



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

**LA FORMA OXIDADA DE VITAMINA C, ÁCIDO
DESHIDROASCÓRBICO, REGULA LA NECROPTOSIS
NEURONAL DURANTE UN PERIODO DE ISQUEMIA Y
REPERFUSIÓN CEREBRAL.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular

LUCIANO ESTEBAN FERRADA COFRÉ

CONCEPCIÓN-CHILE

2019

Profesor Guía: Francisco Nualart Santander
Dpto. de Biología Celular, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart S
Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Castro
Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Jorge Fuentealba
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Christian Bonansco
Profesor Evaluador Externo
Universidad de Valparaíso

Dr. Juan Pablo Henríquez
Director
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por proyecto:

FONDECYT regular # 1140477

FONDECYT regular # 1181243

ECM-12 PIA-CONICYT

Beca CONICYT para estudios de doctorado # 21140570

Agradecimientos.

En primer lugar, agradezco enormemente al Dr. Francisco Nualart por haberme propuesto que me embarcara en esta aventura tan poco convencional (para la fecha) del mundo de la muerte celular no apoptótica. Sin su apoyo y confianza, esta tesis no habría sido posible de realizar. Muchas gracias a mis amigos del laboratorio: Nati, Fran, Vic, Eder, Rocío, María José, por aguantar los portazos, por las conversaciones absurdas, los memes. En resumen, gracias por la alegría constante del lugar de trabajo. Muchas gracias a Katy, por su colaboración y su constante apoyo anímico. Agradezco especialmente al CMA BIO-BIO y a todo su personal, debido que sin las tecnologías ahí disponibles esta tesis no hubiese podido ser desarrollada de manera exitosa.

Finalmente, pero no menos importante, agradezco a mi novia/esposa/polola o la denominación que más le acomode al lector, por su enorme paciencia, por escucharme hablar todo el día y todos los días de las mil maneras de morir que existen.

Tabla de contenido

Índice de figuras	ix
Índice de tablas	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xv
Abstract	xviii
I. Introducción.	1
1. Vitamina C y su reciclaje en el sistema nervioso central.....	1
Isquemia y reperfusión cerebral.....	6
2. Muerte neuronal durante isquemia y reperfusión.	8
3. Señalización y adaptadores de muerte celular.....	12
4. Muerte celular por necroptosis	14
5. Regulación de la necroptosis través de RIPK1	19
6. Regulación de la necroptosis por vitamina C: AA como inhibidor de apoptosis y DHA como activador RIPK1.....	21
II. Hipótesis de trabajo	25
III. Objetivo General.....	27
IV. Objetivos específicos.....	27
V. Materiales y métodos.	28

1.	Animales de experimentación y cultivos celulares utilizados en el desarrollo de la tesis.	28
2.	Generación de líneas celulares.	29
3.	Tratamiento de las células.	33
4.	PCR en tiempo real.	33
5.	Western Blot.	34
6.	Determinación de la concentración intracelular AA.	35
7.	Inmunofluorescencia y procesamiento de imágenes.	35
8.	Ensayos de viabilidad celular.	36
9.	Ensayos de viabilidad para el monitoreo de la apoptosis, necroptosis, inhibición de ROS y fragmentación mitocondrial.	37
10.	Ensayos de muerte celular.	37
11.	Medición de ROS.	37
12.	Cuantificación de proteínas por citometría de flujo.	38
13.	Microscopia en célula viva 4D.	39
14.	Isquemia y reperfusión cerebral por oclusión de la arteria cerebral media.	40
VI.	RESULTADOS.	41
	Capítulo 1.	41
	1.1. Características de desintegración neuronal.	41

1.2. El tratamiento con vitamina C, en ausencia de estrés oxidativo no induce muerte neuronal.....	44
1.3 El estrés oxidativo induce oxidación de vitamina C hasta DHA en la neurona, desencadenando muerte celular.....	47
1.4 La muerte celular inducida por DHA en condiciones de estrés oxidativo induce redistribución de los transportadores de vitamina C y comparte características morfológicas con la necroptosis.....	53
1.5. La sobre expresión de hSVCT2 incrementa la muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo.	65
1.6. DHA es la molécula inductora de la muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo.	69
Capítulo 2.....	76
2.1. La producción intracelular de DHA induce muerte por un mecanismo independiente de ROS y apoptosis.....	76
2.2. La producción intracelular de DHA, regula la expresión de RIPK1, RIPK3 y MLKL, estimulando la necroptosis.	79
2.3. La muerte neuronal inducida por la producción intracelular de DHA, comparte las características de desintegración necroptótica.....	93
2.4. La producción intracelular de DHA induce muerte por necroptosis.....	104
Capítulo 3.....	109
3.1. Infarto cerebral in vivo.	109

VII. Discusión.....	113
VIII. Anexo.....	125
Figura 1. Gates utilizados para determinar la muerte celular en células que sobre expresan EGFP y SVCT2	125
Figura 2. Validación anticuerpo contra MLKL para uso citometría de flujo.....	126
Información estadística detallada de las figuras clave.....	127
IX Referencias.....	135



Índice de figuras

Figura 1. Reciclaje de vitamina C entre neurona y astrocito en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.....	5
Figura 2. Vías de muerte regulada por TNF- α	18
Figura 3. Regulación de RIPK1 por DHA	24
Figura 4. Mapa plásmido all in one CRISPR/Cas9.....	31
Figura 5. Las neuronas corticales de rata y las células N2a presentan características de desintegración apoptótica y necroptótica.	43
Figura 6. La suplementación con vitamina C no tiene efectos sobre la viabilidad, muerte o proliferación neuronal.....	46
Figura 7. Vitamina C induce muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo de tipo IR in vitro	50
Figura 8. El estrés oxidativo de tipo IR induce oxidación de AA in vitro	51
Figura 9. La acumulación intracelular de DHA induce muerte celular, la que es prevenida por el reciclaje de DHA por parte de los astrocitos	52
Figura 10. Parámetros elípticos (oblato, esférico, prolato) y de tamaño (Bounding-box) determinados por Imaris.....	57
Figura 11. La generación de DHA induce redistribución de los transportadores de vitamina C y cambios morfológicos en células N2a	59
Figura 12. La redistribución de GLUT1 no es hacia la lámina nuclear y no está relacionada a un aumento en la expresión génica	61

Figura 13. La redistribución de GLUT1 está asociado a cambios en el citoesqueleto.	62
Figura 14. Previo a la muerte neuronal inducida por la generación de DHA, se inducen cambios morfológicos de tipo necroptótico en células HN33.11	64
Figura 15. Generación de las líneas celulares N2a-EGFP, N2a- hSVCT2wt-EYFP, HN33.11-EGFP y HN33.11-hSVCT2wt-EYFP	66
Figura 16. La sobre expresión de hSVCT2 incrementa la muerte neuronal inducida por la producción intracelular de DHA.....	68
Figura 17. Esquema de la estrategia experimental para la obtención de clones KO a partir de cell sorting de célula única y CRISPR/Cas9.....	70
Figura 18. Las células N2a KO SVCT2 no transportan AA	71
Figura 19. La delección de SVCT2 previene la muerte celular inducida por la oxidación intracelular de AA.....	75
Figura 20. La inhibición de ROS o de la apoptosis no previene la muerte neuronal inducida por DHA	78
Figura 21. Vitamina C regula la expresión de RIPK1, RIPK3 y MLKL, estimulando la necroptosis	84
Figura 22. Vitamina C regula la expresión de RIPK1 y RIPK3 estimulando la necroptosis en neuronas corticales	86
Figura 23. AA regula el splicing de MLKL y RIPK1	88
Figura 24. La oxidación intracelular de DHA favorece una rápida fosforilación de RIPK1.....	90

Figura 25. La producción intracelular de DHA induce muerte por necroptosis.....	92
Figura 26. La producción intracelular de DHA induce características de desintegración necroptótica.....	95
Figura 27. Análisis de microscopia de célula viva en tiempo real en neuronas corticales	97
Figura 28. La producción de DHA induce daño mitocondrial independiente de Drp-1	101
Figura 29. La producción de DHA induce daño mitocondrial independiente de Drp-1 en neuronas corticales de rata.	103
Figura 30. La delección de MLKL previene la necroptosis inducida por la producción intracelular de DHA	107
Figura 31. La delección de MLKL solo retrasa la muerte neuronal inducida por DHA	108
Figura 32. Estandarización del modelo de IR in vivo.....	111
Figura 33. Inducción de IR in vivo mediante modelo de MCAO	112
Figura 34. Principales efectos de la acumulación de DHA en la neurona	124

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos, anticuerpos y reactivos utilizados.....32

Tabla 2. Partidores utilizados.....34



Abreviaturas

ADN	:	ácido desoxirribonucleico
ADNase	:	enzima desoxirribonucleasa
ADNc	:	ácido desoxirribonucleico copia
ADP	:	adenosín difosfato
AA	:	ácido ascórbico
ARNasas	:	enzima ribonucleasa
ARNm	:	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	:	adenosín trifosfato
BSA	:	albúmina de suero bovino
Cy	:	cianina
DHA	:	ácido deshidroascórbico
DMEM	:	medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	:	dimetil sulfóxido
dNTPs	:	desoxirribonucleótidos
DTT	:	ditiotreitól
EDTA	:	ácido etilendiaminotetracético
GFAP	:	proteína ácida fibrilar glial
GFP	:	proteína fluorescente verde
GLUT1	:	transportador de glucosa 1
GSH	:	glutatión
HRP	:	peroxidasa de rábano picante

IR	:	Isquemia y reperfusión
IP	:	ioduro de propideo
Km	:	constante de Michaelis
MEM	:	medio mínimo esencial de Eagle
NADH	:	nicotinamida di nucleótido reducido
NADHP	:	nicotinamida di nucleótido fosfato reducido
PAGE	:	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	:	tampón fosfato salino
PCR	:	reacción de la polimerasa en cadena
PFA	:	paraformaldehído
ROS	:	especies reactivas derivadas de oxígeno
SVCT2	:	co-transportador de sodio-ascorbato 2
SDS	:	dodecilsulfato de sodio
SBF	:	suero bovino fetal
SNC	:	sistema nervioso central
Tris	:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Resumen

La vitamina C es encontrada en dos estados, el estado reducido ácido ascórbico (AA), y su estado oxidado ácido deshidroascórbico (DHA). Bajo condiciones fisiológicas, el AA es el principal antioxidante del sistema nervioso central. Sin embargo, bajo condiciones fisiopatológicas como el infarto cerebral, el AA es oxidado hasta DHA. De manera interesante, el infarto cerebral induce un tipo de muerte particular llamado necroptosis, y hasta la fecha se desconocen los mecanismos iniciadores de la necroptosis en contextos fisiopatológicos. Al mismo tiempo, en diversos modelos celulares se ha propuesto que la acumulación de DHA se encuentra asociado a procesos de muerte con características necróticas. De esta forma, en esta tesis propusimos evaluar si la acumulación intracelular de DHA en la neurona podría inducir muerte por necroptosis. Con el objetivo de poner a prueba nuestra hipótesis, generamos nuestro propio modelo de infarto *in vitro*, debido a que los modelos convencionales inducen muerte por apoptosis. Nuestro modelo de estudio fue validado inhibiendo la apoptosis, la necroptosis, la fisión mitocondrial y la generación de especies reactivas de oxígeno. Para analizar las características de desintegración celular, utilizamos microscopía confocal espectral de célula viva 4D con 5 canales donde se analizó de manera simultánea la morfología celular, actividad mitocondrial, integridad del núcleo y la integridad de la membrana plasmática. Estos experimentos, fueron un elemento clave para poder determinar el proceso de muerte inducido por la acumulación intracelular de DHA. Los estudios de microscopía de célula viva fueron complementados con análisis morfológicos, utilizando reconstrucciones 3D y cuantificaciones 3D especializadas con el software

Imaris, de las células en proceso de muerte. Reforzando estos experimentos, mediante microscopía de super resolución SIM, analizamos en detalle el tamaño y la morfología mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo y de acumulación intracelular de DHA. De manera interesante, las reconstrucciones 3D mostraron patrones de distribución no descritos hasta la fecha en respuesta al tratamiento con AA o a la acumulación de DHA, que involucran a los transportadores de vitamina C y a proteínas claves de la necroptosis. Por otra parte, para determinar la participación del AA en el proceso de muerte sobre expresamos, de manera estable mediante infección lentiviral, el transportador de AA SVCT2; y por otro lado, generamos clones KO para SVCT2 a partir de *cell sorting* de célula única y la tecnología de CRISPR/Cas9, estableciendo la primera línea celular neuronal deletada para SVCT2 descrita hasta la fecha. Sorprendentemente, encontramos que la acumulación intracelular de DHA en la neurona induce drásticos cambios morfológicos que corresponden a características de desintegración necroptótica. Mas aún, mediante la tecnología de CRISPR/Cas9 deletamos la proteína ejecutora de la necroptosis, validando de esta forma que DHA puede inducir muerte específicamente por necroptosis. Usando la microscopía de resolución súper SIM para analizar el tamaño y la morfología mitocondrial en condiciones de estrés oxidativo y acumulación de DHA intracelular, encontramos que la oxidación de DHA favorece la fragmentación mitocondrial. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el daño mitocondrial no estaría involucrado en el proceso de muerte. Por lo tanto, nuestro trabajo propone a DHA como una molécula multifacética que podría tener implicaciones en los procesos de muerte no apoptóticos, regulando la necroptosis neuronal en períodos de estrés oxidativo agudo, como el generado

durante el accidente cerebrovascular. Finalmente, proponemos que el DHA es un desafío para la comunidad científica para desarrollar nuevos conceptos con importantes implicaciones terapéuticas.



Abstract

Vitamin C is found in two states: reduced ascorbic acid (AA) and oxidized dehydroascorbic acid (DHA). Under physiological conditions, AA is the main antioxidant found in the central nervous system. However, under pathophysiological conditions, such as stroke, AA is oxidized to DHA. Interestingly, stroke induces a particular type of cell death, necroptosis, and to date, the initiating mechanisms of necroptosis are unknown in various pathophysiological contexts. In several cellular models, DHA accumulation has been proposed to be associated with death processes with necrotic characteristics. In this scenario, we proposed to evaluate if neuronal intracellular accumulation of DHA could induce death by necroptosis. To test our hypothesis, we generated our own *in vitro* stroke model because conventional models induce death by apoptosis. Our study model was validated by the inhibition of apoptosis, necroptosis, mitochondrial fission and generation of reactive oxygen species. To analyze the characteristics of cell disintegration, we used 4D real-time live-cell spectral confocal microscopy with 5 channels to simultaneously analyze the following characteristics: cell morphology, mitochondrial activity, integrity of the nucleus, and the integrity of the plasma membrane. These experiments were a key element to understanding the death process induced by the intracellular DHA accumulation. Live-cell microscopy studies were complemented with morphological analysis using 3D reconstructions and specialized 3D quantifications of cell death with Imaris software. Interestingly, 3D reconstructions showed novel patterns of distribution not previously described to date in response to treatment with AA or DHA accumulation, which involve vitamin C transporters and

key proteins of necroptosis. To determine the participation of AA in the death process, we stably overexpressed the AA transporter, SVCT2, as well as generated knockout clones for SVCT2 from single cell sorting and CRISPR / Cas9 technology, establishing the first SVCT2-null neuronal cell line described to date. Strikingly, we found that intracellular DHA accumulation in the neuron induced drastic morphological changes that corresponded to necroptotic disintegration features. Furthermore, through CRISPR / Cas9 technology, we deleted the executing protein of necroptosis, confirming that DHA can induce death specifically due to necroptosis. Using SIM super resolution microscopy to analyze the size and mitochondrial morphology under oxidative stress conditions and intracellular DHA accumulation, we found that the oxidation of DHA favors mitochondrial fragmentation. However, our results suggest that mitochondrial damage would not be involved in the death process. Thus, our work proposes DHA as a multifaceted molecule that could have implications in non-apoptotic death processes, regulating neuronal necroptosis in periods of acute oxidative stress, such as that generated during stroke. Finally, we propose that the DHA is a challenge to the scientific community to develop new concepts with important therapeutic implications

I. Introducción.

1. Vitamina C y su reciclaje en el sistema nervioso central

Vitamina C es una molécula de pequeño tamaño, soluble en agua, que posee dos protones disociables con valores de pK a 4.2 y 11.8 (May, 2012). A pH fisiológico predomina su forma reducida como ácido ascórbico (AA), la cual es incorporada específicamente a las neuronas mediante el co-transportador de sodio-ascorbato 2 (SVCT2) (Salazar et al., 2014). Cuando AA pierde sus 2 protones se oxida a ácido deshidroascórbico (DHA), el cual difunde en las células a través de transportadores de glucosa GLUT1 ($K_{mDHA} \sim 1mM$), GLUT2 ($K_{mDHA} \sim 2mM$), GLUT3 ($K_{mDHA} \sim 2mM$), GLUT4 ($K_{mDHA} \sim 1mM$), y GLUT8 ($K_{mDHA} \sim 3mM$) (Rumsey et al., 2000, Rumsey et al., 1997, Corpe et al., 2013). La mayoría de los mamíferos son capaces de sintetizar vitamina C en el hígado, a partir de glucosa, pero los humanos y primates carecen de la enzima que cataliza la última etapa de su biosíntesis, por lo que deben consumirla en la dieta (Rice, 2000, May, 2012). Por otra parte, en tejidos periféricos ha sido ampliamente descrito que la vitamina C puede regular kinasas. Uno de los primeros blancos descubiertos de vitamina C, fue su relación con la vía de NF- κ B. En esta vía, vitamina C tiene una función inhibitoria, debido a que estudios realizados en células endoteliales, demostraron que al tratar células con dosis milimolares de AA se genera inhibición NF- κ B en respuesta a TNF- α (Bowie and O'Neill, 2000). En este estudio, los autores también evaluaron la toxicidad generada al suplementar con altas dosis de vitamina C, sin encontrar daños celulares ni peroxidación de lípidos. Además, lograron determinar que la inhibición de la vía NF- κ B no fue debido a la actividad antioxidante de vitamina C, sino más

bien, debido a una inhibición directa sobre IKK (Bowie and O'Neill, 2000, Bowie and O'Neill, 1997, Carcamo et al., 2002, Abhilash et al., 2014). IKK es una kinasa encargada de la fosforilación de I- κ B α , proteína que mantiene a NF- κ B-p65 retenido en el citoplasma. La fosforilación I- κ B α , es una señal para que ésta proteína sea degradada vía proteasomal, permitiendo que NF- κ B-p65 quede libre y pueda trasladarse al núcleo, desencadenando la activación génica (Malek et al., 2007, Engelmann et al., 2014). De esta manera, se introdujo en la literatura el concepto que AA era regulador de la actividad kinasa de IKK. Sin embargo, estudios posteriores lograron determinar que AA no tiene acción sobre esta kinasa (Carcamo et al., 2004). Interesantemente, se demostró que DHA era el regulador de IKK, debido a que se une directamente a la esta kinasa inhibiéndola, controlando de esta manera la actividad de NF- κ B (Carcamo et al., 2004). Esto se logró determinar a través de experimentos de inmunoprecipitación mediante p-I- κ B α -GST, donde se utilizaron los derivados de vitamina C, AA, DHA, ácido oxálico y ácido treónico, encontrándose que solo el tratamiento con DHA tenía la función inhibitoria de la fosforilación de I- κ B α , y que esta inhibición era producto de que DHA bloquea directamente la actividad de IKK α , IKK β y p38 (Carcamo et al., 2004, Carcamo et al., 2002). Con esta evidencia, los autores concluyeron que vitamina C tiene una acción dual frente a ROS; por una parte, AA cumpliría su función antioxidante neutralizando ROS. Por otra parte, esto generaría DHA, el cual bloquearía la activación de NF- κ B, involucrando a vitamina C en procesos de señalización que controlan respuestas inflamatorias y de muerte celular entre otras.

