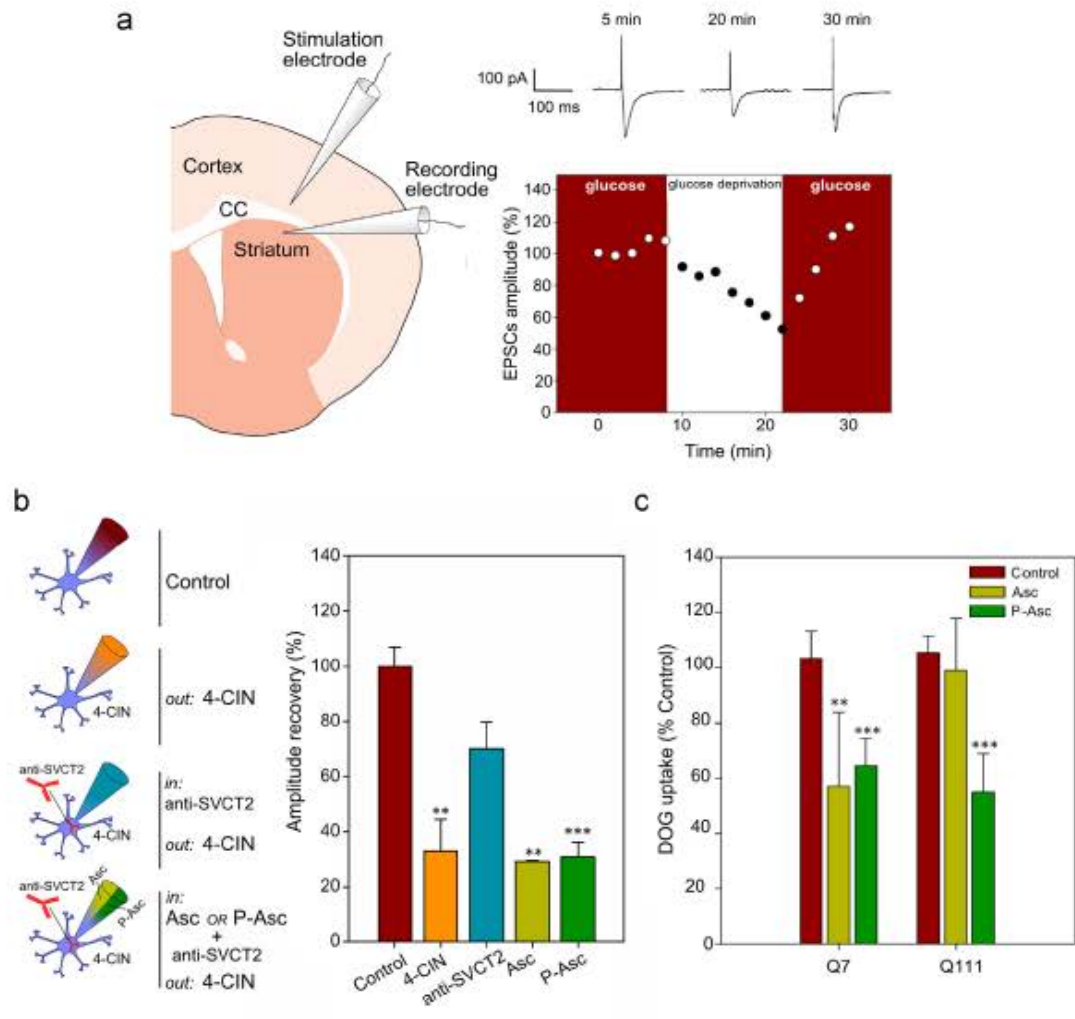


Figura 6. Ácido ascórbico inhibe el transporte de glucosa vía propiedades moleculares intrínsecas que son independientes del efecto antioxidante. a) Esquema del montaje experimental mostrando la posición del electrodo de estimulación en el cuerpo calloso (CC) y el electrodo de registro en el estriado dorsolateral. Tiempo de curso de las amplitudes de las corrientes post-sinápticas excitatorias (EPSC) en experimento control (con y sin glucosa) a). EPSC representativa de una rebanada con privación de glucosa. Barra de calibración: 100 pA, 100ms b) Representación esquemática del experimento usando la configuración patch clamp para la célula completa. Durante el registro ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico, y anticuerpo anti SVCT2 fueron incorporados a la pipeta, mientras que 4-CIN, inhibidor del transporte de lactato, fue incorporado al medio extracelular. La gráfica muestra la amplitud de EPSC después de la privación de glucosa (recuperación de la amplitud) con el tratamiento indicado. Análisis de varianza (ANOVA) seguido por Bonferroni post test, $n=3$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$. c) Análisis de transporte de ^3H -deoxiglucosa (DOG)

usando ensayo de captura de 10 segundos (37°C) en células Q7 (expresando Huntingtina WT) y Q111 (expresando Huntingtina mutante). Las células fueron pre-incubadas por 1 hora con ácido ascórbico (Asc) 1mM, ácido fosfoascórbico (P-Asc) 1mM o IB-DTT (Control). Análisis de varianza (ANOVA) seguido por Bonferroni post test, n = 3, ***p<0.001, **<0.01. (29). Extraído y modificado de Covarrubias-Pinto, *et al.*, 2015

7. HIPÓTESIS

La administración conjunta de ácido ascórbico y ácido fosfoascorbico retarda la aparición de los síntomas motores en el modelo murino de enfermedad de Huntington, YAC128.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo general:

Investigar si la administración conjunta de ácido ascórbico 150mg/kg y ácido fosfoascorbico 150mg/kg retarda la aparición de la sintomatología motora en modelo murino de enfermedad de Huntington (YAC128).

8.2 Objetivos específicos:

- 1.- Evaluar el fenotipo motor en modelo murino YAC128 suplementados con ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico por ensayos rotarod y ensayo de la huella, *footprint*.
- 2.- Evaluar el efecto neuroprotector de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico en el estriado de ratones YAC128 mediante análisis de inmunofluorescencia
- 3.- Evaluar la biodisponibilidad de ácido ascórbico en plasma y homogeneizado de estriado de animales tratados con ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- 4.- Evaluar mediante ensayos histoquímicos los posibles efectos tóxicos del ácido fosfoascórbico en tejido hepático y renal.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 REACTIVOS

De Sigma Chemical Co. se obtuvieron los siguientes reactivos: D-(+)-glucosa, Tritón X-100, paraformaldehído, L-ácido ascórbico, ascorbato oxidasa, ácido 2-fosfo-L ascórbico.

De Merk & Co, Inc. (Alemania) se obtuvieron los siguientes reactivos: cloruro de potasio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, alcohol etílico, hidróxido de sodio, ácido fórmico.

De Winkler Ltda. se adquirió albúmina de suero bovino (BSA), Tris, carbonato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, reactivo de Bradford.

De Santa Cruz Biotechnology se obtuvieron los anticuerpos DARPP-32 sc-135877.

De ThermoScientific se adquirió anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa fluor 488.

De J.T. Baker se adquirió acetonitrilo.

De Filtergroup SpA se adquirieron filtros de jeringa PTFE de 0,22 μ m x 13 mm.

De Membrane Solutions se adquirieron filtros de jeringa estériles PES 0,22 μ m x 13 mm.

De DAKO se adquirió medio de montaje para fluorescencia.

De Calbiochem, EMD Chemicals Inc, se adquirió Tween 20.

De US biological se adquirió HEPES libre de ácido.

De Fresenius Kabi se adquirió cloruro de sodio 0,9%, solución parenteral endovenosa estéril y apirógena.

De MedicalTek se adquirieron jeringas 1 cc 30g 5/16 8 mm.

De Laboratorio Drag Pharma se adquirió ketamina solución inyectable 10%.

De Centrovét se adquirió xilazina solución inyectable 2%.

9.2 EQUIPOS

pH metro WTW Inolab pH720, balanza precisa AND GR-200, gabinete de cultivo NuairTM class II UN-426-600-E, baño termoregulado Memmert, centrifuga SIGMA 2-16PK, sonicador Ultrasonic Homogeneizer 4710 Cole Parmere instruments Co, HPLC Agilent Technologies 1200 Series con arreglo Diodos Agilent Tech G1365D, Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (5 μ m, 4.6 x 150 mm), Microtomo Kadee KD- ,Freezer -80°C Forma Scientific Bio-freezer 8425, Freezer -20°C Consul, refrigeradores Fensa y Whirlpool, Rotarod Ugo Basile 47600, Microscopio confocal FluoView 1000 (Olympus).

9.3 MÉTODOS

9.3.1 SUPLEMENTACIÓN DE RATONES YAC128 CON ÁCIDO ASCÓRBICO Y ÁCIDO 2-FOSFOASCÓRBICO

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo al “Manual de normas de bioseguridad” de CONICYT del año 2008 y las guías establecidas por el comité de protección animal de la Universidad Austral de Chile. Los animales fueron obtenidos de crías macho de ratones FVB-YAC128 (*The Jackson Laboratory*, Sacramento, California, USA número 004938), así mismo como sus respectivos controles de camada. La colonia inicial en *background* FVB fue retrocruzada obteniéndose ratones YAC128 en *background* C57 puro. Estos fueron mantenidos en las instalaciones del Laboratorio de Bioseguridad para experimentación animal (Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile) en un ambiente con un ciclo 12:12 de luz: oscuridad, alimentados con pellet Prolab RMH 3000 y agua *ad libitum*. El genotipo fue determinado mediante PCR según protocolo descrito por *The Jackson Laboratory*.

Para los fines de este trabajo se utilizaron 4 grupos en estudio (YAC128, y control Wild Type (WT) suplementados con una mezcla ácido L-ascórbico/ácido 2-fosfoascórbico y cloruro de sodio 0,9%) considerando un número de 8 animales por grupo. Los ratones fueron suplementados por vía intraperitoneal con una solución de L-ascórbico/ácido 2-fosfoascórbico en cloruro de sodio 0,9% en una dosis de 150mg/kg de cada compuesto, con una régimen de administración de 2 veces por semana (Lunes y Jueves entre las 16:30 y 18:30 hrs a partir de los tres meses de edad).

Para evaluar la progresión de los síntomas de la enfermedad, se utilizaron dos grupos de edad para la realización de experimentos, correspondientes a una etapa previa a la aparición de los síntomas o pre-sintomáticos (7-8 meses) y sintomáticos (11-12 meses). El protocolo de la actividad fue elegido de acuerdo a los estudios realizados por Rebec *et al.*, quienes observaron mejoría del comportamiento motor en ratones R6/2 suplementados únicamente con ácido ascórbico 300mg/kg.

Los animales fueron anestesiados con xilazina/ketamina en dosis 10 mg/kg y 100 mg/kg respectivamente, para la recolección de órganos y fluidos. Los restos de los animales sacrificados en este estudio fueron almacenados a -20°C y eliminados por el personal del Departamento de Administración Ambiental (PAAC) de la Universidad Austral de Chile para ser incinerados posteriormente.

9.3.2 ANÁLISIS DE SINTOMATOLOGÍA MOTORA EN RATONES YAC128

9.3.2.1 Ensayos Rotarod

Los estudios de coordinación motora en ratas y ratones han sido tradicionalmente realizados por el test Rotarod, en el cual el animal es situado en una barra horizontal que rota alrededor de su eje longitudinal. En ésta el animal debe caminar hacia adelante para permanecer en posición vertical y no caer (39). El tiempo que el animal es capaz de mantenerse sobre el cilindro rotatorio o latencia de caída entrega una medida de su coordinación motora (40).

Para este ensayo, los ratones fueron entrenados en el equipo por un periodo de 3 días, con 3 ensayos diarios (2 horas entre ensayos). La recolección de datos fue llevada a cabo al cuarto día. Los animales fueron ambientados a la habitación por 15 minutos. Los parámetros del experimento fueron los siguientes: velocidad máxima (45rpm), tiempo máxima velocidad (120seg) tiempo de “no caída” (600seg) y velocidad de inicio (5rpm) (41).

9.3.2.2 Ensayos de la huella o *footprint*

El test footprint es uno de los métodos utilizados comúnmente en ratones para evaluar anormalidades en la marcha. En este ensayo las patas delanteras y traseras son teñidas con pintura no tóxica de distintos colores. El animal fue incentivado a caminar en línea recta sobre un papel blanco por un pasillo de 80 x 8 cm. en el que se registran los patrones de huella. Estos fueron analizados por un rango de medidas en las que se incluyen: longitud del paso, ancho de base trasera y delantera y superposición de patas traseras y delanteras (40, 42). Para la ejecución de este análisis, las patas delanteras y traseras fueron sumergidas en tinta roja y azul respectivamente. Los ratones fueron entrenados a caminar por el laberinto el día previo a la realización del ensayo.

9.4 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO POR CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

9.4.1 Preparación de estándares de ácido ascórbico y curva de calibración.

Para la preparación del estándar de ácido ascórbico se preparó 1ml de 100mM del analito en una solución buffer de incubación (IB)-DTT 1 mM. Los estándares a distintas concentraciones para la realización de la curva de calibración (10uM, 50uM, 100uM, 150uM, 200uM, 250uM) fueron obtenidos a partir de diluciones seriadas en IB-DTT 0,1mM del estándar de 100mM.