Respecto a la función de la vitamina C en el SNC, su rol más conocido es el de agente antioxidante, siendo de gran relevancia para la mantención de las funciones cerebrales y la protección de las estructuras del SNC, ya que el cerebro es uno de los órganos con la tasa metabólica más alta, encontrándose sometido a grandes niveles de estrés oxidativo (Rice, 2000). Cuando AA realiza su función antioxidante en la neurona se genera DHA, el cual es liberado al medio extracelular (Cisternas et al., 2014). Sin embargo, en condiciones fisiológicas DHA es prácticamente indetectable en el SNC, mientras que la concentración de AA se mantiene constante (May, 2012). De este modo, deben existir mecanismos eficientes de reciclaje de vitamina C en el SNC para mantener los niveles AA estables. No obstante, AA solo puede ser incorporado por las neuronas debido a que expresan SVCT2, lo que limitaría la acumulación de vitamina C en el cerebro. De manera interesante, y a pesar de la ausencia de SVCT2, los astrocitos igualmente pueden acumular AA intracelularmente, mediante la incorporación de DHA a través de los GLUT1/3 (Cisternas et al., 2014, Astuya et al., 2005). Cuando los astrocitos incorporan DHA, rápidamente lo reducen hasta AA de manera intracelular (Korcok et al., 2003). Así, el reciclaje de vitamina C toma importancia fisiológica debido *efecto bystander*. El reciclaje de vitamina C por *efecto bystander*, explica que DHA puede ser generado extracelularmente por oxidación de AA, acumulando DHA localmente (Nualart et al., 2003). De este modo, la neurona puede realizar eflujo local de DHA o la microglía puede generar DHA extracelularmente frente a una respuesta inflamatoria. De este modo, el DHA puede ser incorporado por los astrocitos a través de transportadores de glucosa acumulando AA de forma independiente de SVCT2, gracias a la reducción de DHA intracelular. En este

escenario, el reciclaje de vitamina C por *efecto bystander* se convierte en un mecanismo universal de incorporación de vitamina C en el cerebro y, además, explicaría por qué en condiciones fisiológicas el DHA es prácticamente indetectable. Cabe destacar, que todas las células pueden incorporar vitamina C por esta vía, pero no todas las células pueden llevar a cabo el proceso de reducción de DHA hasta AA de manera eficiente. Este parámetro permite diferenciar 2 poblaciones celulares: por una parte, células con alto poder reductor, que son capaces de reciclar y acumular grandes concentraciones de AA, sin comprometer su estado redox o metabólico, por ejemplo, los astrocitos (Korcok et al., 2003, Daskalopoulos et al., 2002). Por otro lado, células con bajo poder reductor, que al reciclar vitamina C comprometen su estado redox y metabolismo por acumulación de DHA, por ejemplo, neuronas (Song et al., 2001, Garcia-Krauss et al., 2015). Esta clasificación de las poblaciones celulares capaces/incapaces de reciclar vitamina C toma relevancia fisiológica nuevamente en 2 contextos, el primero en contexto cerebral en condiciones normales y patológicas, debido a que en condiciones normales el astrocito mantiene las concentraciones de AA estables, pero si el astrocito falla en reciclar vitamina C se acumula DHA desencadenando muerte neuronal (Garcia-Krauss et al., 2015) como se resume en la Figura 1. Fisiológicamente, el acoplamiento entre la neurona y el astrocito permitiría mantener la concentración de AA constante en el SNC (Ferrada et al., 2017).

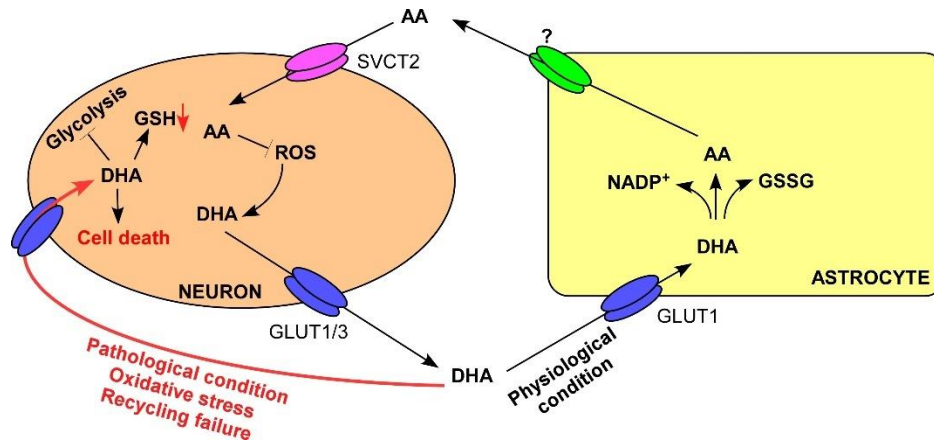


Figura 1. Reciclaje de vitamina C entre neurona y astrocito en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

En condiciones fisiológicas, AA eficientemente reciclado por los astrocitos para su uso en la neurona. En condiciones fisiopatológicas, puede existir una falla en el reciclaje de vitamina C que favorecería la acumulación intracelular de DHA en la neurona. *Modificado de (Ferrada et al., 2017).*

Isquemia y reperusión cerebral.

Durante el transcurso del año 2016, el gobierno de Chile puso especial énfasis en los ataques cerebrovasculares, realizando diversas campañas informativas para detectar los síntomas tempranamente. Debido a que los datos del ministerio de salud (MINSAL) indican lo siguiente: “El ataque cerebrovascular (ACV) es la principal causa de muerte en Chile, con 9.004 fallecidos el año 2013, lo que corresponde a una persona por hora. Se calcula que anualmente hay 24.964 casos nuevos, por lo que hoy en día en Chile hay 69 casos cada día. Además, es la segunda causa de mortalidad prematura en Chile, con 2.310 defunciones el 2013 en personas entre 30 y 69 años (IHME 2013) y la primera causa específica de años de vida saludables perdidos por discapacidad y muerte prematura (AVISA) en mayores de 74 años. Por todo lo anterior, el ACV se constituye como un problema crítico de Salud Pública (26 de octubre de 2016 http://web.minsal.cl/ataque_cerebral/)”. Más aún, según cifras de la OMS: “La principal causa de mortalidad en el mundo son la cardiopatía isquémica y el accidente cerebrovascular, que ocasionaron 15 millones de defunciones en 2015 y han sido las principales causas de mortalidad durante los últimos 15 años. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>)”.

El daño isquémico ocurre cuando uno o más vasos sanguíneos son ocluidos, impidiendo el flujo sanguíneo normal hacia el cerebro desencadenando deprivación de oxígeno y glucosa (Kalogeris et al., 2012, Prabhakaran et al., 2015). El oxígeno es vital para la viabilidad neuronal, debido a que está involucrado en los procesos de generación de energía aeróbica, por lo que la restitución del flujo sanguíneo en

un paciente isquémico es crucial para su supervivencia (Zhang et al., 2014, Tsivgoulis et al., 2014). La restitución del flujo sanguíneo cerebral se conoce como reperfusión, y permite que él o los vasos sanguíneos ocluidos restauren su función normal. Para llevar a cabo la reperfusión, se utilizan fármacos activadores de plasminógenos, que permiten remover el coagulo cerebral (Zhang et al., 2014, Tsivgoulis et al., 2014, Jung et al., 2010). Sin embargo, la entrada masiva de oxígeno al cerebro desencadena un aumento de ROS (especies reactivas de oxígeno), debido a la abrupta restitución del metabolismo celular y de enzimas pro-oxidantes que utilizan oxígeno como sustrato, desencadenando muerte neuronal (Chen et al., 2011b, Jung et al., 2010, Chen et al., 2011a). Dentro de las ROS que se generan durante un período de isquemia y reperfusión (IR) se encuentran, anión súper-óxido (O_2^-), peroxinitritos ($ONOO^-$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo este último una de las ROS que se producen y acumulan en mayor concentración en el SNC durante un periodo de IR (Paspalj et al., 2015, Chen et al., 2011b, Hyslop et al., 1995, Lafemina et al., 2006).

Hasta la fecha, se han diseñado 912 fármacos (con resultados positivos en animales), de los cuales 114 se seleccionaron para ser testeados en humanos (O'Collins et al., 2006). Todo esto, con el objetivo de prevenir la muerte neuronal debido al daño producido durante IR, dentro de estos inhibidores se incluyen antagonistas de NMDA, inhibidores de apoptosis, agonistas de GABA entre otros. Desafortunadamente, al ser probados en humanos todos han fallado (O'Collins et al., 2011b, O'Collins et al., 2012, Chacon et al., 2008, O'Collins et al., 2006). Además, se han utilizado terapias que incluyen el uso de antioxidantes, entre los

cuales destaca la administración endovenosa de la forma oxidada de vitamina C, DHA (Huang et al., 2001), obteniendo resultados protectores en modelo murino. Los autores atribuyen este efecto debido a que DHA difunde en todas las células, y por lo tanto podría ser incorporado a través de la barrera hematoencefálica rápidamente, para luego ser reducido intracerebralmente hasta AA, siendo la generación de AA la que cumpliría una función protectora. No obstante, cuando el mismo grupo de trabajo llevó este estudio a una fase preclínica, en un modelo primate (babuinos), a los cuales se les indujo IR y se administró DHA endovenoso, no se observó ningún efecto protector (Ducruet et al., 2011). Al mismo tiempo, mientras se postulaba que DHA podría ser usado como fármaco protector durante IR, otros grupos de investigación llevaban a cabo experimentos donde se permitía que las neuronas acumularan AA, para posteriormente someterlas a privación de oxígeno y glucosa *in vitro* o estrés oxidativo inducido por glutamato *ex vivo*, demostrando que bajo condiciones de IR experimentales y en ausencia de astrocitos, AA (o DHA) actúa como un prooxidante y causa muerte neuronal, por un mecanismo que induce peroxidación de lípidos y consumo de GSH (glutati6n) (Song et al., 2002, Song et al., 2001, Song et al., 1999).

2. Muerte neuronal durante isquemia y reperfusion.

Los estudios sobre el infarto cerebral se remontan a 1559 AD, cuando se estudiaban los fenómenos que ocurrían al presionar las arterias carótidas en humanos (O'Collins et al., 2011a). Desde ese entonces hasta la fecha, poco se ha logrado avanzar respecto a prevenir la muerte cerebral que ocurre debido a esta

patología. El daño neuronal que ocurre durante IR, se debe a una compleja y variada vía de transducción de señales fisiopatológicas que tienen su origen en el “core” isquémico, y diseminan hasta la zona de penumbra y comienzo de la oliguemia (O'Collins et al., 2006, Tsivgoulis et al., 2014, Zhang et al., 2014). Para estudiar la muerte celular que ocurre durante IR *in vivo*, se han estandarizado diversos métodos los cuales incluyen: IR focal mediante acción mecánica (clips, suturas intraluminales, ligamiento), térmica (electro-cauterización), embolia (microesferas, coágulos de fibrina) y química (endotelina-1, ácido araquidónico) (O'Collins et al., 2006, Degterev et al., 2005). Por otra parte, IR global inducida por deficiencia respiratoria (asfixia, CO₂), térmica (electro-cauterización) y mecánica (decapitación, ligación, clips) (O'Collins et al., 2006). Sin embargo, de especial interés siempre ha sido el uso de modelos *in vitro* para evitar el sacrificio innecesario de animales durante la estandarización de fármacos o estudios de vías de transducción de señales relacionadas a los mecanismos de muerte neuronal durante IR. Dentro de los modelos *in vitro* más utilizados se encuentran: inducción de apoptosis (estaurosporina, etopósido, deprivación de suero), inflamación (LPS), isquemia (deprivación de oxígeno y glucosa, hipoxia, azida de sodio) y modelos de estrés oxidativo (H₂O₂, hemoglobina, depleción de glutatión) (O'Collins et al., 2006, Wang et al., 2002). Durante mucho tiempo (y hasta la fecha en varios casos), el principal esfuerzo estuvo en impedir la apoptosis cerebral durante IR. Debido a que la mayoría de los modelos *in vitro* inducen muerte celular por apoptosis (deprivación de oxígeno y glucosa, deprivación de suero, Ca⁺², hipoxia, entre otros) (Qu et al., 2016, Li et al., 2016, Zhao et al., 2017, Zhao et al., 2015, Cao et al., 2016, Cui et al., 2017, Sun et al., 2017, Xia et al., 2018). Además, los resultados *in vitro* se

reproducían de manera exitosa en modelos *in vivo*, debido a que cuando se inducía IR en animales se detectaba un gran número de células en apoptosis mediante la marca de TUNEL (Terminal transferase dUTP nick-end labeling), y al utilizar inhibidores de caspasas disminuía la marca para TUNEL (Lewerenz et al., 2018, Endres et al., 1998, MacManus et al., 1993, Gill et al., 2002). No obstante, en estos estudios no se realiza ni se muestra una correlación de la histología (disminución de la marca de TUNEL) versus déficit funcionales. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que diversas vías de muerte, independientes de caspasas, tales como necrosis, necroptosis, parthanatos, necrosis mediada por AIF (apoptosis induced factor) inducen fragmentación del DNA y marca positiva para TUNEL (Xu et al., 2016, Lewerenz et al., 2018, Yuan, 2009, de Torres et al., 1997, Dong et al., 1997). Al mismo tiempo, diversos estudios han demostrado que las neuronas post IR tienen morfología necrótica, y que en realidad son muy pocas las neuronas que presentan activación de caspasas (Zhu et al., 2005, Hu et al., 2000, Adhami et al., 2006). Mas aún, en animales KO para caspasa-3 y CAD (Caspase-activated DNase) no se previene la muerte neuronal durante IR (Koike et al., 2008). Actualmente, se sabe que el cerebro adulto y las neuronas son refractarias a la apoptosis, debido a que sobre expresan proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2) y no expresan BAX, BAK, caspasa 8/3 en condiciones fisiológicas (Sarosiek et al., 2017, Wang et al., 2002, Liu et al., 2004, Kole et al., 2013, Yamanaka et al., 2011, Zhu et al., 2012). De este modo, es una inconsistencia estudiar los modelos *in vitro* que inducen apoptosis (deprivación de oxígeno y glucosa, hipoxia, deprivación de suero, etc.), debido a que las características de desintegración neuronal al igual que las vías de transducción de señales no serán reproducidas *in vivo*.

Dentro de los modelos *in vitro*, para el estudio de la muerte neuronal durante IR que inducen características de desintegración necrótica principalmente se encuentran la hemoglobina (Wang et al., 2002, Yuan et al., 2016), y el H₂O₂ (O'Collins et al., 2006, Schroder and Eaton, 2008, Gough and Cotter, 2011). Sin embargo, el uso de hemoglobina es un excelente modelo de infarto hemorrágico (Wang et al., 2002). Al mismo tiempo, el infarto hemorrágico es el más letal pero el de menor incidencia, 24% de los infartos cerebrales (van Asch et al., 2010). De esta forma, la hemoglobina no es el mejor modelo para inducir IR *in vitro*. En este escenario, el mejor agente inductor de estrés oxidativo *in vitro* que simula lo que ocurre durante IR (no hemorrágico) *in vivo* sería H₂O₂. Esto se debe a que se considera que la administración exógena de 0.01–1 mM de H₂O₂ es fisiológicamente relevante, debido a que representa un modelo de estrés oxidativo que reproduce las condiciones y respuesta celular frente a daño producido por IR (Schroder and Eaton, 2008, Vanden Berghe et al., 2010, Gough and Cotter, 2011).

Actualmente, existen nuevas y emergentes formas de muerte celular con características de desintegración necrótica que podrían ser interesantes blancos terapéuticos para prevenir la muerte durante IR. Entre ellas se encuentran, anoikis, autosis, necrosis mediada por MTP (*Mitochondrial permeability transition*) pyroptosis, parthanatos, ferroptosis y necroptosis entre otras (Galluzzi et al., 2018). De especial interés durante IR no hemorrágica es la necroptosis, debido a que se ha demostrado que la inhibición de esta vía con el uso de una pequeña molécula sintética llamada Necrostatina -1 (Nec-1), previene parcialmente (30% de rescate) la muerte neuronal durante IR (Degterev et al., 2005).

3. Señalización y adaptadores de muerte celular.

Las vías de señalización de muerte celular dependen principalmente de la secreción de citoquinas, dentro de estas la principal es TNF- α . TNF- α una citoquina pro inflamatoria maestra que desencadena diversas respuestas dependiendo del contexto celular (Croft et al., 2013). La respuesta canónica de la unión de TNF- α a su receptor (TNFR) es inducir señales de supervivencia mediante la activación de la vía de NF- κ B (Yi et al., 2018). Sin embargo, en otros contextos puede inducir muerte celular (Dondelinger et al., 2017, Degterev et al., 2005, Amin et al., 2018, Annibaldi et al., 2018). En el contexto de supervivencia, la unión de TNF- α a TNFR, induce el reclutamiento de las proteínas adaptadoras TRADD (Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain), TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2) y RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) en la membrana plasmática, a este complejo se le conoce como complejo I (Figura 2A) (Heger and Dixit, 2018). Para evitar que las proteínas adaptadoras induzcan muerte celular existe una fina regulación del complejo I, donde el principal punto de control está dado por la inhibición de la apoptosis e inactivación de RIPK1 (Vanden Berghe et al., 2015). Para mantener inhibida la apoptosis dependiente de caspasas en respuesta a TNF- α , al complejo I se unen las proteínas inhibidoras de la apoptosis 1 y 2 (cIAP1/2) (Vanden Berghe et al., 2014). Con el objetivo de prevenir la muerte celular (apoptótica o necroptótica) dependiente de RIPK1, esta proteína es inhibida por fosforilación en el complejo I por IKK α/β (Figura 2A) (Dondelinger et al., 2015). Al mismo tiempo, en el complejo I se encuentra la ubiquitina E3 ligasa o también

conocida como LUBAC (linear ubiquitin chain assembly complex), que favorece la generación de largas cadenas de ubiquitina en RIPK1 para inducir su degradación proteasomal o mantenerla reclutada e inhibida en el complejo I (Heger and Dixit, 2018). De manera interesante, la ubiquitinación del complejo I por LUBAC, induce el reclutamiento de IKK ϵ (*IkB kinasa epsilon no-canónica*) y TAK1 (transforming growth factor beta-activated kinase 1). El reclutamiento de IKK ϵ y TAK1, de igual forma que IKK α/β , induce inhibición por fosforilación de RIPK1 (Lafont et al., 2018). En este escenario, la inhibición de RIPK1 por fosforilación y ubiquitinación favorece la supervivencia, debido a que induce el reclutamiento del adaptador NEMO (NF- κ B essential modulator) al complejo I (Figura 2A) (Heger and Dixit, 2018). Con estas proteínas presentes en el complejo I, se activa la respuesta canónica dependiente de NF- κ B para inducir señales de inflamación, supervivencia y procesos antimicrobianos dependientes de TNF- α (Figura 2B) (Pasparakis and Vandenabeele, 2015).

Sin embargo, en un contexto de muerte celular las cadenas de ubiquitina de RIPK1 son removidas por las deubiquitininas A20 y CYLD (Cylindromatosis) (Declercq et al., 2009), lo que induce el desensamblaje del complejo I desde la membrana plasmática y permite la formación del complejo II en el citosol. En estas condiciones, existen 3 escenarios posibles: primero, formación del complejo IIa dependiente de TRADD (Figura 2C), el que induce reclutamiento de procaspasa 8 y FADD (Fas-associated protein with death domain), en estas condiciones caspasa 8 se activa y cliva a RIPK1, induciendo apoptosis extrínseca (Pasparakis and Vandenabeele, 2015). En el segundo escenario posible, la procaspasa 8 se encuentra inhibida o ausente y ocurre formación del complejo IIb dependiente de

RIPK1 e independiente de TRADD (Grootjans et al., 2017). En este contexto, la presencia de RIPK1 en complejo IIb induce el reclutamiento de RIPK3, FADD y procaspasa 8 induciendo necroptosis (Figura 2D). Sin embargo, dependiendo de los estímulos, la proteína FLIP_L (FADD-like interleukin (IL)-1 β -converting enzyme (FLICE)-inhibitory protein) puede ser reclutada al complejo IIb inhibiendo la autofosforilación de RIPK1/3 y la necroptosis (Pasparakis and Vandenabeele, 2015), favoreciendo la activación de apoptosis dependiente de RIPK1. El ultimo escenario posible, es la formación del “necrosoma” (Figura 2E), que igualmente depende de la presencia de RIPK1 en el citosol, lo que induce el reclutamiento de RIPK3 y MLKL, lo que induce muerte por necroptosis (Chen et al., 2014).

4. Muerte celular por necroptosis

La necroptosis es una vía que recientemente se está caracterizando y determinando sus alcances a nivel fisiológico y fisiopatológico. Antiguamente, la muerte celular se clasificaba en 2 tipos: muerte celular programada, apoptosis; y muerte celular accidental, necrosis (Galluzzi et al., 2018). Actualmente, la necrosis corresponde a una característica morfológica común de desintegración de diversas vías de muerte (incluida la apoptosis secundaria), y la muerte accidental solo recibe el nombre de “muerte celular accidental” (ACD por sus siglas en inglés), y corresponde a un proceso de muerte instantáneo e incontrolable causado por condiciones extremas (Galluzzi et al., 2018). El estudio de la necroptosis se remonta al año 2005 cuando el grupo del laboratorio de Junying Yuan descubrió una molécula capaz de inhibir la “necrosis”, la necroptain-1 (nec-1) (Degterev et al.,

2005). Posteriormente, se logró determinar que el grupo de las necrostatinas tenían como blanco específico la inhibición de la fosforilación de las serinas 14/15/20/161/166 (entre otras menos caracterizadas) de la proteína RIPK1 (Degterev et al., 2008, Shan et al., 2018). Luego de determinar que RIPK1 regulaba la muerte celular por necroptosis, 3 grupos independientes reportaron y caracterizaron otra proteína que era necesaria para la ejecución de esta vía: RIPK3 (Cho et al., 2009, Zhang et al., 2009, He et al., 2009). Mediante el uso de animales KO y genome-wide siRNA screen se reveló que RIPK3 dimerizaba con RIPK1 desencadenando una alteración metabólica que permitía un cambio de apoptosis a necroptosis en respuesta a TNF- α (Zhang et al., 2009, He et al., 2009). De manera interesante, se determinó que para que ocurra el cambio de apoptosis a necroptosis en respuesta a TNF- α , era necesario que caspasa-8 (Casp8) estuviese inhibida o ausente (Wang et al., 2008). Además, se caracterizó que en respuesta a TNF- α , y al mismo tiempo que RIPK1 dimerizaba con RIPK3, ocurría una interacción entre RIPK1-RIPK3-Casp8 y los adaptadores de muerte TRADD y FADD (Wang et al., 2008). A este conjunto de proteínas (RIPK1/RIPK3/Casp8/TRADD/FADD) se le denominó complejo IIb, para diferenciarlo de la vía canónica de activación de apoptosis en respuesta a TNF- α , compuesto por Casp8/FADD/TRADD denominado complejo IIa (Pasparakis and Vandenabeele, 2015, Vanden Berghe et al., 2015) (Figura 2C, 2D). Sin embargo, posteriormente se determinó la existencia de la proteína ejecutora de necroptosis, MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like*), la cual es activada por fosforilación dependiente de RIPK3 (Murphy et al., 2013, Sun et al., 2012). El descubrimiento de MLKL permitió definir que el complejo IIb no era

necesario para la ejecución de necroptosis, debido a que existencia de otro complejo llamado “necrosoma” compuesto solo por RIPK1/RIPK3/MLKL (Figura 2E) (Pasparakis and Vandenabeele, 2015, Murphy et al., 2013). Es importante destacar, que la formación del complejo IIb o del necrosoma, son capaces de desencadenar muerte por necroptosis en respuesta a TNF- α , u otros estímulos como infecciones virales, LPS, dsRNA, ROS, ZBP1 entre otros (Shembade et al., 2010, Galluzzi et al., 2018). La activación de MLKL por fosforilación induce formación de tetrámeros y su traslocación a la membrana plasmática (Sun et al., 2012, Hildebrand et al., 2014). La traslocación de MLKL a la membrana plasmática trae como consecuencia la exposición de fosfatidil serina (de igual manera que la apoptosis, por lo tanto la marca con anexina V por sí sola no puede discriminar entre apoptosis y necroptosis) y formación de poros que desencadenan estrés osmótico y muerte mediante explosión celular (Gong et al., 2017, Yoon et al., 2017, Vanden Berghe et al., 2010). El deceso celular por la vía necroptótica dependiente de MLKL, induce la liberación de DAMP (*Damage-associated molecular pattern*) los cuales inducen inflamación, mayor activación de necroptosis y de otras vías de muerte paralelas (Zhang et al., 2018). De este modo, la necroptosis se ha transformado en uno de los principales blancos terapéuticos para prevenir la muerte celular durante IR, debido a que su inhibición probablemente también disminuya otros mecanismos de muerte asociados a ella.

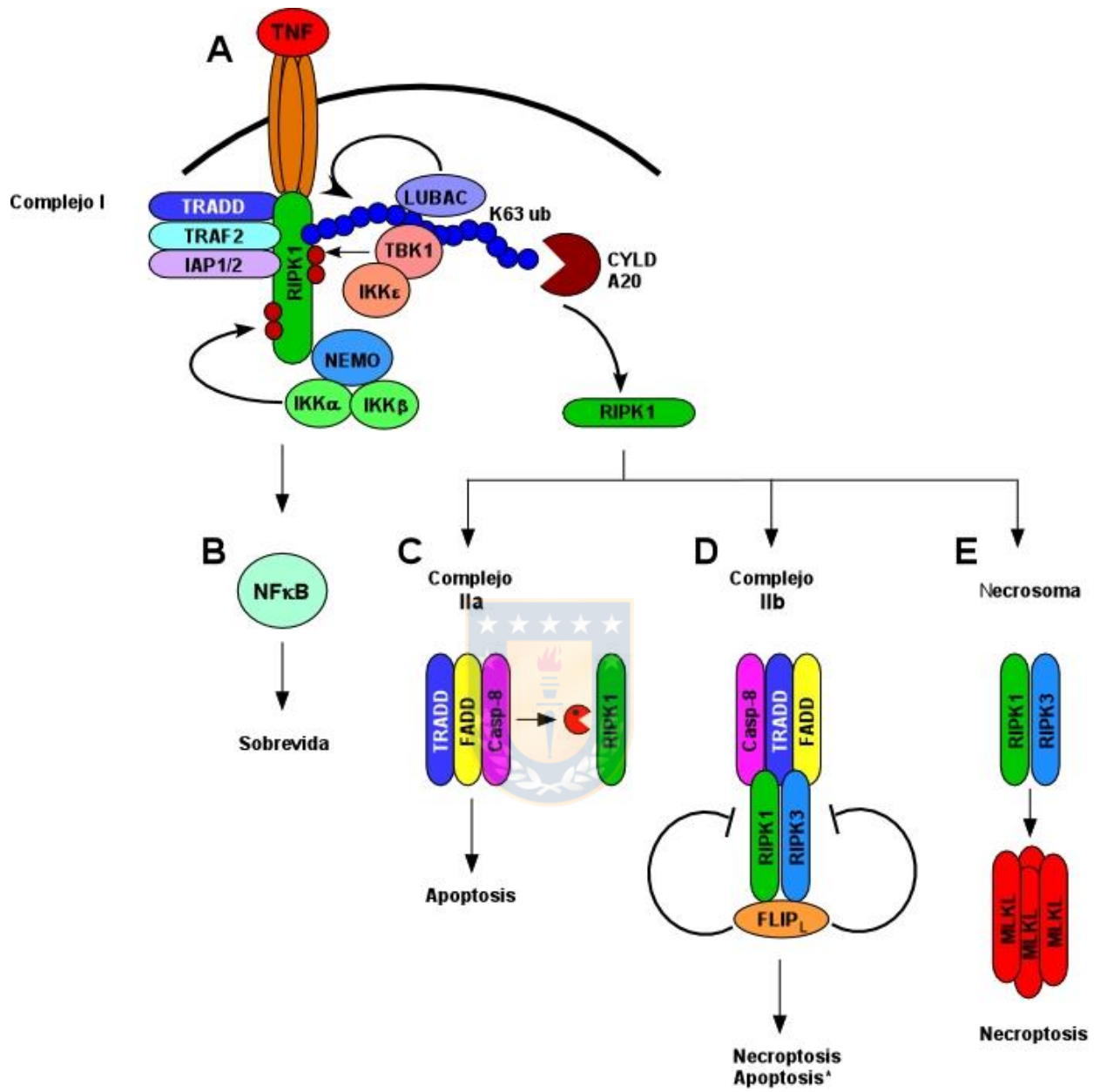


Figura 2. Vías de muerte regulada por TNF- α .

A. La unión de TNF- α a su receptor induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras y la formación del complejo I. **B.** La inhibición de RIPK1 en el complejo I, induce la activación canónica de NF κ B y señales de supervivencia. **C.** La deubiquitinación de RIPK1 permite su desensamblaje del complejo I y la formación del complejo(s) II citosólico. **D.** La formación del complejo IIb en respuesta a TNF- α puede inducir apoptosis y/o necroptosis. **E.** La formación del necrosoma induce reclutamiento de RIPK1/3 y necroptosis. * En ausencia o inactivación de MLKL, la formación del complejo IIb puede inducir apoptosis dependiente e independiente de FLIP_L. Los círculos rojos en RIPK1 indican fosforilaciones de tipo inhibitorio.

5. Regulación de la necroptosis través de RIPK1

Hasta la fecha, se ha determinado que RIPK1 es la proteína crítica que regula los mecanismos de muerte celular de apoptosis y necroptosis (Meng et al., 2018, Amin et al., 2018, Remijnsen et al., 2014, Degterev et al., 2008). La regulación de RIPK1 depende principalmente de 2 factores: ubiquitinación y fosforilación (Degterev and Yuan, 2008, Degterev et al., 2008, de Almagro et al., 2017). La ubiquitinación de RIPK1 depende de la actividad de cIAP1/2 y de LUBAC que actúan como E3 ubiquitina ligasas que catalizan la modificación de K63 en la lisina 115 y 377 de RIPK1 (Bertrand et al., 2008). Por una parte, cIAP1/2 mantienen a RIPK1 ubiquitinada de manera fisiológica, previniendo la apoptosis y la necroptosis debido a que se inhibe su capacidad kinasa de autofosforilación (Figura 2A) (Bertrand et al., 2008). Por el contrario, cuando la ubiquitinación K63 es removida por deubiquitinasas como CYLD o A20, RIPK1 puede auto-fosforilarse y formar parte del complejo IIb o del necrosoma desencadenando apoptosis o necroptosis (Declercq et al., 2009). No obstante, RIPK1 puede estar ubiquitinada K63, pero aún puede inducir muerte por necroptosis dependiente de fosforilación (de Almagro et al., 2017), de este modo el principal mecanismo de regulación de RIPK1 es la fosforilación. Con respecto a los mecanismos de regulación de la fosforilación de RIPK1, estos recién se están comenzando a dilucidar. La vía mejor caracterizada para la activación de RIPK1 es específicamente la fosforilación en la serina 161 y la autofosforilación de la serina 166, ambas blanco de Nec-1, (Shan et al., 2018). Por el contrario, hasta la fecha se sabe que RIPK1 también puede ser inhibida por fosforilación. Dentro las proteínas claves para la inhibición de RIPK1 por fosforilación se encuentra IKK α/β (Dondelinger et al., 2015). La actividad de

IKK α/β sobre RIPK1 es una función independiente de la activación de NF- κ B. Bajo condiciones fisiológicas (ausencia de estímulos de muerte) IKK α/β fosforila directamente a RIPK1 en la(s) serina(s) 321, 332 y 334 de manera inhibitoria, manteniéndola inactiva en la membrana plasmática e impidiendo la formación del complejo Ila, IIb o del necrosoma (Figura 3) (Dondelinger et al., 2015). Por el contrario, cuando el complejo de IKK α/β se encuentra inhibido ocurre una hipofosforilación inhibitoria de RIPK1, esto induce la activación de RIPK1 mediada por la autofosforilación de la serina 166, lo que finalmente desencadena necroptosis o apoptosis descontrolada (Dondelinger et al., 2015). Por otra parte, RIPK1 puede ser inhibida de manera citosólica por MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) (Dondelinger et al., 2017). MK2 inhibe la actividad de RIPK1 por fosforilación directa de las serinas 321 y 336, independiente de la actividad de IKK α/β (Figura 3) (Dondelinger et al., 2017, Jaco et al., 2017). La fosforilación de RIPK1 mediada por MK2 previene la formación del complejo IIb y del necrosoma en el citosol independiente de ligandos de muerte (*control intrínseco de la necroptosis*), debido a que impide que RIPK1 pueda unirse a Caspasa 8 o a FADD (Jaco et al., 2017), previniendo de esta forma la activación de apoptosis o necroptosis (dependiendo del estímulo).

6. Regulación de la necroptosis por vitamina C: AA como inhibidor de apoptosis y DHA como activador RIPK1.

Las vías de señalización que regulan la apoptosis y la necroptosis están estrechamente relacionadas. Generalmente, ambas vías actúan como feedback negativo del otra. De este modo, cuando los ligandos de muerte como TNF- α o FasL se unen a su receptor activan el complejo Ila, como consecuencia Casp-8 se activa y cliva a RIPK1 en el aspartato 324, favoreciendo la apoptosis (Figura 2C) (Shan et al., 2018). Por el contrario, cuando hay estímulos de muerte y las proteínas proapoptóticas como Casp-8 y BAX se encuentra inhibidas o bajamente expresadas y/o las proteínas anti-apoptóticas como las de la familia Bcl-2 están sobre expresadas, se activa necroptosis vía complejo IIb o necrosoma (Christofferson et al., 2014). De manera interesante, la forma reducida de la vitamina C, AA, ha sido ampliamente reportado como un inhibidor de la apoptosis, debido a que disminuye la actividad de caspasa 3, caspasa 8, incrementa los niveles de Bcl-2, previene la liberación de citocromo C desde la mitocondria y disminuye la expresión de BAX (inhibición de la apoptosis intrínseca) (Guaiquil et al., 2004, Dhar-Mascareno et al., 2005, Han et al., 2007, Perez-Cruz et al., 2003, Perez-Cruz et al., 2007). De este modo, en condiciones fisiológicas AA es un potente inhibidor de la apoptosis. Por el contrario, también se ha descrito que vitamina C es un inductor de muerte en células tumorales, con la particularidad que la mayoría de los estudios han demostrado que el efecto de muerte es por necrosis (Tian et al., 2014, Evans et al., 2014, Chen et al., 2005, Chen et al., 2008). Durante mucho tiempo, se ha asumido que la “vitamina C” (sin discriminar el estado redox AA/DHA) puede actuar como prooxidante e

inducir muerte solo por estrés oxidativo. Sin embargo, la literatura actual indica que a que existe un mecanismo de transducción de señales regulado específicamente por la forma oxidada de la vitamina C: DHA. Los primeros estudios que postularon a la vitamina C como regulador de vías de transducción de señales fueron activando a NF- κ B con TNF- α , determinando que la vitamina C era un potente inhibidor de esta vía (Bowie and O'Neill, 1997, Bowie and O'Neill, 2000). Posteriormente, se determinó que DHA bloquea la activación de NF- κ B por ser un potente y específico inhibidor de la actividad kinasa de IKK α/β y de p38 en respuesta a TNF- α (Figura 3B) (Carcamo et al., 2002, Carcamo et al., 2004). Más aún, DHA también es un inhibidor del ciclo celular por inducir arresto en la fase G2/M, al retrasar la activación de la ciclina B-cdc2 (Bijur et al., 1999). Al mismo tiempo, DHA consume el glutatión (GSH), es un potente inhibidor de la glicólisis y estimula la vía de las pentosas para poder recuperar la capacidad redox de las células (Cisternas et al., 2014, Puskas et al., 2000). En este escenario, DHA es un potente inhibidor del metabolismo, del ciclo celular y de las señales de sobrevida, al inhibir la activación de NF- κ B. Como consecuencia de la producción y/o acumulación de DHA en la célula, finalmente se desencadena muerte celular (Garcia-Krauss et al., 2016, Yun et al., 2015). En línea con esta noción, y como se ha descrito anteriormente, hay una estrecha relación entre los efectos del DHA y la regulación de la necroptosis a través de RIPK1. Esto se debe a que en condiciones fisiológicas la vitamina C se encuentra como AA, por lo tanto, IKK α/β se encuentra activa, manteniendo a RIPK1 fosforilada de manera inhibitoria en la membrana plasmática (Dondelinger et al., 2015) (*control extrínseco de la necroptosis*). Al mismo tiempo, en condiciones fisiológicas p38 activa por

fosforilación a MK2, y MK2 fosforila de manera inhibitoria en el citoplasma a RIPK1 (Dondelinger et al., 2017, Jaco et al., 2017) (*control intrínseco de la necroptosis*). De manera interesante, DHA inhibe de manera específica a IKK α/β y a p38 (Carcamo et al., 2002, Carcamo et al., 2004). Acumulando evidencia, DHA tendría como blanco principal la activación de RIPK1 (extrínseca e intrínseca) por prevenir sus fosforilaciones inhibitorias. Al mismo tiempo, AA pre-condiciona a las células a la necroptosis por ser un potente inhibidor de la apoptosis. De este modo, en condiciones fisiopatológicas donde la oxidación de AA a DHA se ve favorecida, DHA induciría muerte celular principalmente por necroptosis. Este efecto dual de la vitamina C en la supervivencia, sería dramático en células que acumulen elevadas concentraciones de vitamina C, que tengan baja tasa apoptótica y que se enfrenten a condiciones de estrés oxidativo agudo. Desafortunadamente, las neuronas son las células que más AA acumulan en condiciones fisiológicas, hasta 10mM (Nualart et al., 2014), y son refractarias a la apoptosis (Sarosiek et al., 2017). Además, la patología de mayor incidencia en el mundo que induce el mayor estrés oxidativo agudo es el infarto cerebral, y se ha demostrado que en estas condiciones el AA es oxidado hasta DHA (Pedersen et al., 1998) y el principal mecanismo de muerte es la necroptosis (Degterev et al., 2005). Sin embargo, hasta la fecha se desconocen los mecanismos que regulan el inicio de la necroptosis, o cual es el “*switch*” que permite el cambio de apoptosis a necroptosis. De este modo, DHA es un interesante blanco terapéutico para realizar un posible avance en la comprensión de los mecanismos de muerte que ocurren durante IR.