9.4.2 Obtención y preparación de muestras de suero y estriado.

Para muestras de suero se recolectó sangre por medio de punción cardiaca. Las muestras de sangre fueron almacenadas a 4°C reposando para la formación del coagulo. Posteriormente fueron centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C para la obtención del suero. Se adicionó DTT 100mM (ditiotreitól) a 1mM de concentración final para evitar la oxidación de ácido ascórbico. A continuación las muestras fueron tratadas con 10% de ácido metafosfórico para precipitación de proteínas.

Para la obtención de estriado los animales fueron decapitados inmediatamente luego de la punción cardiaca. Los cerebros fueron extraídos, lavados en ACSF frio y biseccionados en hemisferios cerebrales. El tejido estriatal proveniente de un hemisferio cerebral fue depositado en 300 uL de buffer de lisis (300mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 0,5% Triton X-100) y DTT 1mM reposando por 15 minutos. El tejido fue homogeneizado y luego sonicado por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10000g por 10 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante del cual se tomó una alícuota a la cual se adicionó inhibidor de proteasas, para posterior determinación de proteínas. Luego se realizó la precipitación de proteínas utilizando 50 uL de ácido metafosfórico 10%.

Las muestras de suero y homogeneizado de estriado fueron almacenadas a -80°C para posterior centrifugación a 10,000 g por 10 minutos a 4°C, filtradas por un filtro de 0.2 um, y detección de ácido ascórbico por HPLC.

9.4.3 Condiciones de detección de ácido ascórbico

Las concentraciones de ácido ascórbico en suero y homogeneizado de estriado fueron determinadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna Eclipse XDB-C18 (5µm, 4.6 x 150 mm: Agilent Technologies). La detección de ácido ascórbico fue realizada siguiendo un gradiente: fase móvil A: 0,1 % ácido fórmico en agua; fase móvil B: 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo), con los siguientes tiempos de elusión: 7 minutos 100% de A, luego 10 minutos 50% de A y 50% de B, 2 minutos 5% de A y 95% de B y finalmente 6 minutos de A. Tiempo total de corrida de 25 minutos. La velocidad de flujo será de 0,40 ml/min y el volumen de inyección de 100 µL. La longitud de onda UV para la determinación de ácido ascórbico fue de 260 nm (53).

Tabla 1. Composición fase móvil para la detección de ácido ascórbico por HPLC a 260nm.

<i>Tiempo elusión</i>	<i>%A</i>	<i>%B</i>
Minuto 0-7	100%	0%
Minuto 7-17	50%	50%
Minuto 17-19	5%	95%
Minuto 19-25	100%	0%

Gradiente de concentración de los distintos solventes utilizados como fase móvil para el método de detección de ácido ascórbico. Fase móvil “A” corresponde a 0,1% ácido fórmico en agua, “B” corresponde a 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo

9.4.4 Curva de calibración ácido ascórbico

Para cuantificación de ácido ascórbico presente en las muestras de suero y estriado se realizó una curva de calibración a partir de un estándar de concentración 100mM de ácido ascórbico en buffer de incubación (IB)- DTT 1mM. Los estándares (10uM, 50uM, 100uM, 150uM, 200uM, 250uM) fueron obtenidos a partir de diluciones seriadas en IB-DTT 0,1mM del estándar de 100mM.

9.5 PREPARACIÓN DE TEJIDOS

9.5.1 Fijación de tejidos

Con el fin de evaluar muerte neuronal (disminución de neuronas) en estriado y la posible toxicidad del ácido fosfoascórbico se recolectaron muestras de cerebro, riñón e hígado. Para ellos los órganos fueron extraídos y fijados inmediatamente por inmersión en paraformaldehído 4% en PBS, pH 7.4 por 24 horas.

9.5.2 Deshidratación, inclusión y corte de tejidos

Las muestras provenientes del fijados fueron trasladadas a Etanol de 70% para luego ser deshidratadas en una batería de alcoholes con concentraciones ascendentes (Etanol 80%, Etanol 95% I, Etanol 95% II, Etanol 100% I, Etanol:Butanol, Butanol I, Butanol II). Luego fueron embebidas en parafinas (butanol: paraplast 1:1, paraplast I, paraplast II, paraplast III) e incluidas en tacos de parafina. Los tejidos incluidos fueron cortados en micrótopo en secciones de 7µm , montados en portaobjetos silanizados en el caso de las muestras de cerebro y en portaobjetos cubiertos con albúmina de Meyer para muestras de riñón e hígado. Estas fueron dejadas a temperatura ambiente para su correcta adhesión.

9.5.3 Desparafinación, hidratación y tinción de muestras.

Los cortes de riñón e hígado fueron desparafinados e hidratados en una batería de alcoholes con concentraciones descendentes (xilol I, xilol II, etanol 100 %, etanol 96%, etanol 80%, etanol 70%, agua) para luego ser teñidos usando hematoxilina eosina (hematoxilina por 5 minutos, tetraborato de sodio por 1 minuto, eosina por 3 minutos). A continuación las muestras fueron deshidratadas nuevamente (etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 96% I, etanol 96 II, etanol 100% I, etanol 100% II, HistoClear I, HistoClear II) para ser montadas en medio de montaje.

9.5.4 Inmunofluorescencia

Las secciones coronales de cerebro fueron desparafinadas en una batería de xilol I, xilol II, etanol 100 I, etanol 100 II, etanol 95 I, etanol 95 II, etanol 70 por 5 minutos cada una para ser luego lavadas con agua destilada 3 veces por 3 minutos cada una. A continuación, los cortes se sometieron a tratamiento con citrato 10mM pH 6.0 en microondas a máxima potencia por 2 minutos para recuperar la exposición de antígenos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se procedió a bloquear y permeabilizar con solución de bloqueo (BSA 5%, 0,3% Tritón X-100, PBS 1x) por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti DARPP-32 en solución de bloqueo en una dilución 1:100 overnight a 4°C en cámara húmeda. Los cortes fueron lavados 3 veces con PBS 1x Tritón X-100 0,3% para a continuación ser incubados con el anticuerpo secundario conjugado a fluoróforo (Alexa 488) en dilución 1:500 junto a la tinción nuclear Hoechst por 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Finalmente las muestras fueron lavadas 3 veces por 5 minutos con PBS 1x siendo montadas en medio de montaje para fluorescencia DAKO para ser visualizadas en el microscopio confocal.

9.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados usando GraphPad 5.01 y fueron analizados estadísticamente usando ANOVA de dos vías teniendo en cuenta el factor genético y el tratamiento farmacológico, seguido por Bonferroni post test.

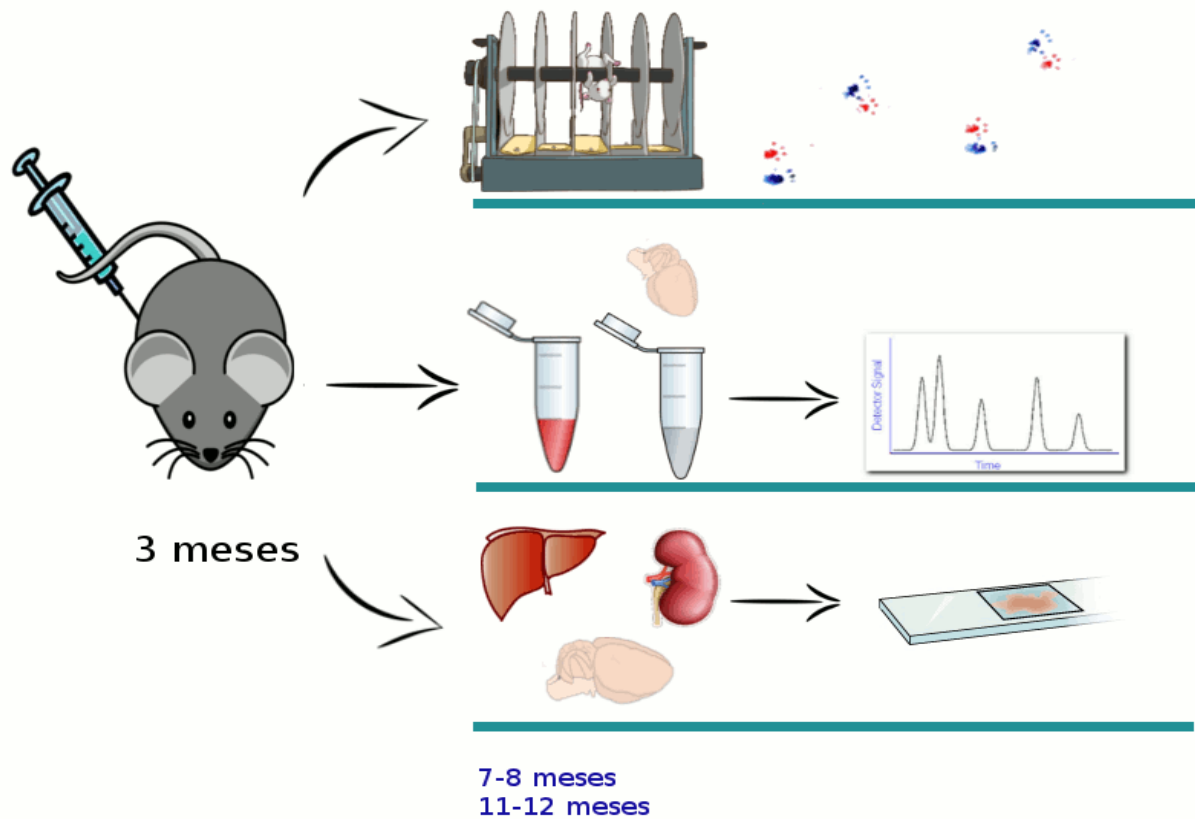


Figura 7. Esquema del diseño experimental. Los animales fueron tratados con inyecciones intraperitoneales de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico desde 3 meses de edad (150mg/kg ácido ascórbico y 150mg/kg ácido fosfoascórbico 2 veces por semana) durante 7-8 meses para el primer grupo de muestreo, y 11-12 meses de edad para el segundo grupo). Se realizaron ensayos de coordinación motora (rotarod y footprint). Además, se recolectaron muestras de suero y de tejido estriatal para la determinación de niveles de ácido ascórbico por HPLC e inmunofluorescencia. Finalmente, también se recolectó tejido hepático y renal para evaluación de toxicidad mediante análisis histológico.

10. RESULTADOS

10.1 EVALUACIÓN DE SINTOMATOLOGÍA MOTORA EN RATONES YAC128 SUPLEMENTADOS CON ÁCIDO ASCÓRBICO/ÁCIDO FOSFOASCÓRBICO

El ratón YAC128 es un modelo animal de la enfermedad de Huntington diseñado por el investigador Michael Hayden y colegas en 2003, quienes utilizaron un cromosoma artificial de levadura como vector para expresar la secuencia completa de huntingtina humana bajo el control del promotor humano, conteniendo 128 repeticiones del triplete CAG (43). En diversos estudios se ha reportado que este modelo replica características de la sintomatología presente en humanos, entre las que se incluyen la disminución de neuronas en estriado y comportamiento motor anormal (44), que se evidencia como una disminución progresiva en ensayos rotarod a los 4 meses de edad y anomalías en la marcha (18, 45).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la administración de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico en la aparición y progresión de la sintomatología motora en ratones YAC128 se llevaron a cabo dos ensayos de coordinación motora, ensayo rotarod y ensayo de la huella o *footprint*, en dos edades correspondientes a 7-8 meses (pre-sintomáticos) y 11-12 meses (sintomáticos) para analizar la progresión de la enfermedad.

10.1.1 Ensayo rotarod

Para la realización de ensayos rotarod los animales fueron entrenados durante 3 días, previo a la toma de datos, en las mismas condiciones en las que se realizó el experimento. Inicialmente los animales fueron transportados a una habitación para ser ambientados por 15 minutos. Posteriormente, estos fueron posicionados en el cilindro giratorio a una velocidad constante de 5 rpm por 10 segundos para asegurar la estabilidad y buen posicionamiento del animal sobre el aparato, tras los cuales se dio inicio al modo acelerado hasta alcanzar una velocidad de 45 rpm en un intervalo de dos minutos. El experimento se realizó por triplicado con dos horas entre cada toma de muestras los cuatro días en que se llevó a cabo el test (41)

A los 7-8 meses de edad no se observaron diferencias en el desempeño en el rotarod entre los animales WT comparados con los que expresan la versión mutante de huntingtina. Se puede apreciar una tendencia a la disminución del tiempo de latencia en ratones (tabla 2), sin embargo ésta es menor a lo reportado en otros estudios para el mismo modelo murino (41, 46, 47). Por otro lado se observa una diferencia significativa entre animales WT y YAC128 suplementados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico, con un tiempo de latencia menor para los ratones transgénicos (Figura 8 (A)).

Al analizar la performance motora en ratones de 11-12 meses de edad, al igual que en ratones de 7-8 meses, no se observaron diferencias significativas en el desempeño motor, manteniéndose la misma tendencia a la disminución en animales transgénicos. Igualmente, la administración de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico en ratones YAC128 no demostró diferencia significativa comparada con el control salino. Contrario a lo esperado, el tiempo sobre el cilindro rotatorio para animales WT tratados con la combinación de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico fue significativamente menor comparado con su control salino (Figura 8 (B)).