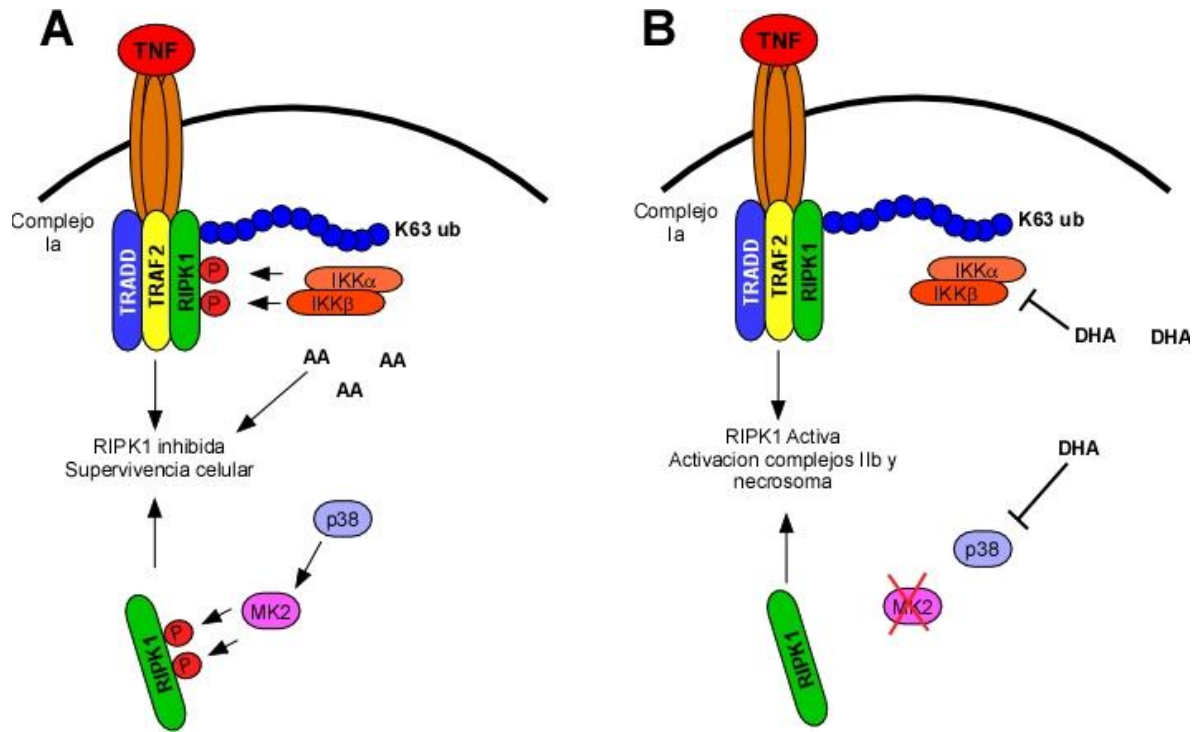


Figura 3. Regulación de RIPK1 por DHA.

A. Mecanismo propuesto para la favorecer la supervivencia celular a través de la inactivación de RIPK1 por AA. En condiciones fisiológicas AA favorece la supervivencia celular, debido a que IKK α/β mantiene a RIPK1 fosforilada de manera inhibitoria y reclutada en complejo I. Por otra parte, en ausencia de DHA, MK2 mantiene a RIPK1 inactiva por fosforilación en el citoplasma, previniendo su reclutamiento por los adaptadores de muerte. **B.** Mecanismo propuesto para de la activación citosólica de RIPK1 por DHA. En condiciones de estrés oxidativo, la acumulación de DHA inhibe a IKK α/β por lo tanto, RIPK1 puede ser activada para inducir la formación de los complejos citosólicos inductores de muerte. Por otra parte, DHA puede inhibir al activador de MK2, p38, por lo tanto, DHA permite el reclutamiento de RIPK1 a los adaptadores de muerte en la membrana plasmática.

II. Hipótesis de trabajo

El infarto cerebral ocupa la principal causa de muerte a nivel mundial. Gran parte de los pacientes que sufren esta patología, presentan sintomatología isquémica por lo que son tratados con fármacos inductores de reperfusión. El efecto de isquemia y reperfusión genera un aumento dramático de muerte neuronal, debido a una elevada producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y a una disminución de los niveles de ácido ascórbico (AA), el principal antioxidante no enzimático del sistema nervioso central. La producción de H_2O_2 durante un periodo de isquemia y reperfusión, trae como consecuencia un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la neurona. Las ROS son neutralizadas por AA intracelular, el que se oxida hasta ácido deshidroascórbico (DHA), acumulándose en la neurona con efectos desconocidos.

En nuestro laboratorio hemos logrado determinar que la neurona oxida rápidamente AA hasta DHA, el cual tiene efectos directos sobre el metabolismo neuronal deteniendo la glicolisis, consumiendo glutatión y aumentando la vía de las pentosas. Estas alteraciones metabólicas pueden traer como consecuencia muerte neuronal, por lo que en el sistema nervioso es necesaria la presencia de células recicladoras de vitamina C para evitar la acumulación de DHA. Dicha función recicladora estaría a cargo de los astrocitos, en los cuales se ha demostrado que son capaces de realizar influjo de DHA, reducción hasta AA y eflujo de éste.

Sin embargo, durante un evento de isquemia y reperfusión, donde hay acumulación de H_2O_2 en el medio extracelular, la neurona generaría DHA liberándolo al medio extracelular. El DHA sería incorporado por los astrocitos para hacer eflujo de AA, pero el AA se oxidaría en el medio extracelular por la presencia de H_2O_2 , desencadenando un reciclaje autocrino de DHA en la neurona y finalmente muerte neuronal. La literatura actual, ha determinado que cuando ocurre isquemia y reperfusión cerebral, las células neuronales mueren por un mecanismo independiente de caspasas, con características de desintegración necrótica, llamado necroptosis. Hasta la fecha se ha logrado determinar que la inhibición de la vía NF- κ B, el consumo de glutatión y el aumento en la concentración de ROS favorecen la ejecución de necroptosis, pero no se conoce cuál o cuáles son las señales desencadenantes de dicho fenómeno. Sin embargo, se conoce que DHA es un inhibidor específico de la vía NF- κ B, consume rápidamente el glutatión en las neuronas y es capaz de aumentar la producción de ROS, por lo que probablemente su generación y acumulación en la neurona durante un cuadro de isquemia y reperfusión sea una señal que pueda desencadenar necroptosis.

En base a los antecedentes expuestos anteriormente, proponemos como hipótesis que **“La producción y acumulación intracelular de ácido deshidroascórbico generado por peróxido de hidrógeno desencadena necroptosis neuronal”**

III. Objetivo General.

- Evaluar el efecto de DHA en la muerte neuronal durante un periodo de isquemia y reperfusión y la función que tienen los astrocitos en la protección este proceso

IV. Objetivos específicos.

1.- Determinar si la generación de DHA, inducido por estrés oxidativo desencadena muerte neuronal y si el astrocito tiene una función protectora al reciclar vitamina C.

2.- Caracterizar la vía de muerte neuronal regulada por DHA.

3.- Determinar el efecto de DHA en un modelo de isquemia y reperfusión “*in vivo*”



V. Materiales y métodos.

1. Animales de experimentación y cultivos celulares utilizados en el desarrollo de la tesis.

En el desarrollo de esta tesis se utilizaron neuronas y astrocitos corticales primarios de rata Sprague-Dawley. Para la obtención de neuronas se utilizaron cortezas de rata embrionaria de 17 días de gestación, mediante la disgregación mecánica del tejido cortical, previa remoción de las meninges, homogeneizando en “medio de plantado” (MEM 10%, 1% de penicilina/Streptomycin) y se sembraron sobre poli-L-lisina durante 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, las neuronas corticales se mantuvieron en medio neurobasal con suplemento B27 por 5 días. Los cultivos fueron tratados con o sin ácido ascórbico (AA) 200 μ M durante 36 horas, suplementando cada 12h a partir de una solución 20mM en PBS estéril frío, preparado en el momento. El cultivo de astrocitos se obtuvo a partir de cortezas de rata post natal de 1 a 3 días, mediante la disgregación mecánica del tejido cortical, previa remoción de las meninges, homogeneizando en DMEM-hg suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/Streptomycin, sembrando a densidades entre 50.000 a 100.000 cél/cm². Los cultivos de astrocitos fueron mantenidos durante 15 días “in vitro”, momento en que se realizaran los estudios pertinentes. Los procedimientos con animales fueron manejados de acuerdo a las normas del National Institutes of Health, Bethesda, MD y por el manual de Bioseguridad de CONICYT. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad, siguiendo las normas de bioseguridad contempladas en el manual respectivo del Comité Nacional de Investigación Científica y Tecnológica

(CONICYT). Además, se utilizaron las líneas celulares N2a (modelo cortical) y HN33.11 (modelo hipocampal). Las células N2a fueron cultivadas en DMEM-F12, suplementado con 5% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/Streptomicina, sembrando a una densidad de 20.000cél/cm². La línea HN33.11 fue cultivada en DMEM-hg, suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de penicilina/Streptomicina, sembrando a una densidad de 100.000cél/cm². Para asegurar cultivos libres de micoplasma, las células fueron tratadas con BM cyclin (Roche, #10799050001). Las líneas celulares, se trataron con o sin AA 200 μM durante 36 horas antes de los análisis, suplementando cada 12h a partir de una solución 10mM en PBS estéril frío, preparado en el momento. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

2. Generación de líneas celulares.

Las líneas celulares N2a-hSVCT2wt-EYFP, N2a-EGFP, HN33.11-hSVCT2wt-EYFP, HN33.11-EGFP fueron producidas mediante infección con partículas lentivirales previamente descritas por nuestro laboratorio (Salazar et al., 2016). En placas de 12 wells, se sembraron 50.000 células N2a o HN33.11 y se permitió la adhesión celular por 12 horas. Luego las células fueron infectadas por las partículas lentivirales que sobre expresan el transportador de vitamina C humano hSVCT2 en fusión a EGFP o que solo sobre expresaban la proteína EGFP. 48 horas post infección, las células fueron tripzinizadas, resuspendidas en medio y mediante cell sorting se aisló el 1% más brillante correspondiente al canal FITC de cada población celular.

La línea celular N2a *mlkl*^{-/-} y N2a *svct2*^{-/-} fueron generadas mediante la tecnología de CRISPR-Cas9. La secuencia gRNA para el codón de inicio de MLKL fue GCACACGGTTTCCTAGACGC, y el gRNA para el codón de inicio de SVCT2 fue TGTAGATCATATCCGACCTC. Las secuencias de gRNA fueron sintetizadas comercialmente en el plásmido *all in one* CAG-Cas9-2a-RFP, Cas9-ElecD (Atum, #pD1321-AP **Figura 4**). Las células N2a fueron sembradas en placas de 6 wells, luego de 12 horas de adhesión las células fueron transfectadas con el plásmido previamente descrito mediante lipofectamina 3000 (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Transcurridas 48 horas de transfección, las células fueron tripzinizadas y resuspendidas en medio completo. Las células positivas para RFP fueron sorteadas en el canal de PE mediante citometría de flujo de célula única a placas de 96 wells. A partir del *sorting* de célula única, se permitió la formación de colonias durante 15 DIV. Posterior a los 15 DIV las colonias fueron expandidas a placas de 6 wells para la expansión y obtención de proteínas. Al menos 3 colonias independientes generadas a partir de 1 clon fueron caracterizadas por western blot para corroborar la generación de líneas celulares KO estables para MLKL y SVCT2. La generación de células HN33.11 KO no fue posible debido a que determinamos que no hay expansión monoclonal de estas células, independiente de la transfección.

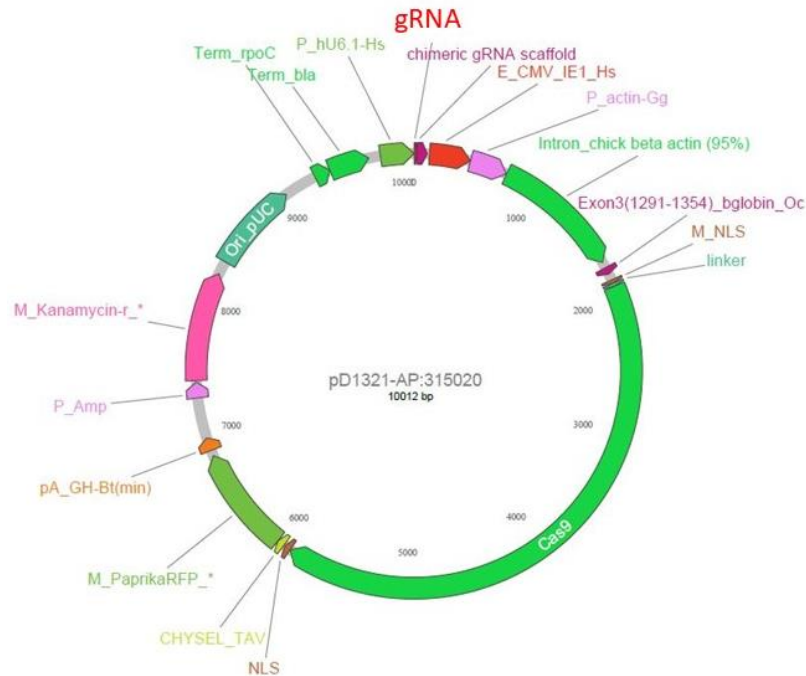


Figura 4. Mapa plásmido all in one CRISPR/Cas9.

Representación esquemática del plásmido para la generación de células KO por CRISPR/cas9. El plásmido contiene el gen de la Cas9 separado del reportero por el péptido 2A (CHYSEL TAV). La presencia del péptido 2A evita que la Cas9 sea una proteína de fusión al reportero, debido a que el ribosoma reconoce al péptido 2A e induce el clivaje de la proteína en síntesis. Por lo tanto, todas las células que expresen el reportero también expresarán la Cas9.

Tabla 1. Compuestos, anticuerpos y reactivos utilizados

Compuesto	Origen	Identificador
Necrostatina-1	Abcam	ab141053
zVAD.FMK	Abcam	ab120382
M-divi-1	Abcam	ab144589
N-acetilcisteína	Abcam	ab143032
Hoechst 33342	Life Technologies	H1399
MitotrackerCMXRos	Life Technologies	M7512
Cellmask	Life Technologies	C10046
Cellrox deep red	Life Technologies	C10422
Phalloidin	Life Technologies	A12379
TO-PRO-3	Life Technologies	T3605
Human TNF- α	Life Technologies	10602HNAE5
Lipofectamine 3000	Life Technologies	L3000015
Ácido ascórbico	Sigma	A4544
Compound 1	SYNkinase	GW806742X
Anti-RIPK1	Cell Signaling Technology	D94C12
Anti-phospho-RIPK1	Cell Signaling Technology	D1L3S
Anti-phospho-MLKL	Cell Signaling Technology	D6H3V
Anti-RIPK3	Merck Millipore	MABC28
Anti-MLKL	Merck Millipore	MABC604
Anti-GLUT1	Merck Millipore	07-1401
Anti-SVCT2	Novus	NBP2-13319
Anti-SVCT2	Santa Cruz biotech.	n/a
Anti-actina	Santa Cruz biotech.	sc-47778
Anticuerpos secundarios fluorescentes	Jackson ImmunoResearch	n/a
Anticuerpos secundarios HRP	Jackson ImmunoResearch	n/a
XTT	biological industries	20-300-1000
FRASC	bioassay system	EASC-100
Trizol	Invitrogen	15596018
Brilliant II SYBR® Green	Agilent	#600828

3. Tratamiento de las células.

Las células N2a, HN33.11 y neuronas corticales fueron tratadas con 200 μ M de AA cada 12 horas durante 36 horas. Posteriormente, se indujo estrés oxidativo durante 30 minutos con 500 μ M de H₂O₂ para células N2a y HN33.11 y 30 μ M en las neuronas corticales. Después de los 30 minutos, el H₂O₂ fue removido, las células fueron lavadas en PBS y dejadas en medio completo por 3 horas para los análisis correspondientes como se resume en la Figura 7. Todas las variantes de tiempo son en base a este protocolo y se indican en cada Figura respectiva, donde el tiempo siempre corresponde al post tratamiento con H₂O₂.

4. PCR en tiempo real.

ARN total de células N2a, HN33.11 y neuronas corticales fue purificado utilizando el reactivo Trizol (Chomczynski, 1993). La síntesis de cDNA se realizó utilizando RevertAid® H Minus First Strand cADN Synthesis Kit (Fermentas). Las reacciones de PCR en tiempo real fueron preparadas con Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix en el equipo Mastercycler realplex² (Eppendorf). Se realizaron 40 ciclos de PCR con las siguientes condiciones: 95°C, 10 min; 95°C, 30s; 60°C, 20s; 72°C, 20s. Los partidores y productos de PCR se listan en la tabla 2. La expresión relativa de mRNA se calculó respecto a la expresión de ciclofilina utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabla 2. Partidores utilizados.

Target	Forward 5'→3'	Reverse 5'→3'	Producto (pb)
mBAX	AGGATGCGTCCACCAAGAAG	TTGGATCCAGACAAGCAGCC	305
mBcl-2	CTGGATCCAGGATAACGGAGG	GCAGCAAGCTACTCAGACGA	333
mCasp8	CTGATAAGGTGCTATCTTGGGT	GTCCAAGCACAGGAACTTGAG	236
mRIPK1	TCTCTGGGCCAGTAGCAGAT	CGGGCACAGTTTTTCCACTG	238
mRIPK3	CCAGAGAGCCAAGCCAAAGAG	AGCCACGGGGTCAGAAGATGT	188
mMLKL	GGAAGTGGAGCGCAGGATAGA	ACACGGTTTTCTAGACGCTG	232
rBAX	GCGAATTGGCGATGAACTGG	GTGTCCAGCCCATGATGGTT	230
rBcl-2	GAGGGGCTACGAGTGGGATA	CGGTAGCGACGAGAGAAGTC	243
rCasp8	CAAACCTCGGGGGTACTGTC	ATCCGTTCCGTAGACGATGC	292
rRIPK1 (db)	GTGGTGAAGCTACTGGGCAT	AGGAAGCCACACCAAGATCG	262
rRIPK1	AATGGGACCTGTGGAGGAGT	GGAGACCCTTCGCTTCCTTT	199
rRIPK3	CCAGAGAGCCAAGCCAAAGAG	AGCCACGGGGTCAGAAGATGT	185
rMLKL	TTCTCCCAACATCCTGCGTA	TGTTTTCCGTGGAGTGTTC	215
mr SVCT2	TGCCAGGAAGGGTGTACTTC	CCGGTACCAAATATGCCATC	255
GLUT1	TCAAACATGGAACCACCGC	AGAAACCCATAAGCACGGCA	203
Ciclofilina	ATAATGGCACTGGTGGCAAGTC	ATTCCTGGACCCAAAACGCTCC	249

db: Doble banda

5. Western Blot.

Se obtuvieron extractos totales de proteínas de células N2a y HN33.11 mediante buffer de lisis NP-40 suplementados con Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (cell signaling #5872). La extracción de proteínas se realizó mediante centrifugación a 12.000 RPM por 10 minutos a 4°C, donde el pellet fue descartado. La cuantificación de proteínas totales se realizó con el método de Bradford (Bradford, 1976). Las proteínas (30 a 70ug) fueron separadas en geles SDS-PAGE al 10% y posteriormente transferidas a una membrana PVDF (0.45-µm pore; Immobilon-P #IPVH00010, Merck Millipore). Posteriormente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-SVCT2 (1:1000), anti-RIPK1 (1:3000), anti-MLKL (1:5000) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a HRP donkey anti-goat IgG, donkey anti-rabbit IgG, o donkey anti-rat IgG (1:6000) y anti-actina-

HRP (1:50000) durante 2 horas a temperatura ambiente. La reacción fue revelada utilizando Western Lighting® Plus-ECL enhanced chemiluminescence substrate (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

6. Determinación de la concentración intracelular AA.

Las células N2a y HN33.11 fueron sembradas en placas de 6 wells y fueron tratadas como ha sido previamente descrito. Previamente a la cuantificación de intracelular de AA, las células fueron lavadas con PBS frío, tripzinizadas y resuspendidas en PBS frío. Las células fueron lisadas mediante centrifugación a 13.000 RPM a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, el pellet fue descartado y el sobrenadante se utilizó para el análisis. La concentración intracelular de AA fue determinada de manera colorimétrica a 570nm por el método de FRASC (Arya et al., 2002) (bioassay system) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

7. Inmunofluorescencia y procesamiento de imágenes.

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células fueron crecidas en cubreobjetos de 12 mm. Posterior a los diferentes tratamientos, las células fueron fijadas en PFA al 4% durante 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas en buffer tris fosfato pH 7,8 (Nualart et al., 1999) e incubadas toda la noche a temperatura con los siguientes anticuerpos secundarios: anti-SVCT2 (1:50), anti-GLUT1 (1:400), anti-RIPK1 (1:400), anti-RIPK3 (1:50), anti-MLKL (1:400), anti-phospho RIPK1 (1:100), anti-phospho MLKL (1:100). Al día siguiente, las células fueron lavadas en buffer tris fosfato e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con los

siguientes anticuerpos secundarios: Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG, Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Cy2 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG, Cy5 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG o Cy3 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG. Todos los anticuerpos secundarios fueron usados en una dilución de 1:200; Hoechst 33342 (1:1000) fue utilizado como tinción nuclear. Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal espectral LSM 780 Zeiss. Para la captura de imágenes en super resolución de luz estructurada (SIM-SR) se utilizó el microscopio ELYRA S.1 Zeiss. Todas las imágenes fueron exportadas en formato .dzi. Para análisis básicos y configuración de brillo y contraste se utilizó el software Zen lite 2.3 SP1. Para análisis avanzados de co-localización, bounding-box (BBox), morfología, reconstrucciones 3D se utilizó el software Imaris versión 9.1. Las imágenes de cada panel de las figuras correspondientes fueron adquiridas con la misma configuración, brillo y contraste.

8. Ensayos de viabilidad celular.

Para los ensayos de viabilidad, se utilizó el kit colorimétrico de XTT. La viabilidad celular fue calculada en porcentaje respecto a las células control que fueron tratadas solo con PBS en vez de H₂O₂, con el tratamiento previamente descrito arriba. Para la incubación del reactivo de XTT, posterior al tratamiento las células fueron lavadas con PBS, e incubadas con XTT disuelto en medio de cultivo libre de rojo fenol durante 2 horas. Finalmente, la viabilidad fue determinada de manera colorimétrica a 490nm.

9. Ensayos de viabilidad para el monitoreo de la apoptosis, necroptosis, inhibición de ROS y fragmentación mitocondrial.

Los ensayos de viabilidad fueron llevados con el método de XTT previamente descrito. Para la determinación de la apoptosis se utilizó el inhibidor de las caspasas zVAD.FMK 30 μ M; para evaluar necroptosis se utilizó Necrostatina-1 (inhibidor de RIPK1) de 50 a 100 μ M; como inhibidor de la fragmentación mitocondrial se utilizó Mdivi-1 (Inhibidor de Drp-1) de 25 a 100 μ M todos estos fármacos se utilizaron durante y posteriormente al tratamiento con H₂O₂. Como inhibidor de ROS, se utilizó N-acetilcisteína (NAC) 0,5 a 1mM 24 horas antes del tratamiento con H₂O₂.

10. Ensayos de muerte celular

La muerte celular fue determinada por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, mediante citometría de flujo y la tinción con TOPRO-3 (Jiang et al., 2016). Posteriormente al tratamiento con H₂O₂, las células fueron tripzinizadas y resuspendidas en PBS con 500nM de TOPRO-3 por 10 minutos. Después de este tiempo, 30.000 a 50.000 eventos fueron adquiridos en el citómetro de flujo BD FACSAria III, la integridad de la membrana fue monitoreada por la incorporación de TOPRO-3 en el canal de APC. Los datos fueron exportados en formato .fcs y procesados en el software FlowJo X V0.7.

11. Medición de ROS

La producción total de ROS fue determinada por citometría de flujo utilizando la sonda CellRox Deep red. Posteriormente al tratamiento con H₂O₂, las células fueron tripzinizadas y resuspendidas en PBS con 500nM de CellRox Deep red

durante 30 minutos. Después de este tiempo, 30.000 a 50.000 eventos fueron adquiridos en el citómetro de flujo BD FACSAria III, la producción de ROS fue monitoreada por la intensidad de fluorescencia detectada en el canal de APC. Los datos fueron exportados en formato .fcs y procesados en el software FlowJo X V0.7.

12. Cuantificación de proteínas por citometría de flujo

Las células N2a y HN33.11 fueron tripzinizadas y fijadas por 10 minutos en PFA al 4% a temperatura ambiente. Luego, las células fueron permeabilizadas con metanol frío al 100% durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, las células fueron lavadas por centrifugación en buffer de incubación (0,5% BSA en buffer Tris-fosfato). Para la inmunotinción, las células fueron resuspendidas en 100 μ L de buffer de incubación con el anticuerpo primario diluido: RIPK1 (1:100); MLKL (1:100). Después de 1 hora de incubación, las células fueron lavadas por centrifugación en buffer de incubación. Entonces, las células fueron resuspendidas en anticuerpo secundario diluido en buffer de incubación: Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (1:200) o Alexa Fluor 488 AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG (1:200) por 30 min. Finalmente, las células fueron lavadas en buffer de incubación, resuspendidas en PBS y analizadas inmediatamente por citometría de flujo (BD FACSAria III). La intensidad de fluorescencia fue monitoreada en el canal de FITC. Células sin tinción, y solo incubadas con el anticuerpo secundario fueron utilizadas como control. Los datos fueron exportados en formato .fcs y procesados en el software FlowJo X V0.7.

13. Microscopia en célula viva 4D

Células N2a, HN33.11 y neuronas corticales fueron sembradas en cubreobjetos de 18mm. Posterior al tratamiento con AA y/o H₂O₂ previamente descrito, las células fueron se introdujeron en una cámara de perfusión para célula viva. Luego, las células fueron incubadas con las sondas fluorescentes durante 10 minutos. Después de este tiempo, el exceso de sonda fue removido por lavado con PBS. Finalmente, las células fueron incubadas con medio completo que contenía Faloidina-alexa 488 como marcador de la integridad de la membrana plasmática. Se realizaron imágenes en el sistema de célula viva del microscopio confocal espectral LSM 780 Zeiss. Las imágenes fueron adquiridas en 4D (x: 1024, y:1024, z: 6 o 10, tiempo, 5 canales, 8-bit) con el objetivo Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27. Las sondas fluorescentes utilizadas fueron: tinción nuclear, Hoechst 33342 (0.1 µg/mL, ex/em(nm) 350/461), integridad de la membrana plasmática, Faloidina-alexa fluor 488 (20nM, ex/em(nm) 495/518), actividad mitocondrial MitoTracker Red CMXRos (25 nM, ex/em(nm) 579/599), membrana plasmática cellmask (0,3X ex/em(nm) 650/655). Finalmente, las imágenes fueron reconstruidas en una película en el software Zen lite (Zeiss).

14. Isquemia y reperfusión cerebral por oclusión de la arteria cerebral media.

El protocolo de experimentación animal fue evaluado por el comité de bioética de la facultad de ciencias biológicas de la universidad de concepción, y se realizó bajo normas del National Institutes of Health, Bethesda, MD y por el manual de Bioseguridad de CONICYT. Las ratas (Sprague-Dawley) machos adultos, fueron anestesiados con isoflurano al 5%, mantenido al 3% durante el procedimiento. Mediante microcirugía bajo lupa, se procedió a ocluir la arteria cerebral media, mediante la introducción de una sutura de monofilamento recubierta con una mezcla de resina de silicona (xantopreo) (RWD, MCAO Sutures MSMC21B102PK50) en la arteria carótida común. Posteriormente, la incisión fue cerrada, y se inyectaron 5 mL de suero fisiológico para evitar la deshidratación, como analgesia se utilizó buprenorfina 0,05 mg/kg. Este procedimiento no tuvo una extensión mayor a 20 minutos. Posteriormente a 1 hora, el animal fue re-anestesiado y la sutura fue removida, para permitir la reperfusión durante el tiempo necesario. Transcurrido el tiempo de reperfusión, los animales fueron sacrificados y el cerebro se dividió secciones coronales las que fueron teñidas con cloruro de tetrazolio al 2% (TTC).

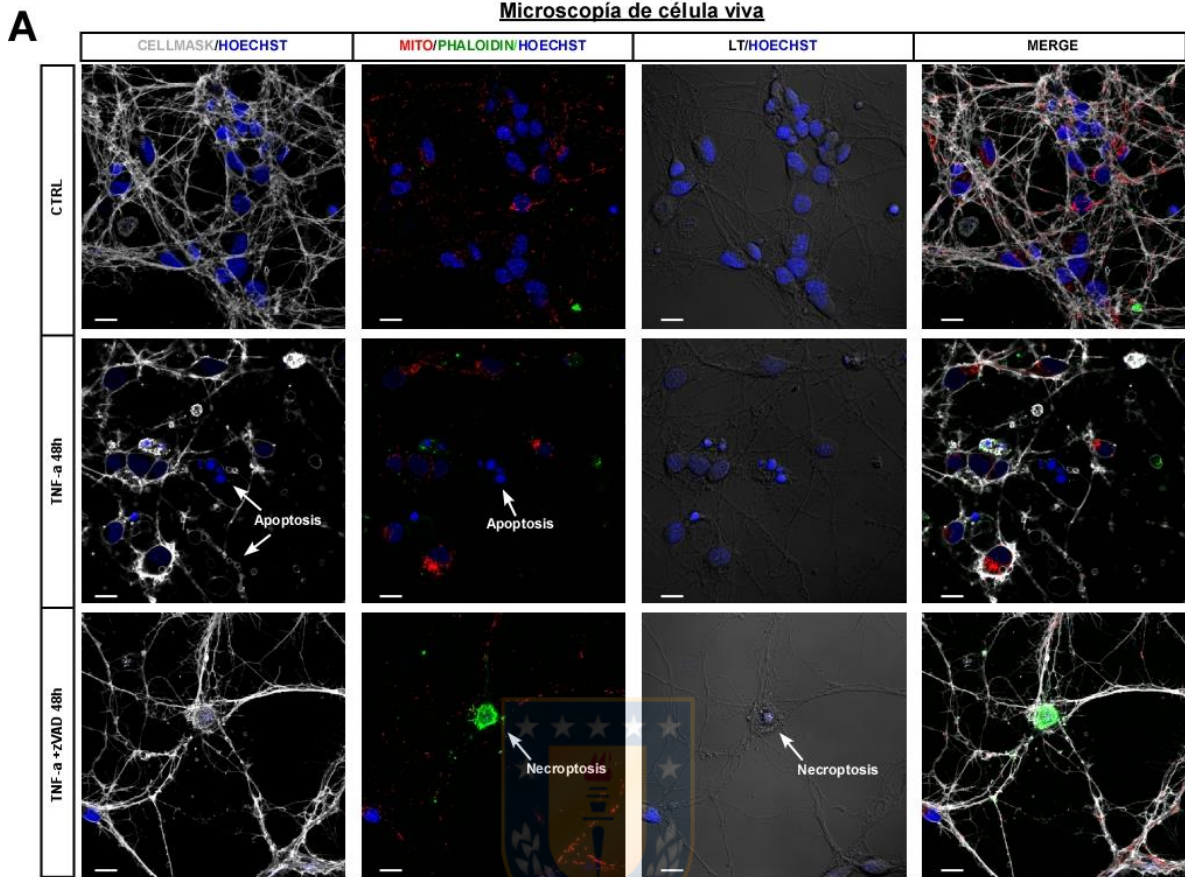
VI. RESULTADOS

Capítulo 1.

1.1. Características de desintegración neuronal.

Previo a los análisis de muerte celular, caracterizamos si las células neuronales son sensibles a la muerte por apoptosis y necroptosis. Como control de apoptosis utilizamos 10ng/mL de TNF- α (Figura 5A) o deprivación de suero (Figura 5B, 5C) durante 48h. Como control de necroptosis utilizamos TNF- α más el inhibidor de caspasas zVAD 30 μ M (Degterev et al., 2005) durante 48h (Figura 5A, 5B, 5C). Mediante análisis de microscopía de célula viva analizamos las características de desintegración neuronal. Los tipos de muerte celular fueron diferenciados de manera morfológica: la apoptosis fue determinada por condensación de la cromatina, fragmentación de ADN, pérdida de la actividad mitocondrial y disminución del tamaño celular. La necroptosis fue determinada por la mantención de la integridad del núcleo, oncosis celular y formación de estructuras tipo burbujas en la membrana plasmática (Gong et al., 2017, Yoon et al., 2017). La membrana plasmática fue teñida con cellmask, las mitocondrias con mitotracker CMXRos, y el núcleo con Hoechst 33342. En el caso de los análisis de neuronas corticales, se tomó ventaja de la impermeabilidad de las falotoxinas en células vivas, y se analizó la integridad de la membrana plasmática por la incorporación de Faloidina-alexa-488 (Figura 5A).

Neuronas corticales



Células N2a

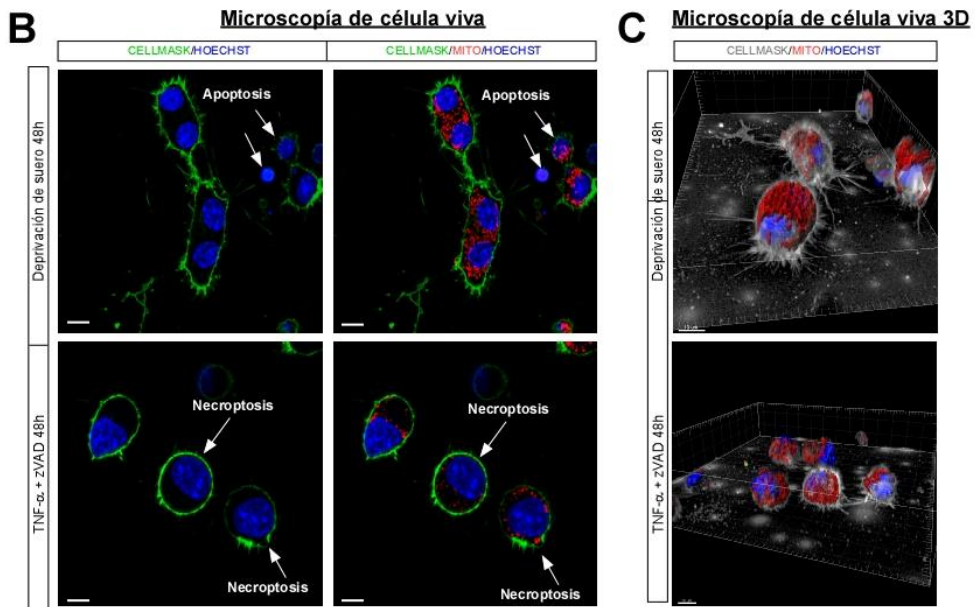


Figura 5. Las neuronas corticales de rata y las células N2a presentan características de desintegración apoptótica y necroptótica. A. Neuronas corticales de 5 DIV tratadas con 10ng/mL TNF- α o TNF- α más 30 μ M de zVAD durante 48h. **B.** Inducción de apoptosis y necroptosis en células N2a por 48h de privación de suero o TNF- α más zVAD durante 48h, respectivamente. **C.** Análisis de morfológico 3D de apoptosis o necroptosis en células N2a por 48h de privación de suero o TNF- α más zVAD durante 48h, respectivamente. Barra de tamaño 10 μ m. Cellmask fue utilizado como marcador de membrana, mitotrackerCMXRos como marcador mitocondrial, Hoechst 33342 como marcador del núcleo y faloidina como marcador de integridad de la membrana plasmática. Los colores de cada sonda están indicados en la figura. Barra de tamaño 10 μ m. La toma de imágenes se realizó solo a la hora 48 post tratamiento en 3D a 37°C y 5% de CO₂ en cámara de perfusión para célula viva.

1.2. El tratamiento con vitamina C, en ausencia de estrés oxidativo no induce muerte neuronal.

Durante muchos años, se ha postulado que el tratamiento con vitamina C por sí solo induce muerte en células tumorales (Chen et al., 2005, Chen et al., 2008). De este modo, analizamos si la suplementación con AA cada 12 horas tiene efectos sobre la viabilidad o la proliferación neuronal. En primer lugar, por el método colorimétrico de XTT se analizó la viabilidad celular en neuronas tratadas con 200 μ M cada 12 horas por 36 horas. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con AA no tiene efectos en la viabilidad de las células N2a, HN33.11 y neuronas corticales (Figura 6A, B, C). Al mismo tiempo, corroboramos esta información en la línea celular N2a mediante microscopia de célula viva en tiempo real con el sistema IncuCyte S3. Analizamos la muerte celular por medio de la incorporación de "*Sitox green*" y la proliferación mediante cambios en la confluencia, durante 48h en células N2a tratadas con 200 μ M AA o DHA cada 12 horas, donde no encontramos diferencias entre las células tratadas con vitamina C y el control (Figura 6D, E). De este modo, a diferencia de los datos publicados por otros grupos de investigación, el tratamiento con AA o DHA en células neuronales (tumorales o normales) bajo condiciones fisiológicas no tiene efectos sobre la viabilidad o la proliferación.