Tabla 2. Ensayo de coordinación motora utilizando rotarod

Grupo	Edad (meses)	Número animales (n)	*Tiempo de latencia (segundos)
WT salino	7-8	8	90
WT Asc-PAsc	7-8	8	102
YAC128 salino	7-8	8	78
YAC128 Asc-PAsc	7-8	8	68
WT salino	11-12	3	88
WT Asc-PAsc	11-12	4	59
YAC128 salino	11-12	3	78
YAC128 Asc-PAsc	11-12	4	75

*Duración sobre el cilindro rotatorio para ratones YAC128 y controles de camada WT de 7-8 meses y 11-12 meses de edad tratados con solución salina y ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. Los valores en la tabla corresponden a la media de tres ensayos para cada uno de los animales.

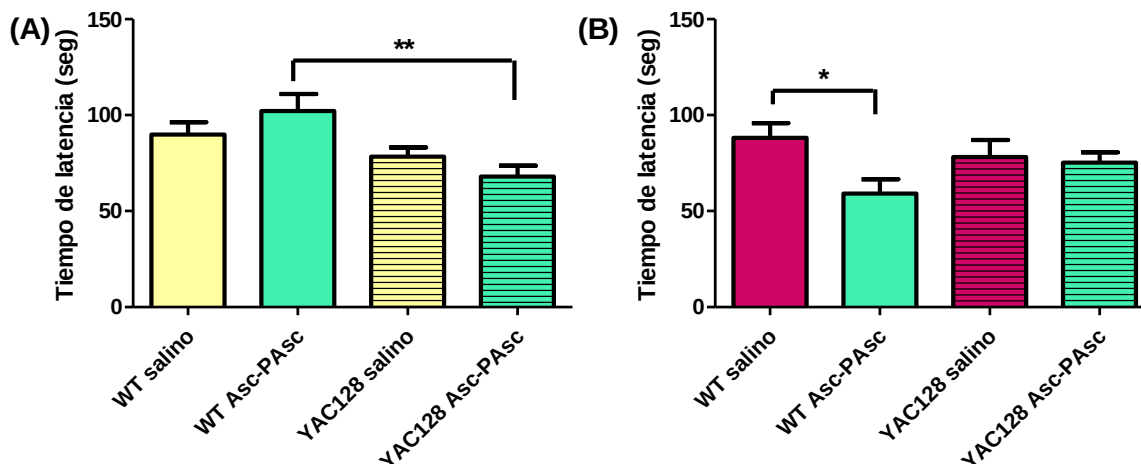


Figura 8. Evaluación de coordinación motora en ensayo rotarod en animales YAC128 y controles de camada (WT). (A) y (B) Gráfico de barras correspondiente al tiempo de latencia en ensayos de rotarod para animales de 7-8 meses de edad (A) (n=8 animales) y 11-12 meses de edad (B) (n=3-4 animales) tratados con solución salina y ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. Los datos son presentados como la media $\pm$ el error estándar de tres ensayos. ANOVA de dos vías, Bonferroni post test * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$.

10.1.2 Ensayo footprint

Diversos autores han descrito anomalías en la marcha de animales YAC128, con una disminución del largo del paso, aumento en la distancia de superposición de las pisadas y diferencias en el ancho de las bases de patas traseras y delanteras (45, 48). Para evaluar la coordinación motora y complementar los ensayos en el rotarod se realizaron ensayos footprint analizando el efecto de la administración de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico en dicho comportamiento. Para ello las patas de los ratones fueron teñidas con pintura no tóxica azul y roja para las patas traseras y delanteras, respectivamente. Posteriormente fueron posicionados al inicio de un corredor de 80 cm de largo por 8 cm de ancho con paredes de 10 cm, el que finalizaba en una caja oscura (42). El patrón de pisadas extendido sobre el papel fue sometido a análisis, midiendo la longitud de las pisadas para ambas patas, el ancho de bases y superposición, para tres pisadas consecutivas.

Al visualizar el trazo de pisadas sobre el papel no se observaron anomalías en el caminar entre animales WT y YAC128 de 7-8 meses de edad (Figura 9). Además, el análisis de las distancias

para los criterios de largo del paso, ancho de las bases, y superposición, contrario a lo reportado por otros autores (45, 48), mostró que no existían diferencias significativas (Figura 10). Sin embargo, en la gráfica correspondiente a la superposición es posible ver una tendencia que indicaría un incremento en la distancia entre las pisadas delanteras y traseras en animales YAC128 (Figura 10 (B)). Por otra parte, no se evidencia diferencias atribuibles al uso de ácido ascórbico y fosfoascórbico sobre este comportamiento.

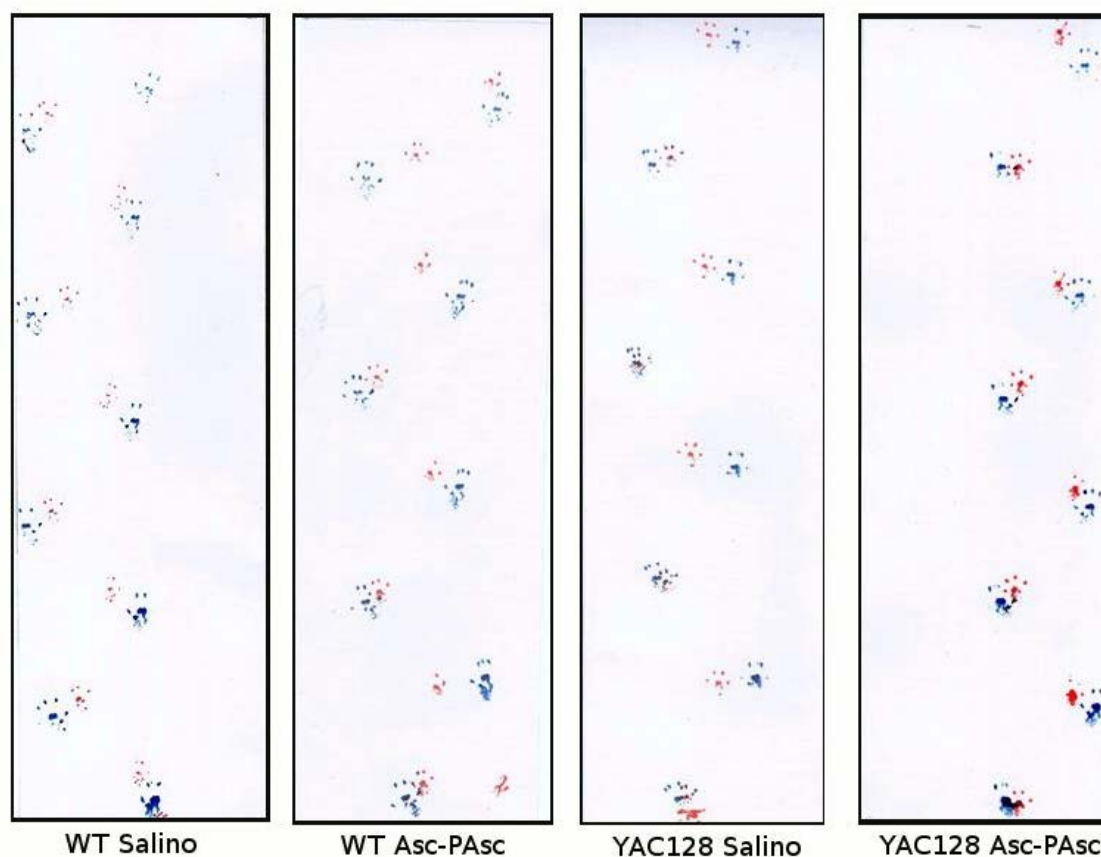


Figura 9. Patrones de pisadas en ensayo footprint de animales YAC128 y sus controles de camada wild type (WT) de 7-8 meses de edad. Imagen representativa de patrón tres pisadas continuas para ratones tratados con solución salina y ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (Asc-PAsc). Las imágenes corresponden a un segmento del trayecto de 80 cm de recorrido. Las patas traseras y delanteras de los ratones fueron teñidas con pintura azul y rojo respectivamente.

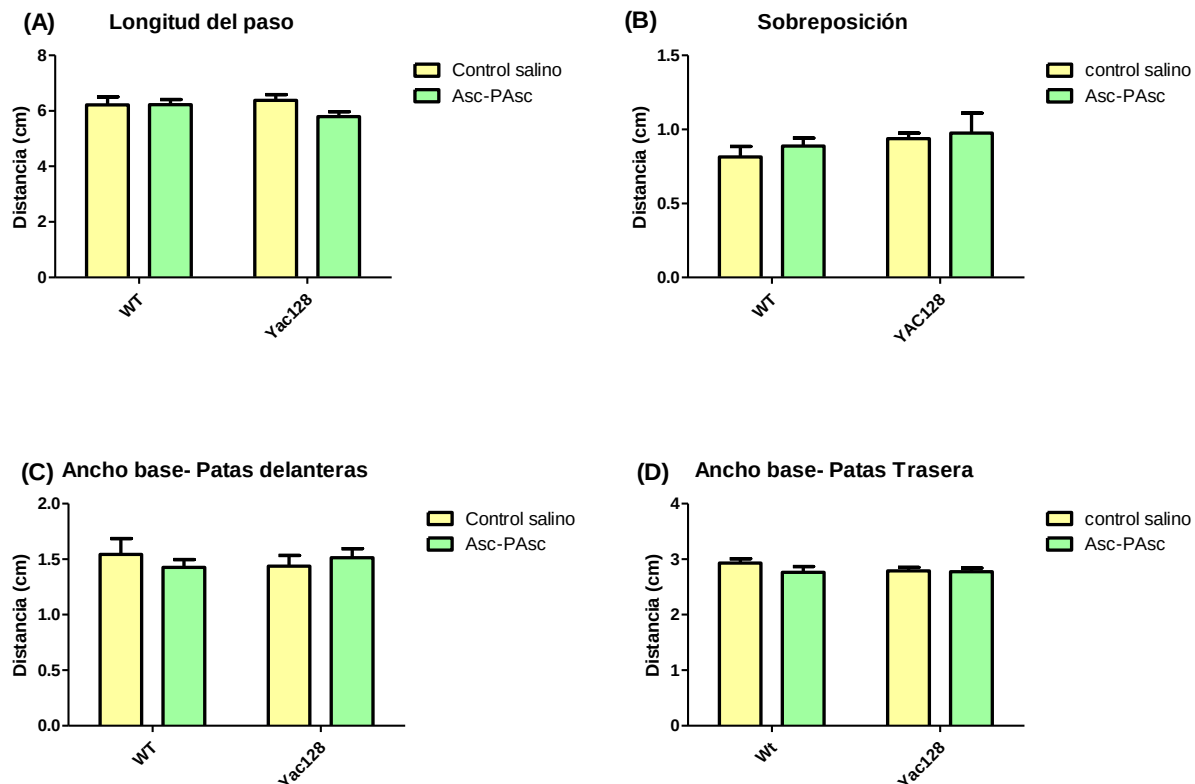


Figura 10. Cuantificación de los patrones de pisadas obtenidos en el ensayo footprint a 7-8 meses de edad. (A),(B),(C),(D). Gráficas de barras de la cuantificación de la longitud del paso de patas traseras y delanteras (A), sobreposición de pisadas (B), ancho de la base para patas delanteras (C) y ancho de la base para patas traseras (D) en animales YAC128 y controles de camada WT tratados con solución salina (amarillo) o ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (verde, Asc-PAsc). Los datos son presentados como la media de tres pisadas continuas $\pm$ error estándar y expresados en centímetros. N= 8 animales, ANOVA de dos vías, Bonferroni post test.

El mismo estudio fue realizado en el grupo de 11-12 meses edad. Al analizar el trazado de pisadas sobre el papel (Figura 11) no se observaron diferencias en la longitud del paso (Figura 12 (A)), superposición (Figura 12 (B)), ancho de bases para patas delanteras (Figura 12(C)), y ancho de bases traseras (Figura 12(D)). Sin embargo es posible ver tendencias en los cuatro criterios evaluados que sugieren una disminución en el largo de las pisadas de animales YAC128 tratados con la mezcla ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico, incremento en la distancia de superposición para animales transgénicos y disminución de la distancia de las bases, delanteras en animales YAC128 controles y traseras en ratones WT suplementados con ambos fármacos.

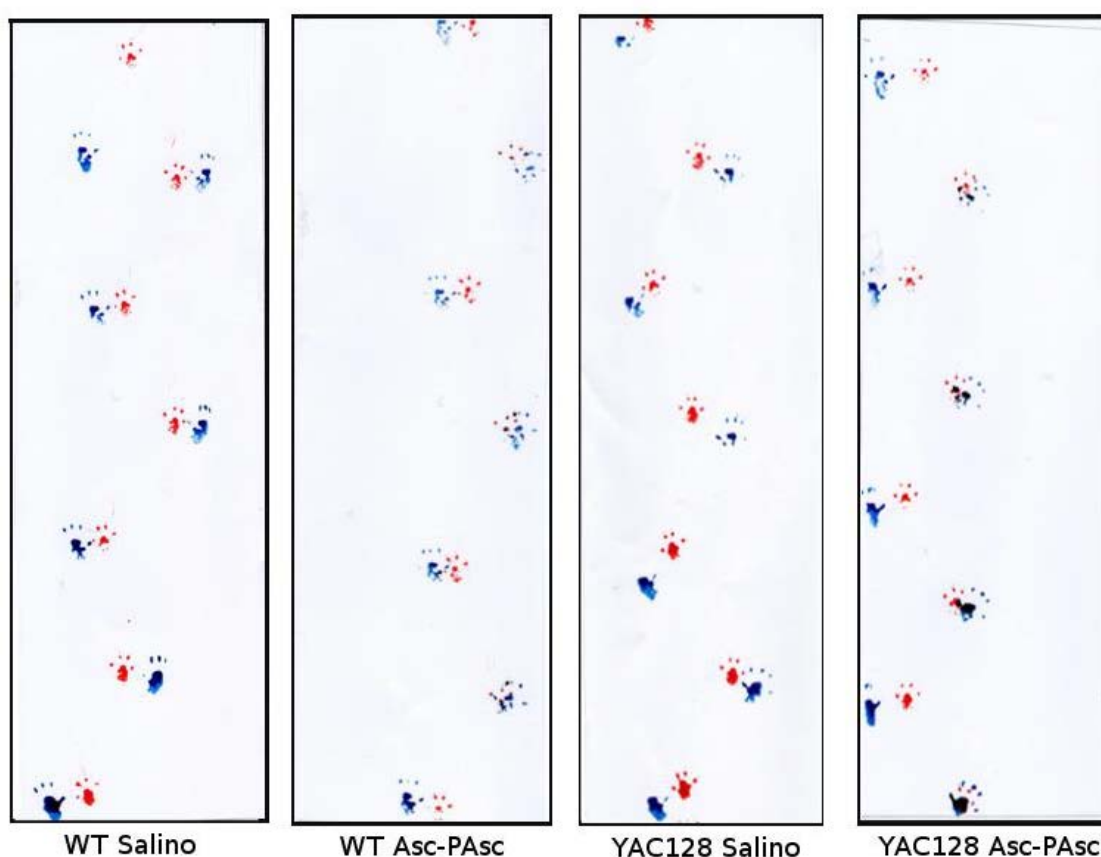


Figura 11. Patrones de pisadas para ensayo footprint de animales YAC128 y sus controles de camada wild type (WT) de 11-12 meses de edad. Imagen representativa de patrón tres pisadas continuas para ratones tratados con solución salina y ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (Asc-PAsc). Las imágenes corresponden a un segmento del trayecto de 80 cm de recorrido. Las patas traseras y delanteras de los ratones fueron teñidas con pintura azul y rojo respectivamente.

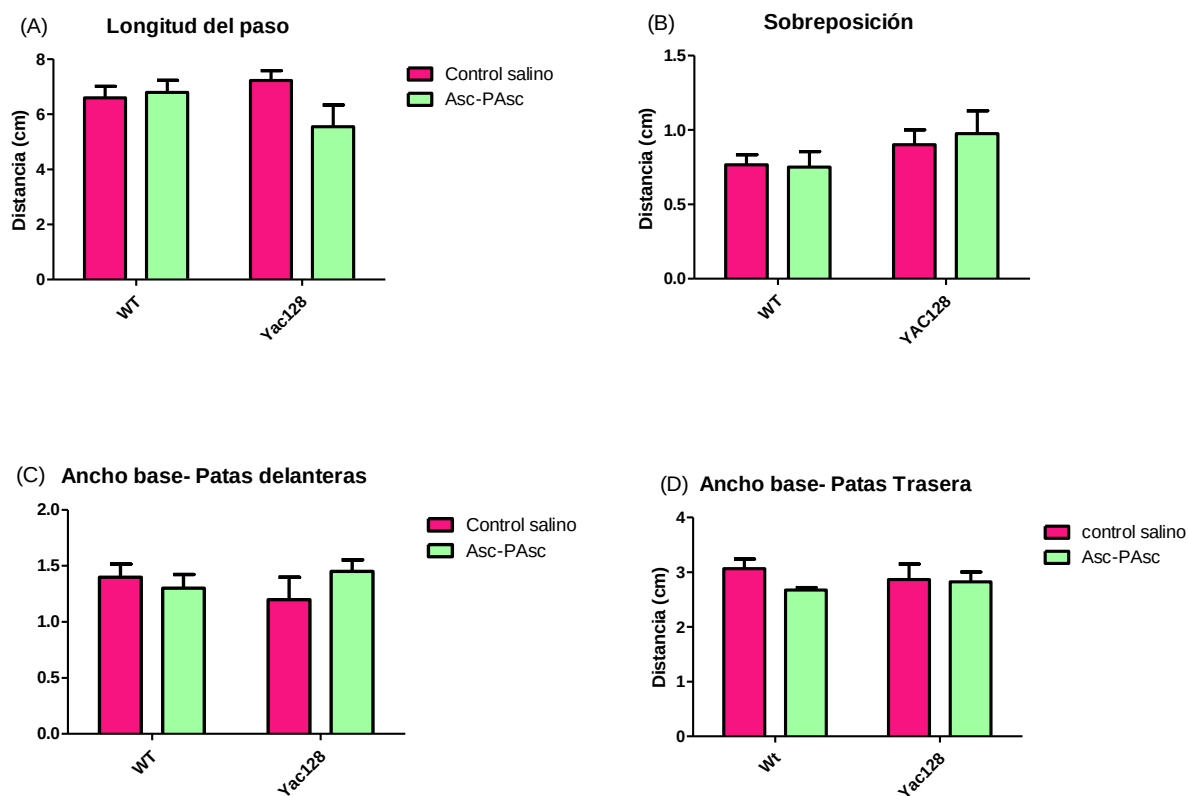


Figura 12. Cuantificación de los patrones de pisadas obtenidos en el ensayo footprint en animales YAC128 y controles de camada WT de 11-12 meses de edad. (A), (B), (C), (D). Gráficas de barras de la cuantificación de la longitud del paso de patas traseras y delanteras (A), sobreposición de pisadas (B), ancho de la base para patas delanteras (C) y ancho de la base para patas traseras (D) en animales YAC128 y controles de camada WT tratados con solución salina (rosado) o ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (verde, Asc-PAsc). Los datos son presentados como la media de tres pisadas continuas $\pm$ error estándar y expresados en centímetros. $n=3-4$ animales ANOVA de dos vías, Bonferroni post test.

10.2 ANÁLISIS DE PÉRDIDA NEURONAL EN ESTRIADO DE RATONES YAC128 Y CONTROLES WT

Otra manifestación clínica de la enfermedad de Huntington que se replica en el modelo YAC128 es la neurodegeneración estriatal (44). Se ha descrito la pérdida de neuronas estriatales en el modelo YAC128 a los 6 meses de edad la que avanza con el tiempo y se correlaciona con el fenotipo motor (16).

La evaluación de muerte neuronal en ratones YAC128 se realizó mediante inmunofluorescencia, para lo cual los cerebros de los animales fueron fijados por inmersión en PFA 4%, incluidos en parafina y posteriormente cortados a 7µm de grosor.

Con el fin de conocer el grado de neurodegeneración estriatal en animales YAC128 de 7-8 meses de edad se utilizó el marcador de neuronas espinosas medias DARPP-32 (49), este tipo neuronal constituye el mayor porcentaje en esta zona del cerebro (50). Las ventajas de este marcador es que permite una localización espacial del estriado al distinguirlo de la corteza cerebral y a la vez identificar neuronas de otros tipos celulares. Junto a la marca de DARPP-32 se empleó la tinción nuclear Hoechst.

En la figura 13 A) se muestran los resultados de inmunofluorescencia en tejido para animales WT y YAC128 de 7-8 meses tratados con solución salina o ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. El gráfico de barras (figura 13 B)) muestra el resultado para todas las muestras. Contrario a los antecedentes (18) no se observan diferencias significativas en el número de neuronas entre animales WT y transgénicos. Por otro lado, no hay diferencias entre ratones tratados con los fármacos en comparado con el control salino.

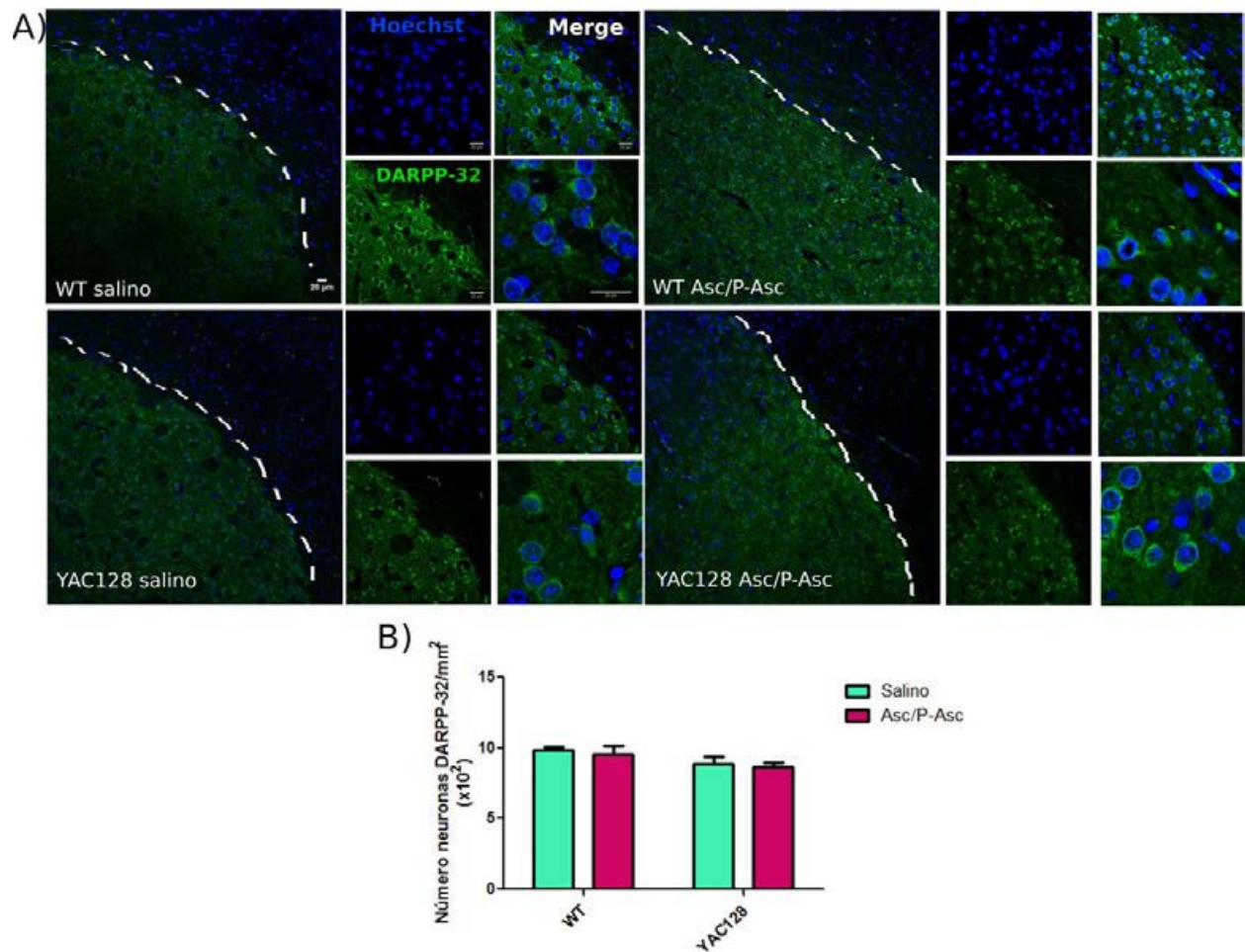


Figura 13. Evaluación de degeneración estriatal en ratones WT y YAC128 a 7-8 meses de edad. A) Análisis de inmunofluorescencia el marcador de neuronas estriatales **DARPP-32**. Los núcleos fueron teñidos con **Hoechst**. La línea segmentada muestra el cuerpo calloso. La barra de magnificación corresponde a 20µm B) Gráfico de barras del número de neuronas positivas DARPP-32 en estriado por mm². ANOVA de dos vías, Bonferroni post test, $p > 0.05$. N=2-3 animales.

10.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN SUERO Y ESTRIADO POR CROMATOGRAFÍA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Con el fin de evaluar la biodisponibilidad de ácido ascórbico en ratones WT y transgénicos tratados con el control salino y la mezcla ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico, se recolectaron muestras de suero y tejido cerebral, específicamente estriado.

Para el análisis de ácido ascórbico en muestras biológicas se han descrito diversas técnicas, entre las que destaca el uso de HPLC UV-VIS (51). La detección y cuantificación de ácido ascórbico en este trabajo fue llevada a cabo utilizando las condiciones cromatográficas implementadas por Wolf y Chen (2007) para la determinación de vitaminas hidrosolubles (52), las cuales fueron modificadas e implementadas en nuestro laboratorio para la detección de ácido ascórbico en medio celular, micropartículas y exosomas (53). El tiempo de retención para la molécula de interés fue entre 4.6 a 5.3 minutos.