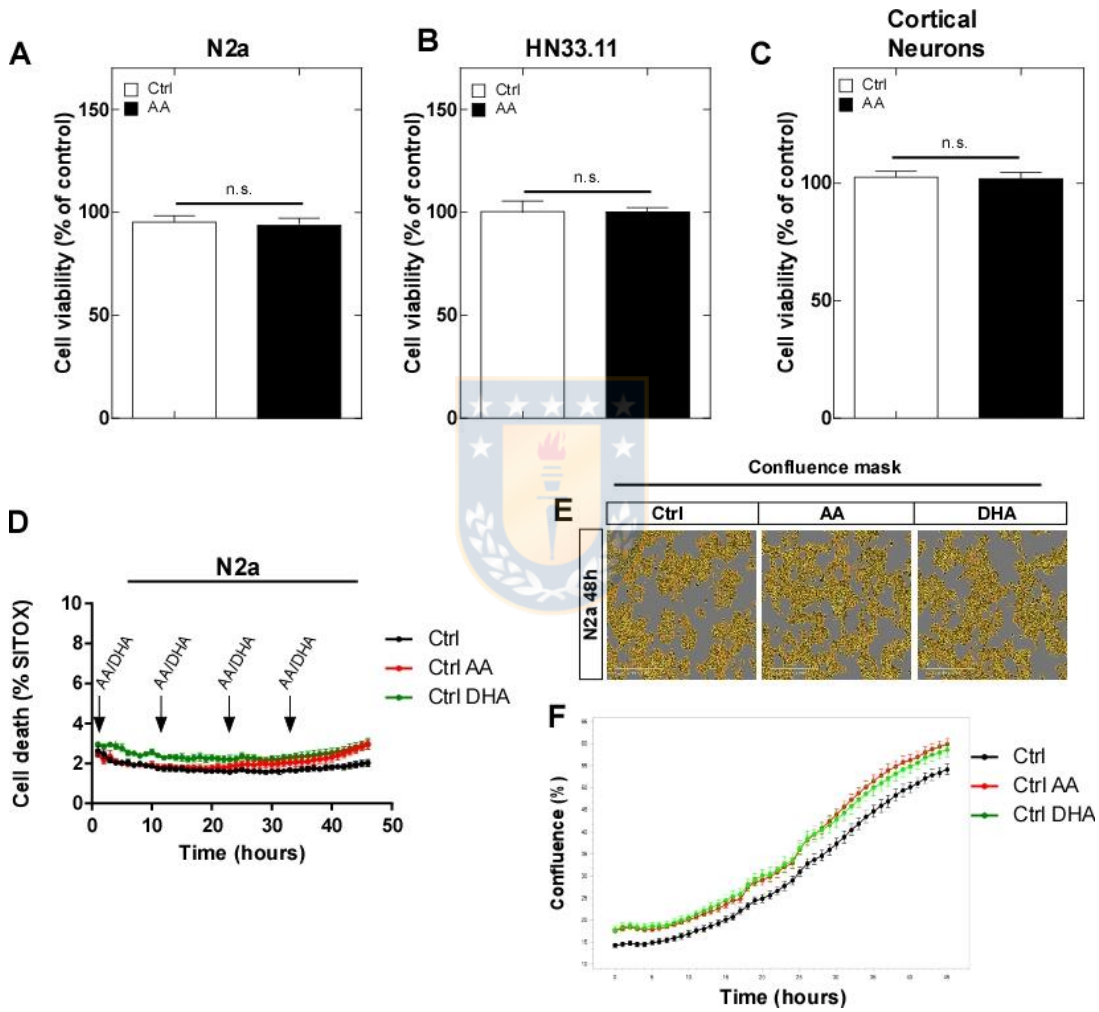


Figura 6. La suplementación con vitamina C no tiene efectos sobre la viabilidad, muerte o proliferación neuronal.

A,B,C. Análisis de viabilidad celular determinado por XTT 36 horas post tratamiento con AA en células N2a, HN33.11 y neuronas corticales respectivamente. **D.** Cuantificación por IncuCyte de células N2a positivas para *Sytox green* (muerte celular). **E.** Imágenes representativas de análisis por IncuCyte de la confluencia celular a las 48h. **F.** Determinación de la confluencia celular en tiempo real con IncuCyte. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.



1.3 El estrés oxidativo induce oxidación de vitamina C hasta DHA en la neurona, desencadenando muerte celular.

Como se describió anteriormente, en condiciones fisiológicas AA y DHA no inducen muerte neuronal. Sin embargo, el efecto que tiene vitamina C en condiciones de estrés oxidativo ha sido pobremente estudiado. En el SNC la principal patología que desencadena estrés oxidativo agudo, y que además induce oxidación de AA hasta DHA es el infarto cerebral (Pedersen et al., 1998). En este contexto, y debido a que infarto es la principal causa de muerte a nivel mundial, es necesario el uso de modelos *in vitro* que reproduzcan las características de muerte que ocurre *in vivo*. Actualmente, para estudiar infarto cerebral *in vitro* se utiliza el método de OGD (Li et al., 2016), el que consiste en inducir deprivación de oxígeno y glucosa en las células por periodos de 16 a 18 horas aproximadamente, y luego reperfundir con oxígeno y glucosa por 6 a 24 h (tiempos que distan en mucho de lo que ocurre en una condición de infarto real). No obstante, como se describió previamente, OGD no reproduce las características de muerte neuronal que ocurren durante el infarto cerebral *in vivo* (Liu et al., 2004). De este modo, hemos propuesto una nueva aproximación para simular el daño oxidativo que pudiese ocurrir en condiciones de IR. Para este fin, ocupamos el protocolo que se resume en la Figura 7A, el cual consiste en sacar las células de la “condición de escorbuto” normales (debido a que el medio de cultivo es libre de AA) suplementando las neuronas con 200 μ M AA cada 12h, durante 36h. Posteriormente, se indujo estrés oxidativo por deprivación de glucosa y H₂O₂ durante 30 minutos, condición que simula la “isquemia” neuronal. La “reperfusión” fue inducida por el retiro del H₂O₂, y cultivo de

las células en condiciones normales de glucosa y ausencia de estrés durante 3h (ventana de tiempo similar a la que tiene un paciente isquémico para recibir tratamiento, antes de que el daño cerebral sea irreversible). Finalmente, a las 3h post tratamiento con H₂O₂, la viabilidad neuronal fue cuantificada por el método de XTT, como se resume en la Figura 7A. A diferencia de los resultados previamente descritos, cuando las neuronas acumulan AA y posteriormente son sometidas a estrés oxidativo de tipo IR *in vitro*, observamos que existe una disminución significativa de la viabilidad en células N2a (Figura 7B), HN33.11 (Figura 7C) y neuronas corticales (Figura 7D). Con el fin de corroborar que las condiciones experimentales inducen oxidación de AA, determinamos la concentración intracelular de AA mediante el método de FRASC (Arya et al., 2002). Para la cuantificación intracelular de AA ocupamos el protocolo que se muestra en la Figura 8A. Nuestros datos muestran que las células N2a oxidan rápidamente el AA durante el tratamiento con H₂O₂, para posteriormente reducirlo de manera más gradual durante 1h (Figura 8B). Sin embargo, posterior a la reducción de AA, se observa nuevamente una rápida oxidación en ausencia de estrés oxidativo a las 2 y 3h post tratamiento (Figura 8B). De esta forma, a pesar de que las células N2a pueden reducir el DHA hasta AA, ocurre alguna alteración que induce nuevamente oxidación hasta DHA. Por otra parte, en las células HN33.11 observamos un comportamiento diferente, donde el tratamiento con H₂O₂ no induce una oxidación abrupta de AA hasta DHA (Figura 8C). Sin embargo, a diferencia de las células N2a, las células HN33.11 no pueden reducir el AA hasta DHA y mantiene una tasa oxidativa de vitamina C constante durante el post tratamiento con H₂O₂ (Figura 8C).

Con el objetivo de determinar si el efecto inductor de muerte es debido a la producción de DHA, “atrapamos” el DHA al interior de las neuronas con el inhibidor del transporte de DHA citocalasina B. Previamente al tratamiento con H₂O₂, incubamos las células tratadas con AA, durante 5 minutos con 20 μM de citocalasina B. Como se muestra en la Figura 9A, cuando se inhibe el eflujo de DHA desde la neurona, se induce una mayor muerte neuronal. Efecto que no es observado cuando las células son tratadas con citocalasina E, fármaco con los mismos efectos citopáticos que tiene citocalasina B, pero que no inhibe el transporte de DHA. Con el objetivo de prevenir la muerte neuronal inducida por la acumulación de DHA, realizamos co-cultivo neurona astrocito mediante el método del sándwich (Garcia-Krauss et al., 2016), como se describe en la Figura 9B. El co-cultivo neurona astrocito fue mantenido solamente durante el tratamiento con H₂O₂. Nuestros resultados muestran que el reciclaje de DHA por parte de los astrocitos, es capaz de prevenir la muerte celular inducida por la acumulación de DHA (Figura 9C). Al mismo tiempo, en este experimento utilizamos como control astrocitos previamente tratados con citocalasina B, con el objetivo de inhibir el reciclaje de DHA. Como se muestra en la última barra de la Figura 9C, a pesar de la presencia de los astrocitos en el cultivo, la muerte neuronal no se previene debido a que no existe reciclaje de DHA por parte de los astrocitos.

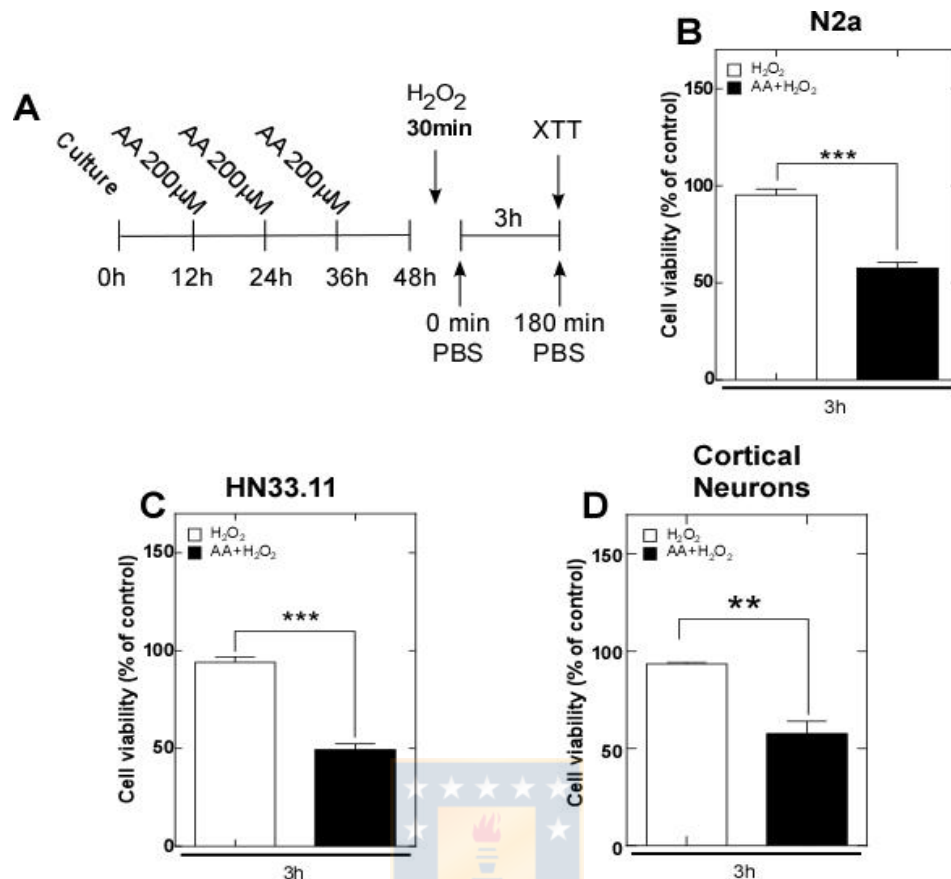


Figura 7. Vitamina C induce muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo de tipo IR *in vitro*.

A. Esquema del protocolo utilizado para la suplementación con AA e inducción de estrés oxidativo de tipo IR *in vitro*. **(B)** Células N2a, **(C)** células HN33.11 y **(D)** neuronas corticales tratadas con el protocolo previamente descrito en **A**. 500 µM de H₂O₂ fue utilizado en las células N2a y HN33.11 para la inducción de estrés oxidativo. 30 µM de H₂O₂ fue utilizado en las neuronas corticales para la inducción de estrés oxidativo. La viabilidad fue calculada respecto a células control tratadas con PBS. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio ± SD (n=3). ***p<0.001- **p<0.01- *p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

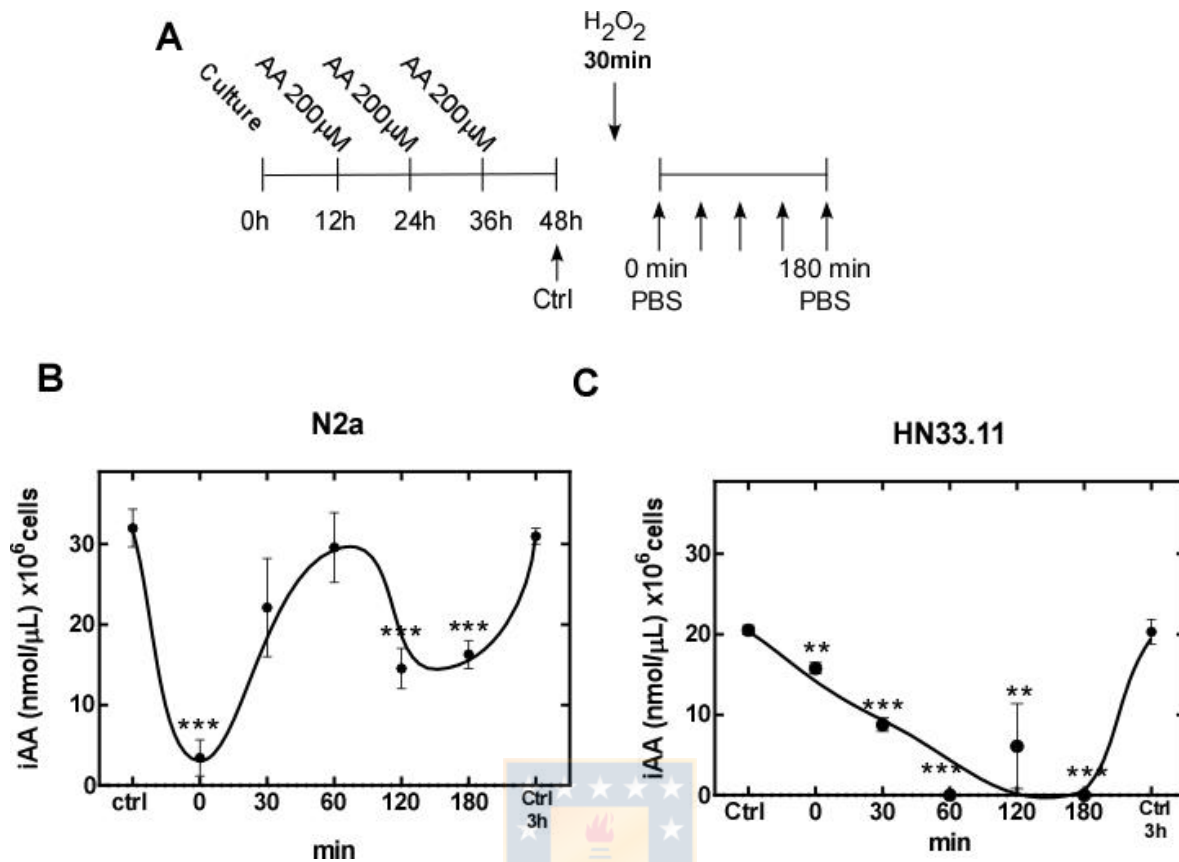


Figura 8. El estrés oxidativo de tipo IR induce oxidación de AA *in vitro*.

A. Esquema del protocolo utilizado, las flechas indican los tiempos de obtención de muestras. Determinación de la concentración intracelular de AA por el método de FRASC en células N2a (**B**) y HN33.11 (**C**). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SD ($n=3$). *** $p<0.001$ -** $p<0.01$ -* $p<0.05$; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

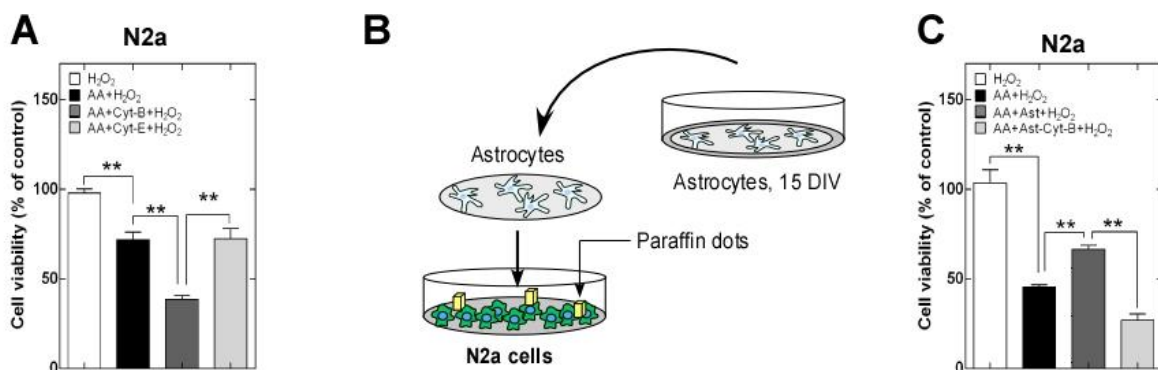


Figura 9. La acumulación intracelular de DHA induce muerte celular, la que es prevenida por el reciclaje de DHA por parte de los astrocitos.

A. Células N2a previamente tratadas con citocalasina B o E 20 μM durante 5 minutos. **B.** Esquema método del sándwich. **C.** Co-cultivo neurona astrocito, astrocitos de 15 DIV co-cultivados en una proporción 1:5 respecto a las células N2a. Citocalasina B fue utilizada a 20 μM 5 minutos previo al tratamiento con H_2O_2 . La viabilidad fue determinada 3 horas post tratamiento. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). *** $p < 0.001$ - ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

1.4 La muerte celular inducida por DHA en condiciones de estrés oxidativo induce redistribución de los transportadores de vitamina C y comparte características morfológicas con la necroptosis.

El estudio de la muerte celular comenzó como una caracterización morfológica de las células. Actualmente, las características morfológicas van acompañadas a una compleja vía de transducción de señales, que inducen los cambios morfológicos (Vandenabeele et al., 2017). De este modo, mediante análisis de microscopia confocal y de super resolución SIM determinamos los principales cambios morfológicos que gobiernan la muerte neuronal inducida por DHA. Tomando ventaja de la distribución del transportador de DHA GLUT1 en la membrana plasmática, lo utilizamos como marcador de membrana. Al mismo tiempo, analizamos la distribución del transportador de la forma reducida de vitamina C SVCT2. En primer lugar, determinamos que el tratamiento con H₂O₂ no induce cambios morfológicos, ni redistribución de los transportadores de vitamina C en células N2a (Figura 11A, C, arriba). Sin embargo, cuando se induce la generación de DHA por el estímulo de IR *in vitro* determinamos que ocurren una serie de fenómenos; 1) las células pierden la morfología normal, adquiriendo una forma redondeada (Figura 11A, C abajo), característica de la necroptosis conocida como *balloon-like*. 2) Ocurre una redistribución de GLUT1 (verde) hacia el interior de la célula, formando una doble membrana en una zona perinuclear (Figura 11A, 11C abajo). 3) Ocurre una redistribución de SVCT2 (rojo) hacia la membrana plasmática (Figura 11A, 11C abajo). Estas alteraciones observadas por microscopía confocal, fueron corroboradas por super resolución donde determinamos que el cambio morfológico es en 3D (Figura 11B), el grosor de la

membrana interna de GLUT1 mide 100nm aproximadamente, y que SVCT2 queda atrapado entre las 2 membranas de GLUT1. Con el fin de corroborar las alteraciones morfológicas, utilizamos los parámetros elípticos de esfericidad (Figura 10), oblato (atachado en los polos) y prolato (alargado en los polos) donde el valor de 1 significa que corresponde a la figura geométrica perfecta (ej: esfericidad = 1 = esfera perfecta). Como se observa en la Figura 11D en las barras blancas, 3 horas post tratamiento con H₂O₂ la morfología es principalmente de tipo oblato (alargada en eje x e y, con baja proyección en eje z), mientras que presenta poco carácter esférico y prolato lo que correspondería a una morfología normal. Por el contrario, en la Figura 11D barras negras, se observa que cuando se induce la generación de DHA la morfología cambia disminuyendo el carácter oblato, pasando a ser más esférico y prolato (acortamiento ejes x e y, mayor proyección en eje z). Indicando que las células se retraen adquiriendo morfología *balloon-like*. Para comprobar que los cambios morfológicos se correlacionan con diferencias de tamaño, medimos las dimensiones de células con la herramienta *bounding box* de Imaris (Figura 10). Nuestros resultados muestran que cuando existe generación de DHA, las células se retraen en el eje x e y, mientras que crecen en el eje z respecto al control tratado con H₂O₂ (Figura 11E), resultados que se correlacionan directamente con los cambios morfológicos determinados en la Figura 11D.

Respecto a la doble membrana generada por GLUT1 en respuesta a DHA, hipotetizamos que probablemente podría haber traslocado a la membrana nuclear como respuesta compensatoria para disminuir el número de transportadores de DHA en la membrana plasmática. De este modo, mediante microscopia confocal

evaluamos si GLUT1 colocalizaba con la lámina nuclear. Contrario a la esperado, nuestros datos muestran que la membrana interna formada por GLUT1 no colocaliza con la lámina nuclear (Figura 12A). Mas aún, también se observa que la lámina nuclear tiende a desaparecer (Figura 12A), lo que corresponde a otra característica morfológica de la necroptosis. Nuestros análisis de expresión de GLUT1 y SVCT2 mostraron que no hay incremento en la expresión de estos genes, por el contrario, GLUT1 disminuye su expresión de manera significativa por el tratamiento con AA o H₂O₂, mientras que los niveles de SVCT2 no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las condiciones analizadas (Figura 12B, Figura 12C). De manera interesante, cuando analizamos el componente del citoesqueleto neuronal con marca para tubulina β III, determinamos que la doble membrana de GLUT1, parece estar “anclada” a la tubulina en este compartimento perinuclear (Figura 13A). De este modo, esta reorganización del citoesqueleto y redistribución de GLUT1 podría ser otra característica para determinar la activación de la necroptosis.

Por otra parte, cuando analizamos el modelo hipocampal con las células HN33.11, determinamos que comparten características morfológicas similares a las células N2a cuando existe generación de DHA: pérdida de los procesos y morfología redondeada (Figura 14A, 14B). Pero gracias a la marca de membrana de GLUT1, se aprecia la formación de unas estructuras particulares con forma de burbuja (Figura 14C). Además, los cambios morfológicos en respuesta a la generación de DHA son de tipo esférico y prolato (Figura 14D). Mientras que los análisis de

bounding Box muestran acortamiento simétrico de las células en todos los ejes (Figura 14E).



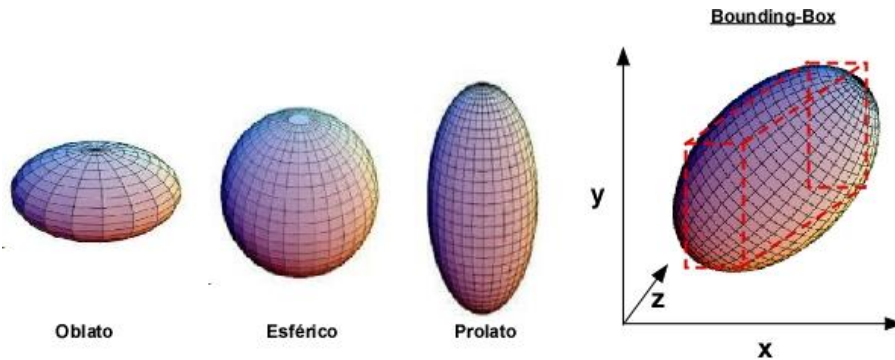


Figura 10. Parámetros elípticos (oblato, esférico, prolato) y de tamaño (*Bounding-box*) determinados por Imaris.

-Un esferoide oblato es un elipsoide rotacionalmente simétrico en el cual los ejes polares son más pequeños que el diámetro de su círculo ecuatorial.

-Un esferoide prolato es un esferoide en el cual su eje polar es mayor que su diámetro ecuatorial.

-Bounding Box corresponde a una herramienta geométrica que determina el rectángulo 3D mínimo que encierra a un objeto determinado, como se ilustra en el rectángulo rojo.

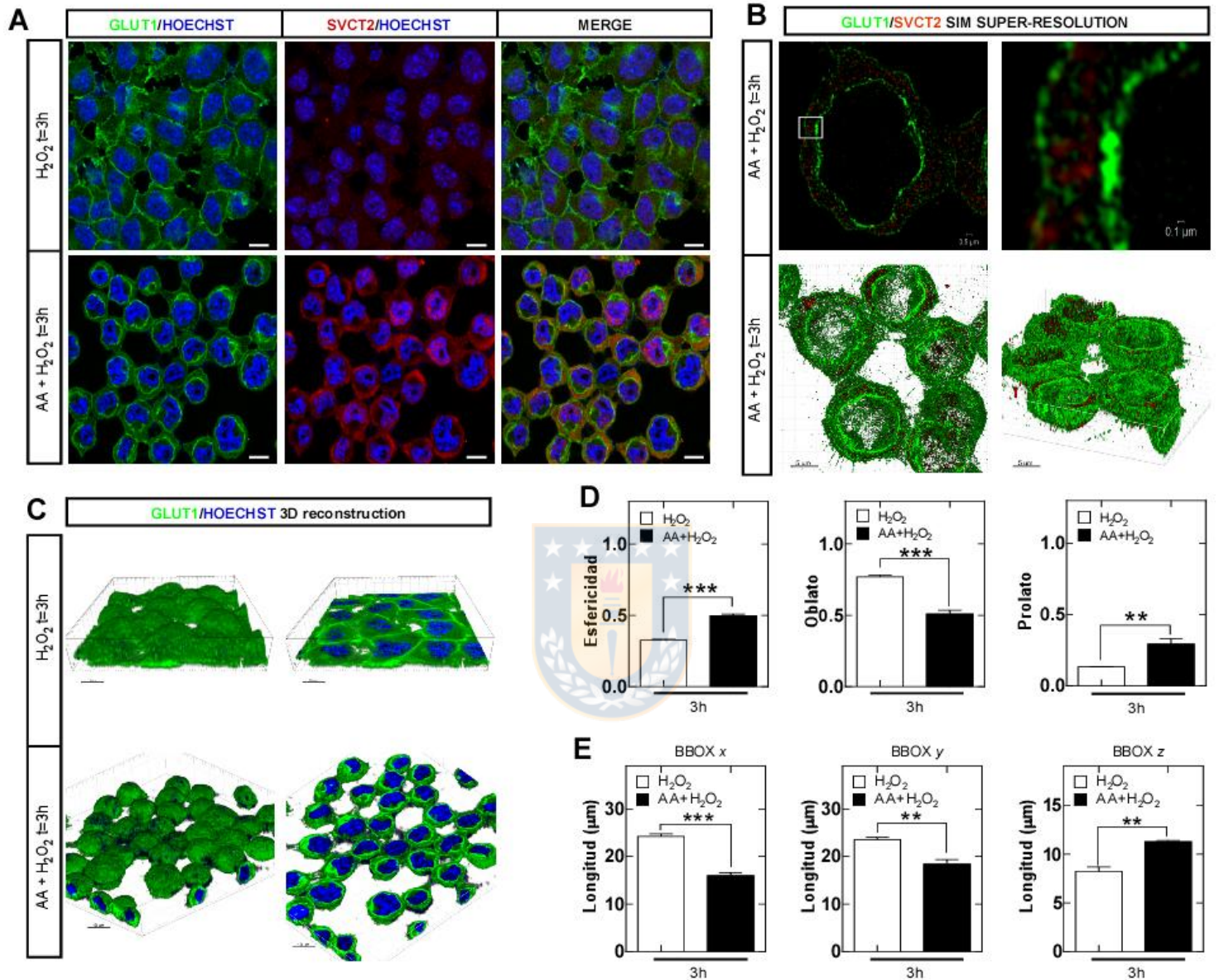


Figura 11. La generación de DHA induce redistribución de los transportadores de vitamina C y cambios morfológicos en células N2a.

A. Análisis confocal de la distribución de los transportadores de vitamina C GLUT1 (verde) y SVCT2 (rojo) en respuesta a la generación de DHA en células N2a. **B.** Análisis de super resolución SIM de la distribución de los transportadores de vitamina C GLUT1 (verde) y SVCT2 (rojo) en respuesta a la generación de DHA en células N2a. **C.** Reconstrucción 3D generada en Imaris en respuesta a la generación de DHA en células N2a. **D, E.** Análisis morfológico de las reconstrucciones 3D procesadas en Imaris mediante parámetros elípticos (**D**) y de tamaño mediante Bounding Box (**E**) en células N2a. Barra de tamaño 10 μ m. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SEM (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*. *La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo*

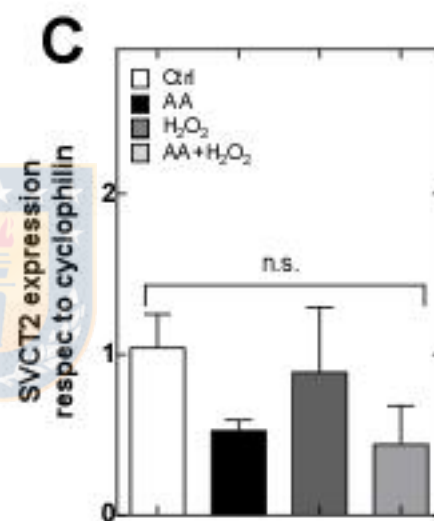
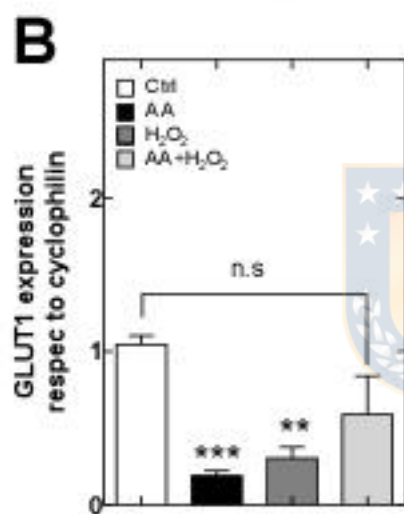
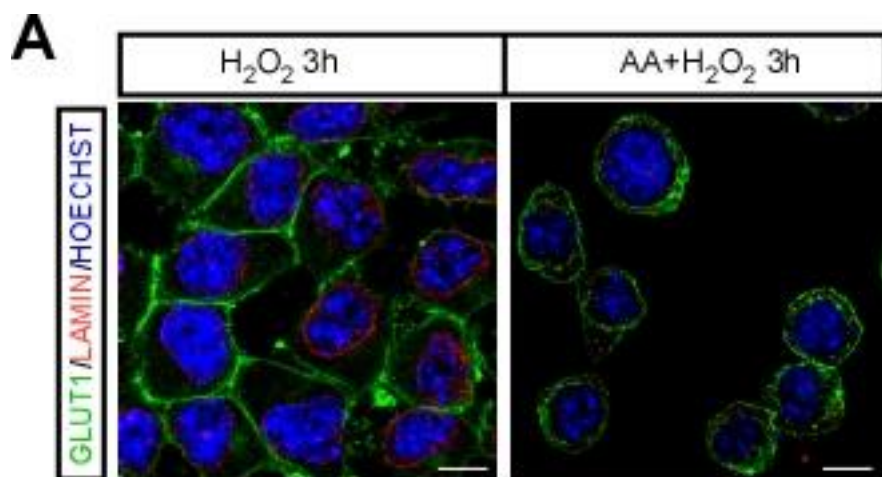


Figura 12. La redistribución de GLUT1 no es hacia la lámina nuclear y no está relacionada a un aumento en la expresión génica.

A. Análisis confocal de la distribución de GLUT1 (verde) en la lámina nuclear (rojo) en células N2a. **B,C.** Evaluación de la expresión de mRNA de GLUT1 y SVCT2 respectivamente, por qRT-PCR en células N2a. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Barra de tamaño 10 μ m. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

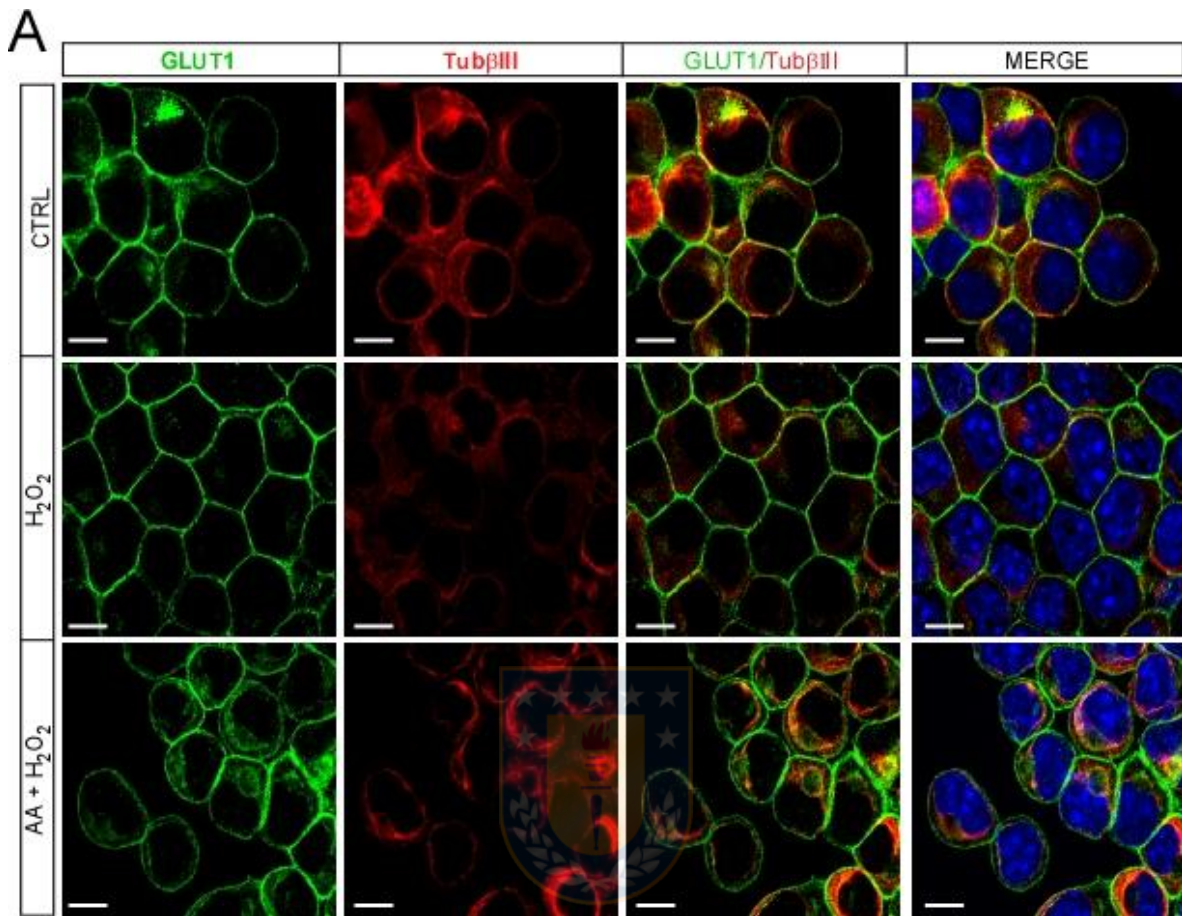


Figura 13. La redistribución de GLUT1 está asociado a cambios en el citoesqueleto.

A. Inmunodetección por microscopía confocal de la co-distribución de GLUT1 (verde) y tub β III (rojo) en células N2a tratadas con H₂O₂ durante 30 minutos y fijadas luego de 3h o células N2a pre-tratadas con AA y luego incubadas con H₂O₂ durante 30 minutos y fijadas 3h post tratamiento. En la figura se aprecia que membrana interna formada de GLUT1 tiene la misma distribución que la marca de citoesqueleto para tub β III. Barra de tamaño 10 μ m. Hoechst 33342 fue utilizado como tinción nuclear.

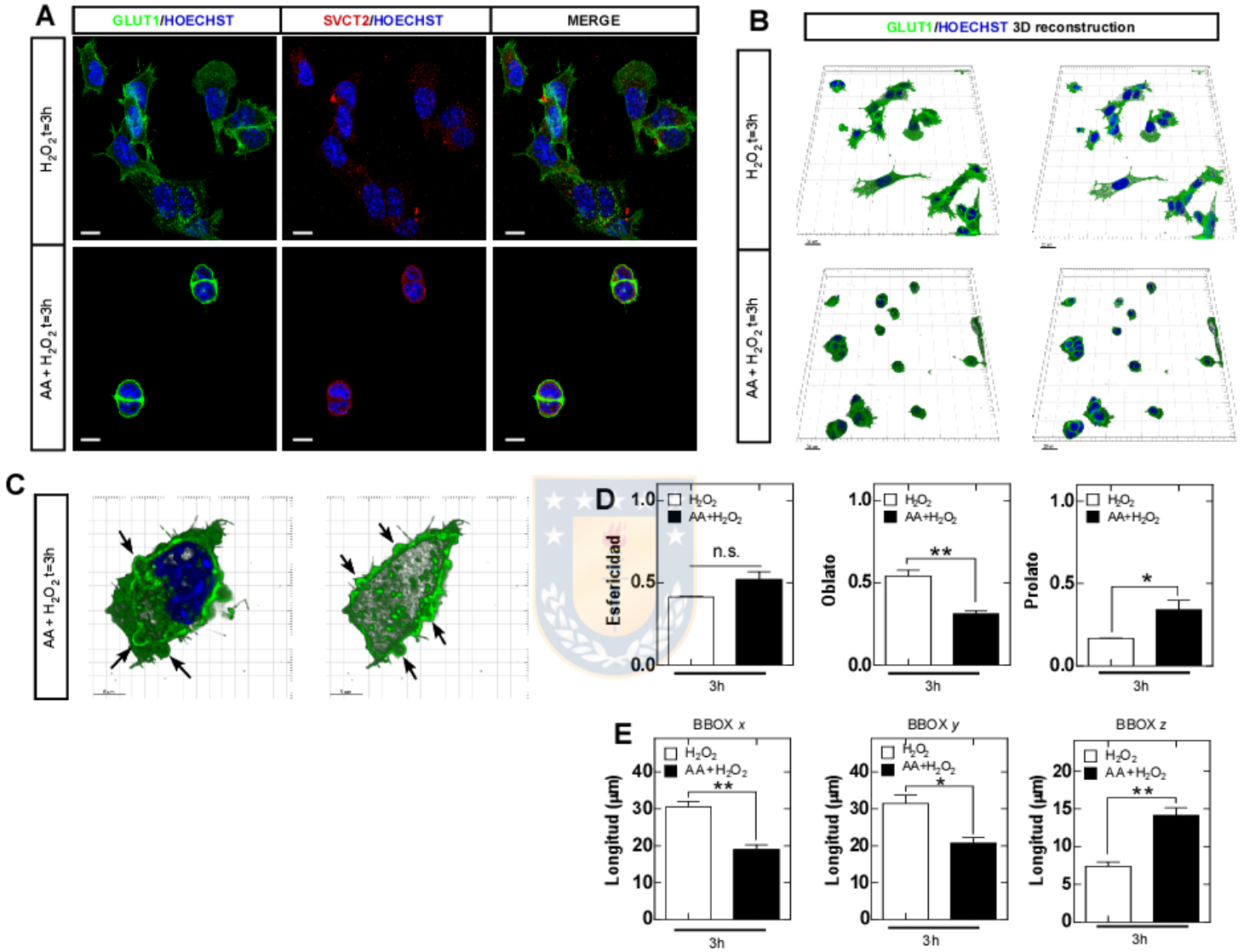


Figura 14. Previo a la muerte neuronal inducida por la generación de DHA, se inducen cambios morfológicos de tipo necroptótico en células HN33.11.