Dada la baja estabilidad del ácido ascórbico, todas las muestras analizadas por HPLC fueron tratadas con DTT para evitar su oxidación. Igualmente se mantuvieron protegidas de luz y a 4°C durante todo el desarrollo de los experimentos.

10.3.1 Análisis de soluciones control

Inicialmente, se analizaron las soluciones utilizadas en el tratamiento de muestras y preparación de estándares, bajo las mismas condiciones cromatográficas con el fin de descartar su interferencia en la detección de ácido ascórbico. Los cromatogramas obtenidos (Figura 14) demuestran que ninguno de los compuestos aparece en el tiempo de retención de ácido ascórbico, por lo cual ninguno de ellos interfiere con su detección.

10.3.2 Preparación de estándares y curva de calibración

Posteriormente, para cuantificar la cantidad de ácido ascórbico presente en las muestras se realizó una curva de calibración con concentraciones de 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M y 200 μ M, las cuales fueron preparadas a partir de diluciones seriadas en IB DTT 0,1 mM de una solución estándar de 100 mM de ácido ascórbico en IB DTT 1 mM. Los Cromatogramas para cada una de las concentraciones se ilustran en la figura 15, donde se observa un tiempo de retención entre 4.6 y 5.2 minutos.

Las señales pertenecientes a ácido ascórbico fueron integradas por el software del equipo entregando un área bajo el pico. Los resultados de área para las distintas concentraciones se muestran en la tabla 3. La regresión lineal de la curva de calibración en la Figura 16 dio origen a la ecuación de la recta empleada para la cuantificación de ácido ascórbico.

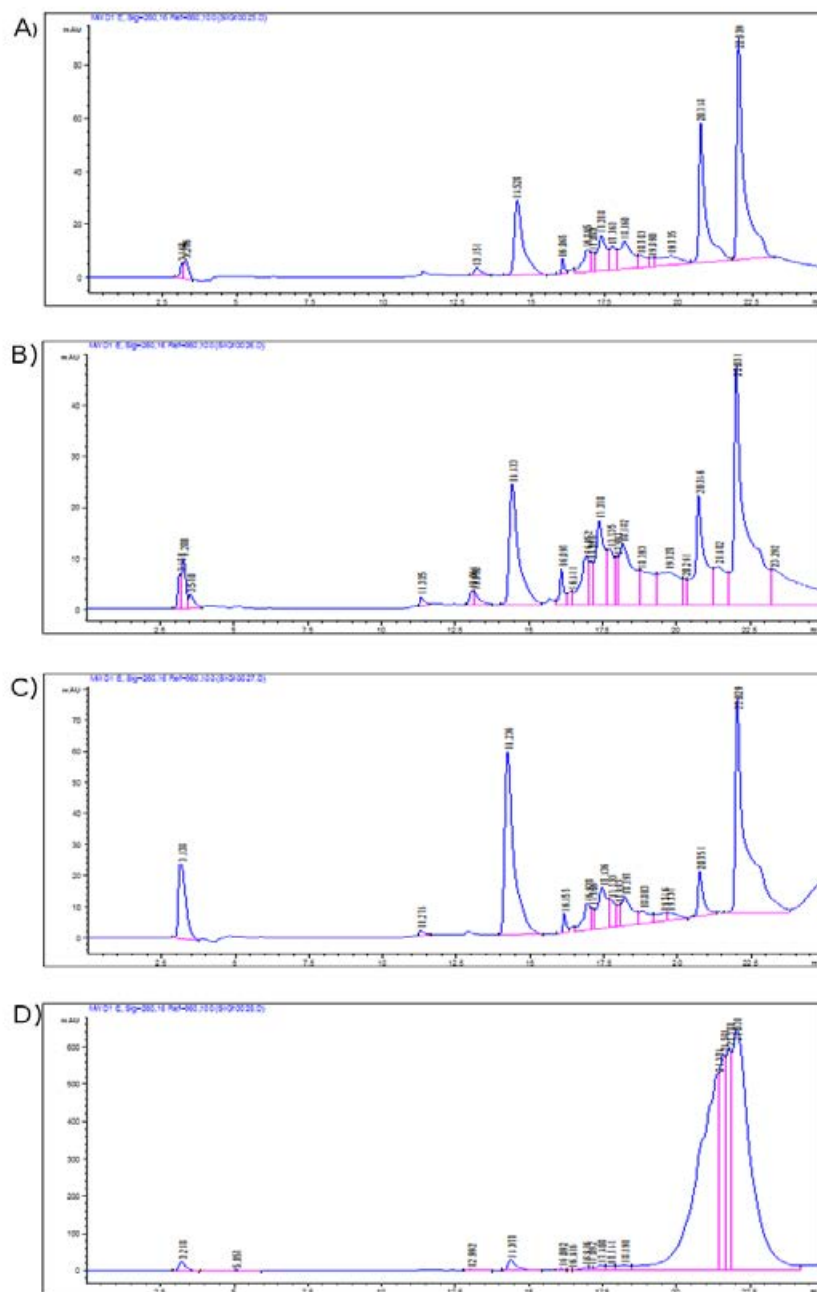


Figura 14. Cromatogramas de los componentes presentes en las distintas soluciones para el análisis de ácido ascórbico A, B, C, D. Imágenes representativas de cromatogramas IB + DTT (A), IB + DTT+ ácido metafosfórico (B), Buffer de lisis + DTT (C), Buffer de lisis + DTT + ácido metafosfórico (D).

Figura 15. Cromatogramas de las distintas concentraciones para curva de calibración ácido ascórbico a 260nm mediante HPLC. Las distintas concentraciones fueron obtenidas a partir de una solución estándar de ácido ascórbico 100mM en IB DTT 1mM, disueltas en IB DTT 0,1 mM. Estándares A) 10 μ M; B) 20 μ M; C)50 μ M; D) 100 μ M; E) 150 μ M; F) 200 μ M. El tiempo de retención de ácido ascórbico es de 4,5 a 5,2 minutos.

Tabla 3. Curva de Calibración de ácido ascórbico a 260nm mediante HPLC.

Concentración ácido ascórbico (μ M)	Área (UA)*
10	670 / 841
50	3652 / 3563
100	7279 / 7044
150	11504 / 11574
200	16764 / 15665

* Los datos presentados corresponden a dos experimentos realizados en días distintos.

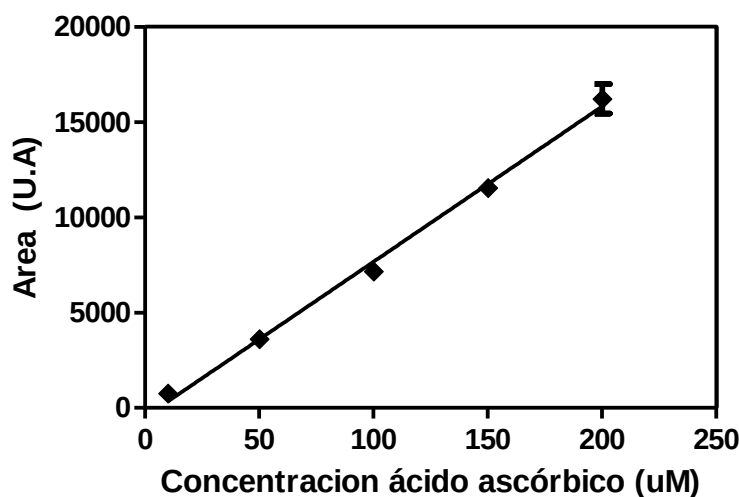


Figura 16. Curva de calibración de ácido ascórbico a 260 nm mediante HPLC. Los puntos en la gráfica corresponden los datos de la Tabla 2. Los datos corresponden a la media de dos ensayos $\pm$ DS. Ecuación de la recta obtenida por regresión lineal $y=81,084x-415,1$; $R^2 = 0,9959$

10.3.3 Determinación de ácido ascórbico en suero

Para el análisis del contenido de ácido ascórbico en suero de ratones tratados y sus respectivos controles se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca, las que fueron centrifugadas a 10000g por 10 minutos a 4°C para la obtención de suero, el cual fue tratado con IB DTT 0,1 a concentración final 0,1 mM. Para precipitación de proteínas se utilizó ácido metafosfórico.

La figura 17 A corresponde al cromatograma para el análisis de las muestras de suero por HPLC a 260nm. El análisis de estas muestras evidencia que no es posible distinguir con claridad el pico de ácido ascórbico ya que detectan un gran número de señales para otros compuestos. Con el fin de identificar la localización del pico perteneciente a la molécula de interés se adicionó ácido ascórbico en una concentración final de 50 uM (Figura 17B). En el cromatograma se observa que el pico perteneciente a ácido ascórbico está solapado por otras de las señales, por lo cual no es posible determinar concentraciones de esta molécula en este tipo de muestras utilizando este método analítico.

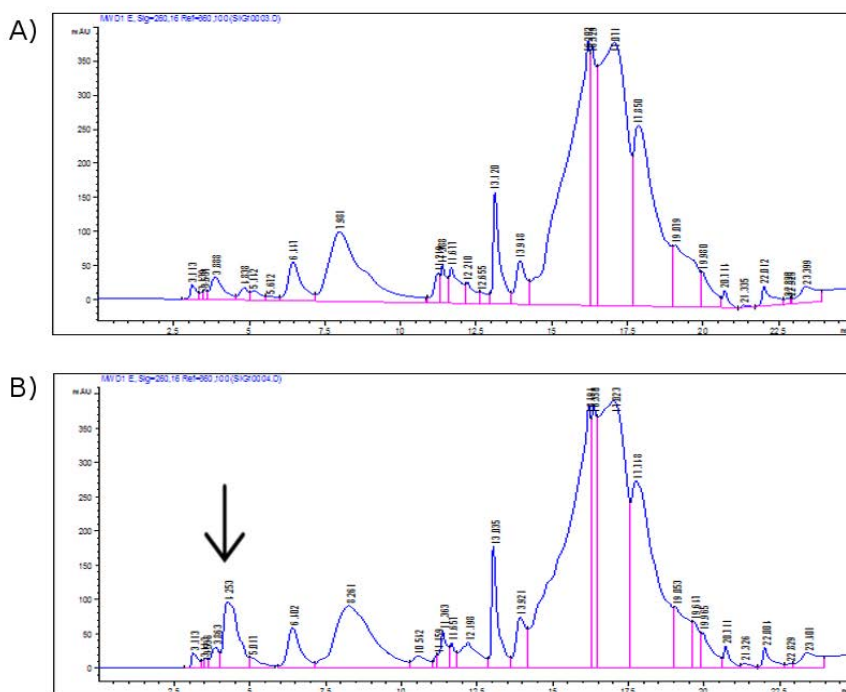


Figura 17. Cromatogramas para el análisis de ácido ascórbico en muestras de suero a 260 nm mediante HPLC. A) ,B). Cromatogramas representativos de muestrea de suero (A) y muestra de suero con adición de ácido ascórbico a concentración final 50 uM (B). La flecha indica el pico correspondiente a ácido ascórbico.

10.3.4 Determinación de ácido ascórbico en homogeneizado de estriado

Para la determinación de niveles de ácido ascórbico en las muestras de estriado, se extrajo tejido de animales de 7-8 meses y 11-12 meses de edad, siendo lisado en buffer de lisis y tratado con DTT 0,1mM para evitar la oxidación de ácido ascórbico. El tejido fue homogeneizado, sonificado y centrifugado a 10.000g a 4°C. Una alícuota del lisado fue tomada para determinación de proteínas por el método Bradford. Luego la muestra de homogeneizado fue tratada con ácido metafosfórico. A diferencia de las muestras de suero, los cromatogramas provenientes de las muestras de lisado de estriado (Figura 18) poseen mejor separación de los compuestos y por tanto una detección más clara de ácido ascórbico. Con el objetivo de mejorar la identificación del pico de ácido ascórbico, las muestras fueron cargadas con ácido ascórbico adicional a concentración final de 100 µM.

La cuantificación de ácido ascórbico fue llevada a cabo usando la ecuación obtenida por regresión lineal de la curva de calibración de la figura 16, normalizados por microgramos de proteína en la alícuota de homogeneizado. Los resultados obtenidos para los grupos control y tratado con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico para ambas edades en estudio se muestran en la tabla 4.

La gráfica de la figura 19 correspondiente a los niveles de ácido ascórbico muestra que no existen diferencias significativas en el contenido de ácido ascórbico para animales WT y transgénicos o ante el tratamiento con ácido ascórbico y fosfoascórbico.

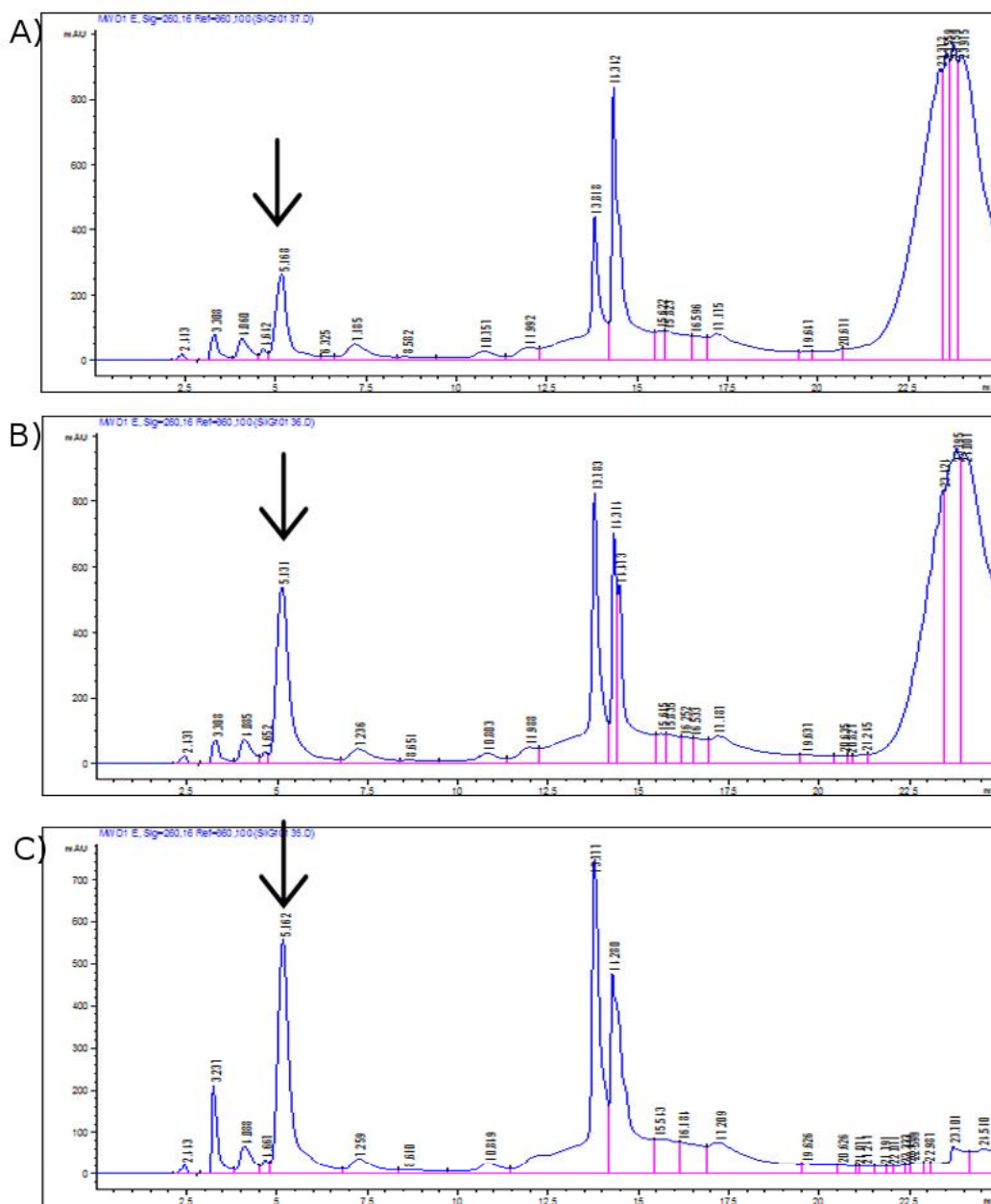


Figura 18. Cromatogramas para el análisis de ácido ascórbico en muestras de lisado de estriado a 260 nm mediante HPLC. A, B, C. Cromatogramas representativos de muestra de homogenizado de estriado de ratón WT (A), homogenizado de estriado proveniente de ratón WT al cual se adicionó ácido ascórbico a concentración final 100 μ M (B) y homogenizado de estriado proveniente de ratón YAC128 al cual se adicionó ácido ascórbico a concentración final 100 μ M. La flecha muestra el pico de ácido ascórbico.

Tabla 4. Determinación de ácido ascórbico a partir de homogenizados de estriado de ratones YAC128 y sus controles de camada WT

Grupo estudio	μmoles ácido ascórbico/mg proteína* 7-8 meses	μmoles ácido ascórbico/mg proteína* 11-12 meses
WT salino	20,15 / 22,84 / 39,79 / 27,63	21,86/16,48/23,10
WT Asc-PAsc	24,05/ 17,26/21,26/23,53	18,34/13,99/18,09
YAC128 salino	22,01/23,11/25,58/24,53	30,49/17,27/16,20
YAC128 Asc-PAsc	16,83/17,23/17,15/33,19	23,28/20,15/19,72

*Datos de la determinación de ácido ascórbico para los distintos grupos de estudio mediante HPLC a 260nm. Los valores corresponden a la cantidad en micromoles calculados a partir de ecuación de la recta de la figura, normalizados por mg de proteína cuantificados por método Bradford.

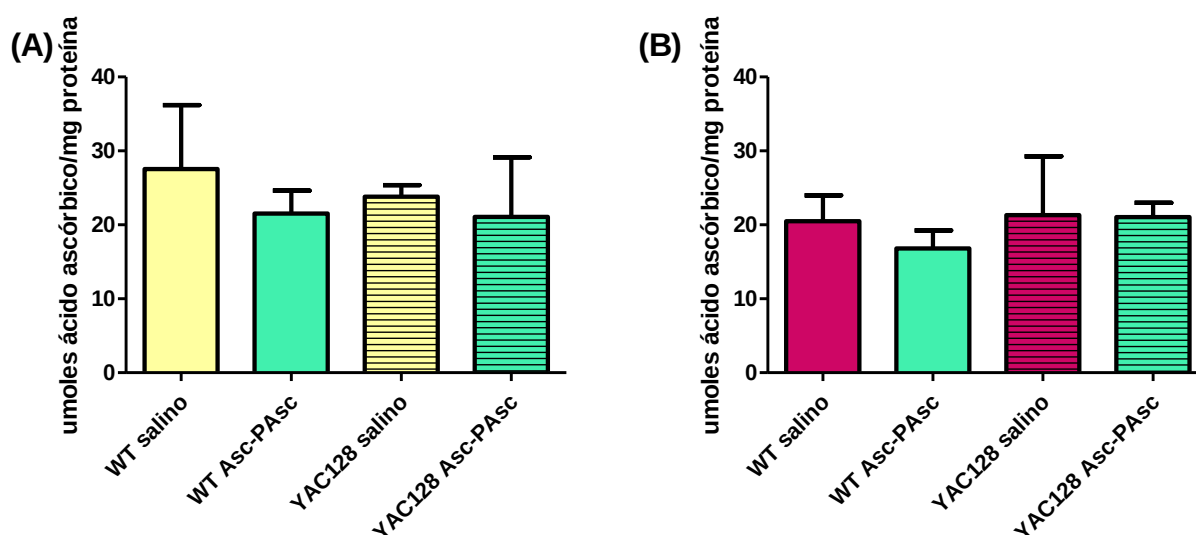


Figura 19. Determinación de niveles de ascórbico en lisados de estriado de ratones YAC128 y controles de camada WT mediante HPLC. (A), (B). Gráficas de barras correspondientes a la determinación de ácido ascórbico a partir de homogenizados de estriados de 7-8 meses (A) y 11-12 meses de edad (B). Los datos corresponden a la media +/- desviación estándar de los resultados de la tabla N=3-4. ANOVA de dos vías, Bonferroni post test.

10.4 EVALUACION TOXICOLÓGICA DE TEJIDO RENAL Y HEPÁTICO MEDIANTE HEMATOXILINA & EOSINA.

Con el objetivo de evaluar el posible efecto tóxico inducido por la exposición a ácido fosfoascórbico se recolectaron muestras de hígado y riñón provenientes de los ratones tratados con ácido ascórbico 150 mg/kg y ácido fosfoascórbico 150mg/kg. Los órganos extraídos fueron fijados por inmersión en PFA al 4%, incluidos en parafina y luego cortados en micrótomos a 7 μ M de grosor. Finalmente los cortes de riñón e hígado fueron teñidos en hematoxilina eosina.

Al evaluar el tejido hepático (Figura 20) con esta tinción no se observan cambios histológicos significativos en el parénquima comparado con los controles tratados con suero fisiológico. Igualmente no hay señales de lesiones hepatocelulares, esteatosis, inflamación portal o fibrosis.

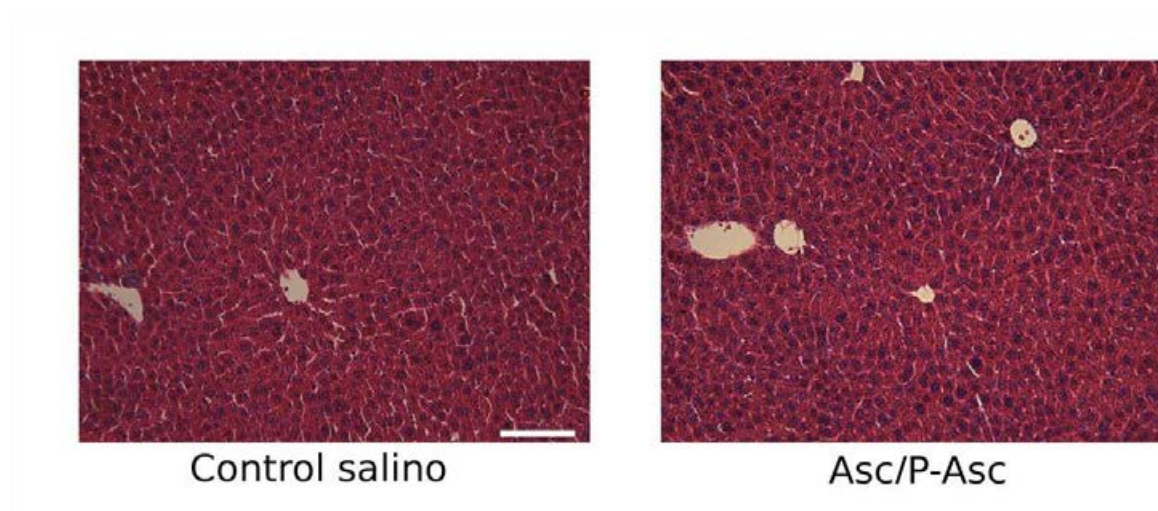


Figura 20. Evaluación histológica de tejido hepático proveniente de ratones tratados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. Análisis histológico por tinción con hematoxilina/eosina de parénquima hepático obtenido a partir de ratones WT tratados o no con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (Asc/P-Asc). La barra de magnificación corresponde a 100 μ m.

La evaluación de tejido renal en hematoxilina eosina (Figura 21) arroja que no se evidencian señales de daño ocasionado por la terapia. No se observan diferencias significativas o cambios histológicos a nivel de glomérulos corticales, túbulo intersticial, espacio urinario y medula renal. Igualmente no se evidencia infiltrado inflamatorio.

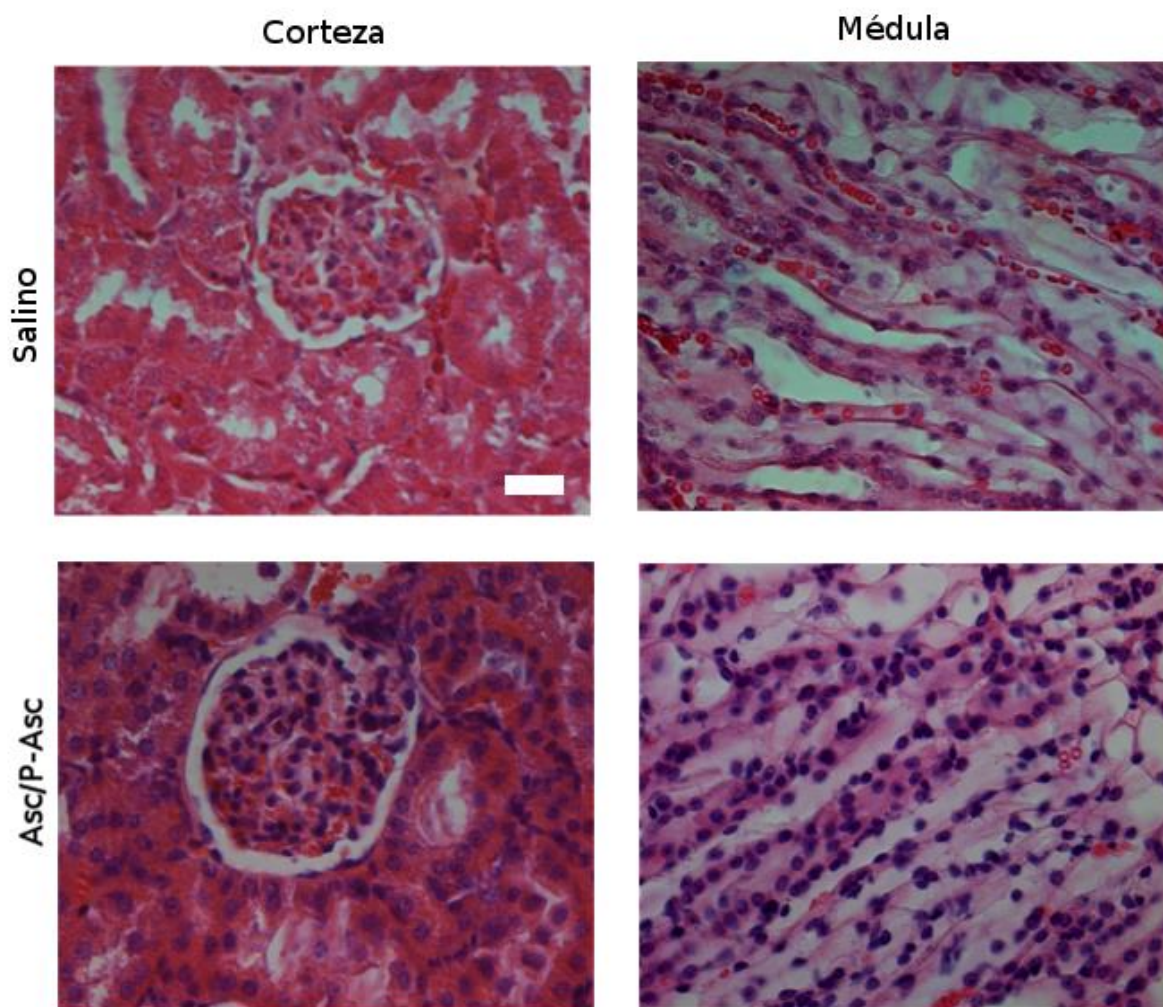


Figura 21. Evaluación histológica de tejido renal proveniente de ratones tratados con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. Análisis histológico por tinción con hematoxilina/eosina de parénquima renal obtenido a partir de ratones WT tratados o no con ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico (Asc/P-Asc). La barra de magnificación corresponde a 20 μ m.

11. DISCUSIÓN

El ácido ascórbico es la forma reducida de la vitamina C el cual posee muchas funciones biológicas, siendo la más conocida su importante rol como agente protector contra el daño oxidativo (54). En mamíferos, el cerebro es uno de los tejidos con mayor contenido y capacidad de retención de ácido ascórbico. En condiciones normales, el recambio de ácido ascórbico en este órgano es cercano al 2% por hora y bajo condiciones de deficiencia el contenido decrece menos del 2% por día, siendo retenido a expensas de otros órganos (55). En cerebro completo se han detectado niveles de ácido ascórbico que alcanzan concentraciones entre 1-2 mM, y llegando a 10 mM en el espacio intracelular de neuronas (31). No existe claridad sobre cómo es transportado el ácido ascórbico desde la sangre al sistema nervioso central a través de la barrera hematoencefálica y barrera hematocefaloraquídea. Algunos autores relatan que la principal ruta por la que el ácido ascórbico llega desde la sangre al SNC es a través de los plexos coroideos por transportadores SVCT2 (54), sin embargo, su expresión se limita a la membrana basolateral del epitelio, incorporando el ácido ascórbico desde el torrente sanguíneo al espacio intracelular de las células epiteliales, desconociéndose como se libera desde los plexos coroideos (31). En estudios realizados en modelos animales de enfermedad de huntington se ha observado deficiencias en la homeostasis de ácido ascórbico, con disminución en el contenido extracelular de ácido ascórbico, anormalidades en la liberación desde astrocitos y en la captación del mismo en neuronas, acompañado de alteraciones metabólicas, las cuales preceden la aparición de la sintomatología (30).

Estudios realizados en el modelo R6/2 por Rebec y colaboradores demostraron que la administración regular de ácido ascórbico en 300 mg/kg 4 veces a la semana por vía intraperitoneal en ratones de 6 semanas de edad (inicio de la sintomatología en modelo R6/2) por un periodo de 4 semanas era capaz de restaurar la liberación de ascorbato en estriado y mejorar el fenotipo conductual. (33).

Sin embargo, uno de los principales problemas relacionados al uso de ácido ascórbico como terapia neuroprotectora es su baja estabilidad, oxidándose rápidamente en solución. Además, en enfermedades neurodegenerativas el incremento de estrés oxidativo consume el ácido ascórbico disponible en el SNC dejando cantidades insuficientes para actuar como neuromodulador. El ácido fosfoascórbico es un derivado de ácido ascórbico con alta estabilidad y sin poder antioxidante.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que el ácido fosfoascórbico, al igual que el ácido ascórbico, posee la capacidad de modular el consumo de glucosa durante periodos de actividad sináptica e inducir el incremento en la localización de SVCT2 en la membrana plasmática aumentando la captación de ácido ascórbico (29). Estos antecedentes nos llevaron a evaluar el efecto neuroprotector de este análogo.

La evaluación del fenotipo motor se realizó por medio de dos ensayos motores, rotarod y ensayo de la huella *footprint*. Evidencia en la literatura menciona que el déficit en la performance en el rotarod en este modelo ratón se inicia 4 meses de edad(17), con diferencias significativas a los 6 meses entre transgénicos y controles WT (44). Sin embargo, los resultados en este ensayo a los 7-8 meses de edad muestran que no se observan diferencias significativas en el tiempo de latencia para el ensayo rotarod entre ratones WT y YAC128 tratados con el control salino. Por otro lado no hay diferencias en el desempeño en rotarod luego de la administración de ácido ascórbico y ácido fosfoascórbico.

En los estudios motores realizados a 11-12 meses no se observan diferencias significativas entre controles YAC128 y WT, sin embargo el ensayo rotarod muestra una disminución del tiempo de latencia en animales WT tratados con ácido ascórbico y fosfoascórbico. Existe la posibilidad que estos resultados sean ocasionados por el reducido tamaño de la muestra en estudio, dada la importancia de la elección de un número muestral en ensayos de comportamiento que debe ser calculado con el fin de asegurar el poder de análisis (56). Además, es importante señalar durante los ensayos motores realizados a esta edad los animales fueron sometidos a condiciones de estrés no intencionada en el bioterio. Es sabido que cambios en el ambiente donde son mantenidos los animales afectan la estandarización de técnicas y reproducibilidad de resultados (57).

Un punto que llamó nuestra atención fue que para ambas edades en estudio no se observaron diferencias entre control salino WT y YAC128. Junto a esto, el análisis de patrones en el test *footprint* no arrojó anormalidades en la marcha en ninguna de las edades estudiadas a pesar de lo observado por otros autores (45, 48). Esto nos llevó a preguntarnos la existencia de algún factor capaz de contribuir a la falta de reproducibilidad de los resultados publicados por otros grupos de investigación y la disminución del fenotipo motor. La búsqueda en la literatura nos hizo considerar la elección del background genético utilizado para la crianza de los animales. Diversos reportes

mencionan que existe la posibilidad de interacción con genes de la cepa parental que interactúan con los genes mutantes comprometiendo el fenotipo (58), y la presencia de diferencias en la susceptibilidad a efectos neurotóxicos dependiente del background genético(59).

La colonia YAC128 utilizada en estos estudios fue criada en un background genético C57BL/6 del cual se ha reportado tiene menor susceptibilidad a la citotoxicidad neuronal en estriado comparada con otras como FVB/N, donde la pérdida neuronal suele ser más extensa en hipocampo y estriado luego de la inducción de daño excitotóxico o metabólico. Esto sería un indicador que el background genético podría ser un candidato a la aminoración del fenotipo motor (59).

Por otra parte, en modelo YAC128/FVB se ha descrito la pérdida celular en estriado al 6to mes de edad (18), por lo que con el fin de observar claramente el daño a nivel estriatal se evaluó la supervivencia neuronal por medio de inmunofluorescencia utilizando el marcador de neuronas espinosas medias (MSN) DARPP-32 en ratones de 7-8 meses de edad (49). Las MSN son el principal tipo neuronal presente en estriado, constituyendo cerca del 95% de la población neuronal (50). El análisis de tejido cerebral mostró que no existen diferencias significativas en el número de neuronas positivas para el marcador DARPP-32, esto demuestra que la pérdida neuronal a esta edad en el modelo YAC128 con background C57BL/6 es menor, lo cual se correlacionaría con los hallazgos obtenidos en los ensayos de coordinación motora.

Ante este escenario es difícil establecer si existe un efecto por parte de la terapia, por lo cual una alternativa para conseguir una mejor aproximación sería el uso de un background genético que permita evidenciar con mayor claridad el déficit motor en el modelo animal. Entre las diversas distintas cepas utilizadas como background genético para cría de ratones, la 129/Sv pudiese ser una opción. En ensayos de comportamiento y coordinación motora, esta cepa ha demostrado tener un buen desempeño comparada con cepas como FVB y C57BL/6J. Dicha característica se evidencia como un mayor tiempo de latencia y menor tendencia a sujetarse del cilindro rotatorio (60). Junto a esto, la implementación de otro tipo de análisis conductual como el laberinto de agua de Morris (40) sería un aporte en el estudio de las propiedades terapéuticas del ácido fosfoascórbico, puesto que se ha descrito que el déficit cognitivo en el modelo YAC128 precede la aparición de síntomas motores (46).

En el desarrollo de un estudio pre clínico un aspecto importante a considerar son las propiedades farmacocinéticas del agente terapéutico en estudio, como es el conocer la biodisponibilidad del fármaco. Para ello se utilizó la técnica de HPLC para evaluar las concentraciones de ácido ascórbico en suero y homogeneizado de estriado de ratones YAC128 y WT tratados con vehículo o la mezcla de ácido ascórbico/ácido fosfoascórbico. Desafortunadamente, el método empleado no resultó útil para la cuantificación de ácido ascórbico en muestras de suero, ya que no se consiguió una buena resolución en la separación de los compuestos. Se realizaron modificaciones en la preparación de la muestra con el fin de conseguir un mejor resultado, sin embargo no se tuvo éxito (datos no presentados). Esto constituye un impedimento importante al momento de evaluar el efecto de los agentes farmacológicos pues no es posible conocer si la administración de ácido ascórbico fue capaz de alcanzar concentraciones plasmáticas efectivas a la dosis utilizada. Cambios en las condiciones cromatográficas o la implementación de un nuevo método analítico son algunas de las opciones que pudiesen ser estudiadas para lograr conocer la cantidad de ácido ascórbico en sangre. En la literatura una de las metodologías más empleadas por HPLC para cuantificación de este tipo de muestras es el uso de buffer fosfato como fase móvil, tal es el caso de Iwama y colaboradores (2012), quienes utilizando una columna de similares características a la usada en este trabajo y una fase móvil de solución fosfato 50 mM pH 2.8 y 2% de metanol lograron determinar concentraciones en distintos tejidos incluyendo plasma, cerebro, hígado, corazón, entre otros (61). Por otra parte no ha sido descrita una metodología analítica para la cuantificación de ácido fosfoascórbico.

Sin embargo, utilizando el método de Chen y Wolf modificado (52) fue posible cuantificar los niveles de ácido ascórbico en homogeneizado de estriado, observándose que no existen diferencias significativas en la cantidad de este compuesto a nivel cerebral para ninguno de los grupos en estudio. Esto sumado a la vía y régimen de administración establecidos para el desarrollo de este estudio, nos hace reflexionar si los fármacos alcanzaron niveles apropiados en sistema nervioso central para conseguir un efecto. Los estudios realizados por Rebec, a pesar de ser por la misma vía de administración que a la utilizada en este trabajo, tenían un régimen de administración de 4 días a la semana lo cual permite un incremento sostenido en los niveles plasmáticos de ácido ascórbico. Por otra parte, aun si estos resultados demostraron el efecto beneficioso de ácido ascórbico en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas in vivo, no han podido ser

reproducidos en estudios clínicos (34-37) como resultado de la baja biodisponibilidad a nivel cerebral al ser administrado por vía oral o parenteral. Esto cobra mayor importancia en términos clínicos pues, a diferencia de los humanos, los ratones tienen la capacidad de sintetizar ácido ascórbico en el hígado. Esta habilidad innata es el principal regulador de los niveles de ácido ascórbico en los diversos tejidos, otorgando un aporte adicional al proveniente de la dieta (61).

En términos generales el desarrollo de fármacos que atraviesen la barrera hematoencefálica hacia el cerebro constituye un desafío. La barrera hematoencefálica es una barrera dinámica y protectora que protege al cerebro de organismos y sustancias, por lo que constituye un impedimento en el transporte de fármacos al sistema nervioso central desde la circulación sanguínea (62). Por lo que con el objetivo de evaluar el efecto neuroprotector de ácido ascórbico y fosfoascórbico es necesario asegurar la entrega del fármaco al cerebro. Una posibilidad es modificar la vía de administración. En el caso de estudios pre-clínicos, el uso de cirugía estereotáxica es una alternativa, permitiendo la llegada directa de los agentes farmacológicos al cerebro. Por otro lado, la implementación de la vía intranasal parece ser una opción atractiva, otorgando una ruta directa al cerebro, minimizando la exposición sistémica y limitando la degradación del fármaco, pues estos son absorbidos a través de la mucosa nasal, entrando a cerebro por vía olfatoria y/o trigeminal, evitando la barrera hematoencefálica (63).

El estudio de las propiedades toxicológicas de un fármaco es de gran importancia para la industria farmacéutica para confirmar su seguridad además de su efectividad. El hígado es uno de los blancos más susceptibles a daño por xenobióticos pues es el primer órgano que entra en contacto con agentes administrados por vía oral, y es el sitio donde ocurren principalmente los procesos de biotransformación de fármacos. La susceptibilidad a la toxicidad es dependiente de múltiples factores, algunas drogas ocasionan daño dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición, mientras que en otros casos se debe a la generación de metabolitos tóxicos o interacciones medicamentosas (64). Por otra lado, otro órgano comúnmente afectado por la exposición a fármacos es el riñón, esencial en la mantención de la homeostasis y regulación del ambiente extracelular tal como la detoxificación y excreción de metabolitos y fármacos. Estas características hacen del riñón, al igual que el hígado, blancos importantes de tóxicos exógenos (65). Por estas razones se realizó una evaluación histológica de tejido hepático y renal para descartar daño

inducido por ácido fosfoascórbico. Los órganos en cuestión fueron extraídos, luego de realizada la punción cardíaca, fijados en PFA al 4% por inmersión y teñidos en hematoxilina eosina.

En hígado, el análisis demostró que no existen cambios histológicos significativos en ninguno de los animales tratados con ácido fosfoascórbico, así mismo no se observaron señales de daño parénquimal o lobular hepático, esteatosis (micro o macrovesículas de grasa) o infiltrado de células inmunes, lo cual sería indicio que este fármaco no genera lesiones capaces de visualizarse por esta técnica histológica. Lo mismo ocurre al observar las muestras de riñón al microscopio, en las cuales no se evidencian diferencias significativas en los componentes celulares, glomerulares o espacio urinario, con lo que se descarta toxicidad asociada a los agentes farmacológicos en las dosis empleadas en este trabajo. Sin embargo, cabe destacar que es importante el emplear otras técnicas para realizar una evaluación más profunda del posible daño en estos tejidos. Por ejemplo el cambio de la fijación por inmersión a fijación por perfusión, lo cual asegura una mejor conservación de los componentes histológicos y retira la sangre de los órganos mejorando la visión de las muestras, utilizar otras tinciones, tales como la tinción de Pas que define la estructura de los túbulos renales, o Tricrómico de Masson para evaluación de láminas basales en riñón. Igualmente, complementar los estudios histológicos con análisis bioquímicos en suero y orina para determinación de creatinina sérica, nitrógeno ureico, fosfatasa alcalina, entre otros biomarcadores, sería de gran utilidad para descartar efectos tóxicos.

12. CONCLUSIÓN

En síntesis, en el presente trabajo se observó que no se presentan diferencias en el fenotipo motor en el modelo YAC128 al tratamiento con ácido ascórbico y fosfoascórbico. Sin embargo, descartar el potencial de este derivado ácido ascórbico como agente neuroprotector es precipitado, considerando la mínima diferencia entre el fenotipo conductual y supervivencia neuronal entre animales transgénicos y controles WT utilizados para la realización de estos experimentos. Por ello con el fin de realizar una evaluación más acertada es necesario, en primer lugar utilizar un modelo YAC128 en un background que permita observar con claridad el déficit motor y la pérdida neuronal.

Los niveles de ácido ascórbico en estriado no arrojaron diferencias significativas, pero la imposibilidad de calcular su biodisponibilidad en suero hace difícil el estimar si el ácido fosfoascórbico alcanza el sistema nervioso central para actuar como neuromodulador y promover la captación de ácido ascórbico por incremento de SVCT2, por lo que el desarrollo de métodos analíticos que permitan la cuantificación de ambos fármacos en estos fluidos es de vital importancia para continuar con estudios clínicos ante la eventualidad de resultados positivos en estadios pre-clínicos. Un mejor acercamiento se podría obtener al iniciar un tratamiento con una vía de administración que asegure altos niveles en sistema nervioso central, por ejemplo el uso de cirugía estereotáxica para administrar el ácido fosfoascórbico directamente en estriado o vía intranasal para asegurar una mayor biodisponibilidad permitiendo una evaluación más acertada de su efecto. Finalmente en este estudio se demostró que la administración de ácido fosfoascórbico y ácido ascórbico no ocasionaron efectos tóxicos en riñón e hígado en las dosis administradas.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Ropper AH, Samuels MA, Klein JP. Chapter 39. Degenerative Diseases of the Nervous System. Adams and Victor's Principles of Neurology, 10e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2014.
2. Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. Annual review of pathology. 2006;1:151-70.
3. Standaert DG, Roberson ED. Chapter 22. Treatment of Central Nervous System Degenerative Disorders. In: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, editors. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2011.
4. Squire LR. Fundamental neuroscience. 3rd ed. Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press; 2008. xx, 1256 p. p.
5. Waxman SG. Chapter 13. Control of Movement. Clinical Neuroanatomy, 27e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2013.
6. Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, Hayden MR, Kay C, Leavitt BR, et al. Huntington disease. Nature Reviews Disease Primers. 2015.
7. Greenberg DA, Aminoff MJ, Simon RP. Chapter 11. Movement Disorders. Clinical Neurology, 8e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2012.
8. Group THsDCR. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. Cell. 1993;72(6):971-83.
9. Goldman L, Schafer AI. Cecil y Goldman. Tratado de medicina interna Elsevier Health Sciences Spain; 2013.
10. Cattaneo E, Rigamonti D, Zuccato C. The enigma of Huntington's disease. Scientific American. 2002;287(6):92-7.
11. Borstnar CR. Farreras-Rozman. Medicina Interna Elsevier Health Sciences Spain; 2012.
12. Schulte J, Littleton JT. The biological function of the Huntingtin protein and its relevance to Huntington's Disease pathology. Current trends in neurology. 2011;5:65-78.

13. Li S-H, Li X-J. Huntingtin–protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends in Genetics*. 2004;20(3):146-54.
14. van Meer P, Raber J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochemical Journal*. 2005;389(Pt 3):593-610.
15. Pouladi MA, Morton AJ, Hayden MR. Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2013;14(10):708-21.
16. Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics*. 2003;12(13):1555-67.
17. Brooks S, Higgs G, Janghra N, Jones L, Dunnett SB. Longitudinal analysis of the behavioural phenotype in YAC128 (C57BL/6J) Huntington's disease transgenic mice. *Brain Research Bulletin*. 2012;88(2–3):113-20.
18. Brooks SP, Jones L, Dunnett SB. Comparative analysis of pathology and behavioural phenotypes in mouse models of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*. 2012;88(2–3):81-93.
19. Vitamin C. *Vitamins In Foods*. Food Science and Technology: CRC Press; 2005. p. 289-308.
20. Martín-Belloso O, Odriozola-Serrano I, Soliva-Fortuny R. Vitamin C. *Handbook of Analysis of Active Compounds in Functional Foods*: CRC Press; 2012. p. 195-218.
21. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee J-H, et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 2003;22(1):18-35.
22. Balz F, Jane VH. Vitamin C. *Antioxidants*: AOCS Publishing; 2003.
23. Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*. 1995;62(6):1315S-21S.
24. Hansen SN, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J. Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients*. 2014;6(9):3818-46.
25. Castro M, Caprile T, Astuya A, Millan C, Reinicke K, Vera JC, et al. High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem*. 2001;78(4):815-23.

26. Castro MA, Beltrán FA, Brauchi S, Concha II. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. *Journal of Neurochemistry*. 2009;110(2):423-40.
27. Mazziotta JC, Phelps ME, Pahl JJ, Huang SC, Baxter LR, Riege WH, et al. Reduced cerebral glucose metabolism in asymptomatic subjects at risk for Huntington's disease. *The New England journal of medicine*. 1987;316(7):357-62.
28. Beltrán FA, Acuña AI, Miró MP, Angulo C, Concha II, Castro MA. Ascorbic acid-dependent GLUT3 inhibition is a critical step for switching neuronal metabolism. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(12):3286-94.
29. Covarrubias-Pinto A. Beyond the redox imbalance: oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease. *Journal of Neuroscience* 2015.
30. Acuña AI, Esparza M, Kramm C, Beltrán FA, Parra AV, Cepeda C, et al. A failure in energy metabolism and antioxidant uptake precede symptoms of Huntington's disease in mice. *Nat Commun*. 2013;4.
31. Covarrubias-Pinto A, Acuna AI, Beltran FA, Torres-Diaz L, Castro MA. Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(12):28194-217.
32. Covarrubias-Pinto A, Moll P, Solis-Maldonado M, Acuna AI, Riveros A, Miro MP, et al. Beyond the redox imbalance: Oxidative stress contributes to an impaired GLUT3 modulation in Huntington's disease. *Free radical biology & medicine*. 2015;89:1085-96.
33. Rebec GV, Barton SJ, Marseilles AM, Collins K. Ascorbate treatment attenuates the Huntington behavioral phenotype in mice. *Neuroreport*. 2003;14(9):1263-5.
34. Fahn S. An open trial of high-dosage antioxidants in early Parkinson's disease. *Am J Clin Nutr*. 1991;53(1 Suppl):380s-2s.
35. Suchowersky O, Gronseth G, Perlmutter J, Reich S, Zesiewicz T, Weiner WJ. Practice Parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson disease (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 2006;66(7):976-82.
36. Potashkin J, Seidl SE. The Promise of Neuroprotective Agents in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neurology*. 2011;2.

37. Fitzgerald KC, O'Reilly ÉJ, Fondell E, Falcone GJ, McCullough ML, Park Y, et al. Intakes of vitamin C and carotenoids and risk of amyotrophic lateral sclerosis: Pooled results from 5 cohort studies. *Annals of Neurology*. 2013;73(2):236-45.
38. Fujio T, Maruyama A, Koizumi S. Process for the preparation of ascorbic acid-2-phosphate. Google Patents; 1993.
39. Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. 2013(75):e2609.
40. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(7):519-29.
41. Vidal RL, Figueroa A, Court FA, Thielen P, Molina C, Wirth C, et al. Targeting the UPR transcription factor XBP1 protects against Huntington's disease through the regulation of FoxO1 and autophagy. *Human molecular genetics*. 2012;21(10):2245-62.
42. Wallis K, Sjogren M, van Hogerlinden M, Silberberg G, Fisahn A, Nordstrom K, et al. Locomotor deficiencies and aberrant development of subtype-specific GABAergic interneurons caused by an unliganded thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci*. 2008;28(8):1904-15.
43. Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*. 1999;23(1):181-92.
44. Slow EJ, van Raamsdonk J, Rogers D, Coleman SH, Graham RK, Deng Y, et al. Selective striatal neuronal loss in a YAC128 mouse model of Huntington disease. *Human molecular genetics*. 2003;12.
45. Chen X, Wu J, Lvovskaya S, Herndon E, Supnet C, Bezprozvanny I. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Molecular Neurodegeneration*. 2011;6(1):1-12.
46. Van Raamsdonk JM, Pearson J, Slow EJ, Hossain SM, Leavitt BR, Hayden MR. Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci*. 2005;25(16):4169-80.
47. Graham RK, Slow EJ, Deng Y, Bissada N, Lu G, Pearson J, et al. Levels of mutant huntingtin influence the phenotypic severity of Huntington disease in YAC128 mouse models. *Neurobiology of Disease*. 2006;21(2):444-55.
48. Wang H, Chen X, Li Y, Tang TS, Bezprozvanny I. Tetrabenazine is neuroprotective in Huntington's disease mice. *Mol Neurodegener*. 2010;5.

49. Ivkovic S, Ehrlich ME. Expression of the striatal DARPP-32/ARPP-21 phenotype in GABAergic neurons requires neurotrophins in vivo and in vitro. *J Neurosci*. 1999;19(13):5409-19.
50. Durieux PF, Schiffmann SN, de Kerchove d'Exaerde A. Targeting Neuronal Populations of the Striatum. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2011;5:40.
51. Kand'ar R, Zakova P. Determination of ascorbic acid in human plasma with a view to stability using HPLC with UV detection. *Journal of separation science*. 2008;31(20):3503-8.
52. Chen P, Wolf WR. LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2007;387(7):2441-8.
53. Troncoso-Escudero P. Estudio de posibles vías de salida de ácido ascórbico desde los astrocitos: Universidad Austral de Chile; 2014.
54. Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(6):719-30.
55. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*. 2000;23(5):209-16.
56. Taborsky M. Sample Size in the Study of Behaviour. *Ethology*. 2010;116(3):185-202.
57. Richter SH, Garner JP, Wurbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nature methods*. 2009;6(4):257-61.
58. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*. 1997;132(2):107-24.
59. Schauwecker PE. Susceptibility to excitotoxic and metabolic striatal neurodegeneration in the mouse is genotype dependent. *Brain Res*. 2005;1040(1-2):112-20.
60. Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of 10 inbred strains. *Behavioural Brain Research*. 2007;176(1):4-20.
61. Iwama M, Amano A, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid levels in various tissues, plasma and urine of mice during aging. *Journal of nutritional science and vitaminology*. 2012;58(3):169-74.

62. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(7):640-65.
63. Crawford L, Rosch J, Putnam D. Concepts, technologies, and practices for drug delivery past the blood–brain barrier to the central nervous system. *Journal of Controlled Release*.
64. López Panqueva RdP. Aspectos morfológicos de la enfermedad hepática inducida por drogas. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2014;29:449-60.
65. Kim SY, Moon A. Drug-Induced Nephrotoxicity and Its Biomarkers. *Biomolecules & Therapeutics*. 2012;20(3):268-72.