A. Análisis confocal de la distribución de los transportadores de vitamina C GLUT1 (verde) y SVCT2 (rojo) en respuesta a la generación de DHA. **B.** Reconstrucción 3D generada en Imaris en respuesta a la generación de DHA. **C.** Determinación de estructuras tipo “*bubble*” en la membrana plasmática (GLUT1, verde). **D, E.** Análisis morfológico de las reconstrucciones 3D procesadas en Imaris mediante parámetros elípticos (**D**) y de tamaño mediante Bounding Box (**E**) en células HN33.11. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Barra de tamaño 10µm. Los datos representan el promedio ± SEM (n=3). ***p<0.001- **p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de t-student. *La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo.*

1.5. La sobre expresión de hSVCT2 incrementa la muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo.

Con el objetivo de corroborar que la vitamina C es el inductor de muerte celular, sobre expresamos la isoforma humana del transportador SVCT2 (hSVCT2-wt-EGFP) en las líneas células N2a y HN33.11. Como se aprecia en la Figura 15A, 15B, las células N2a y HN33.11 fueron transducidas con el lentivirus EGFP o hSVCT2-wt-EYFP y se sorteó el 1% más intenso para generar líneas celulares estables. El 100% de transducción fue corroborado por microscopía confocal (Figura 15C). Una vez que las líneas celulares fueron establecidas, se procedió a inducir estrés oxidativo de tipo IR *in vitro* para analizar la muerte celular (pérdida de la integridad de la membrana plasmática). Como se muestra en la Figura 16A, 16D, las células N2a y HN33.11 tienen una clara distribución de hSVCT2 en la membrana plasmática. Nosotros realizamos análisis de muerte celular a tiempo 2, 3 y 4 horas post tratamiento en las líneas celulares mediante citometría de flujo, utilizando la sonda TOPRO-3 y adquiriendo los datos en el canal de APC. La estrategia para determinar las gates se realizó en gráficos de *dot blot* utilizando el *software flowJo*, se comparó el *forward scatter* versus la intensidad de fluorescencia del canal de APC (TOPRO-3), como se aprecia en la Figura 1 del anexo. Nuestros análisis de muerte celular por citometría de flujo muestran que la sobre expresión de hSVCT2 favorece la muerte neuronal de manera significativa en condiciones de estrés oxidativo (Figura 16C, 16F) respecto a las células que solo sobre expresan EGFP (Figura 16B, 16E). Sugiriendo de esta forma que la mayor captación de AA, favorece una mayor muerte neuronal en condiciones de IR *in vitro*.

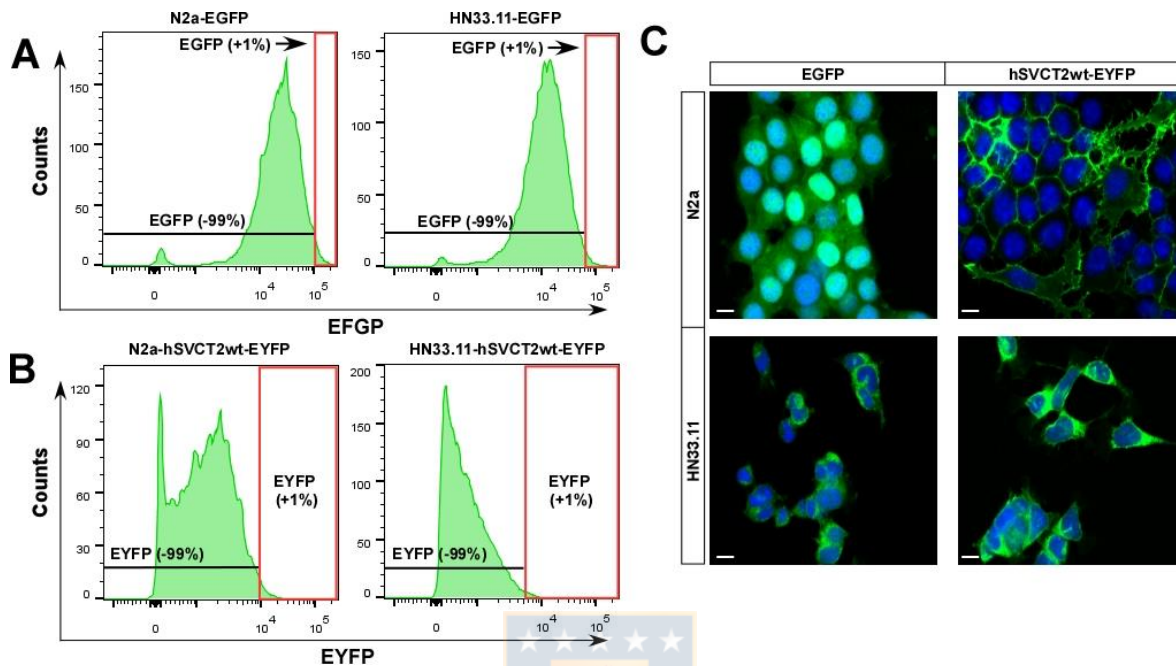
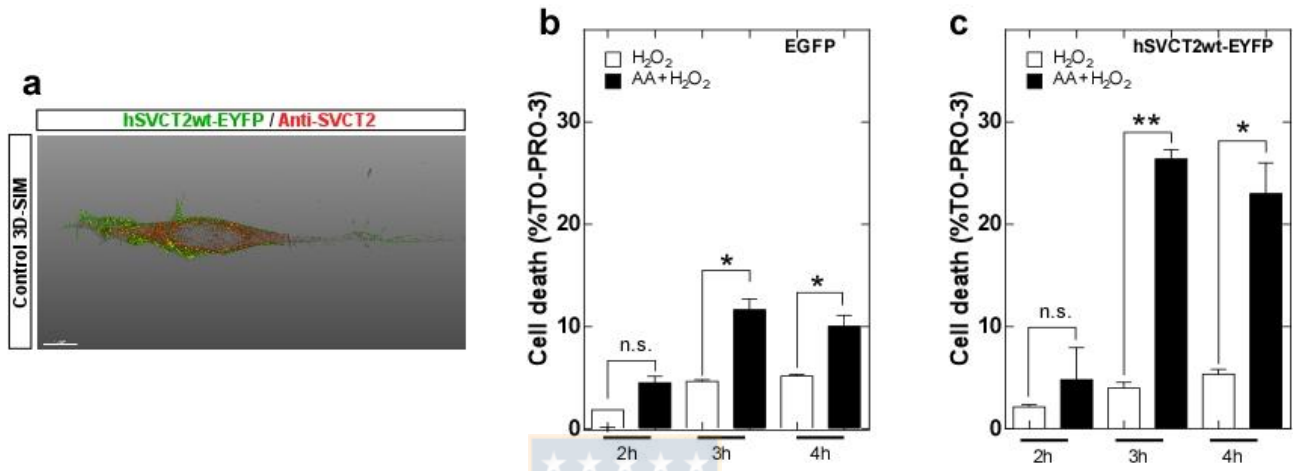


Figura 15. Generación de las líneas celulares N2a-EGFP, N2a- hSVCT2wt-EYFP, HN33.11-EGFP y HN33.11-hSVCT2wt-EYFP.

A,B. Estrategia de *sorting* para la selección del 1% de la población. Los recuadros rojos indican los “*gates*” del 1% más intenso. **C.** Análisis confocal de células N2a-EGFP, N2a- hSVCT2wt-EYFP, HN33.11-EGFP y HN33.11-hSVCT2wt-EYFP “*post sorting*”. Barra de tamaño 10 μ m. Hoechst fue utilizado como tinción nuclear.

N2a cells



HN33.11 cells

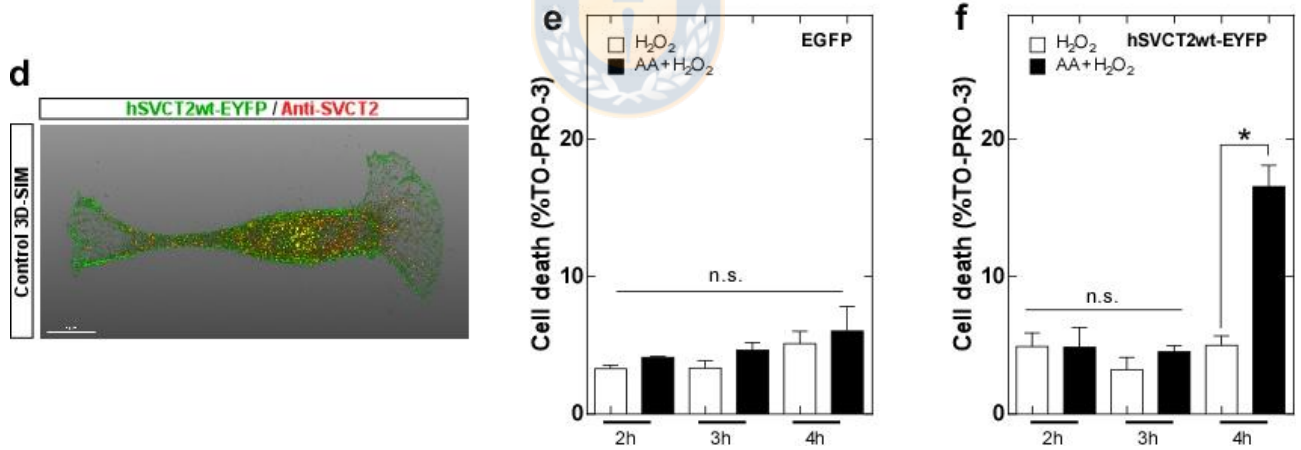


Figura 16. La sobre expresión de hSVCT2 incrementa la muerte neuronal inducida por la producción intracelular de DHA.

A,D. Análisis de super resolución SIM de la sobre expresión de hSVCT2. **B,E.** Cuantificación de la muerte celular por citometría de flujo en células N2a y HN33.11 que sobre expresan de manera estable EGFP. **C,F.** Cuantificación de la muerte celular por citometría de flujo en células N2a y HN33.11 que sobre expresan de manera estable hSVCT2. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SEM (n=3). ***p<0.001- **p<0.01- *p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*. *La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo.*

1.6. DHA es la molécula inductora de la muerte neuronal en condiciones de estrés oxidativo.

Con el objetivo de corroborar que DHA es la molécula que induce muerte neuronal, generamos células N2a KO para SVCT2 mediante CRISPR/cas9. Para llevar a cabo este experimento, transfectamos las células N2a con el plásmido *all in one* pD1331-AP (Atum). 48 horas post transfección, el 1% de la población más brillante fue sorteado mediante FACS de célula única a placas de 96 wells. Luego, mediante observación bajo el microscopio se buscaron colonias formadas desde clones individuales. Una vez que las colonias alcanzaron una confluencia adecuada, las células fueron expandidas a placas de 6 wells. Finalmente, cuando las colonias alcanzaron confluencia en los pocillos de 6 wells, las células fueron tripzinizadas y un 80% se dejó para análisis proteicos, mientras que el 20% restante se expandió para mantener las colonias como se resume en la estrategia experimental de la Figura 17.

Como se muestra en la Figura 18A, logramos obtener al menos 2 colonias KO para SVCT2 en las células N2a. Con el objetivo de validar nuestra línea celular SVCT2^{-/-}, realizamos ensayos de captación de AA^{14C}, donde determinamos que no hay transporte de AA (Figura 18B). Además, suplementamos las células SVCT2^{-/-} cada 12 horas durante 36 horas y posteriormente, cuantificamos los niveles de AA intracelular por el método de FRASC, donde no detectamos AA intracelularmente (datos no mostrados).

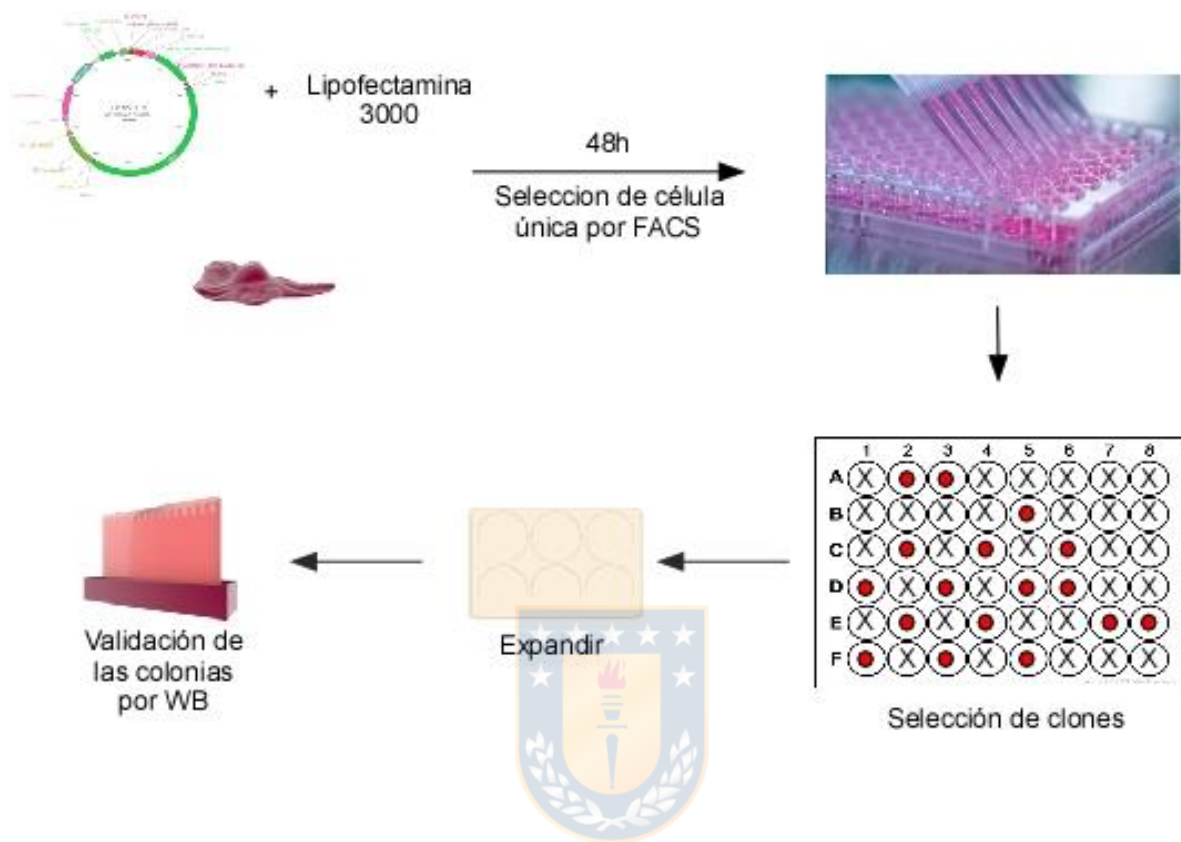


Figura 17. Esquema de la estrategia experimental para la obtención de clones KO a partir de “cell sorting” de célula única y CRISPR/Cas9.

Las células N2a fueron transfectadas con el plásmido “*all in one*” que contiene la Cas9, el gRNA y que expresa como reportero una proteína fluorescente. Luego de 48 horas de transfección, se realizó el “*cell sorting*” de célula única de las células que expresaron el reporte a placas de 96 pocillos. Posteriormente, la placa fue monitoreada en busca de colonias individuales. Finalmente, las colonias delecionadas para el gen de interés fueron validadas por western blot.

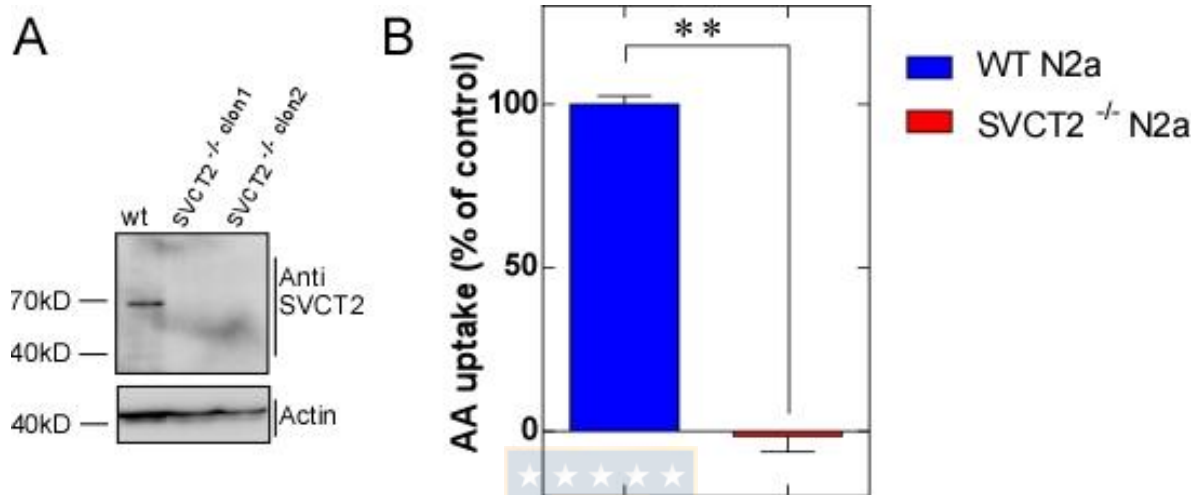


Figura 18. Las células N2a KO SVCT2 no transportan AA.

A. Validaciones de la delección de SVCT2 en células N2a por western Blot.

B. Transporte radioactivo de AA en células N2a^{SVCT2 (-/-)}. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

Con el fin de evaluar si DHA es la molécula inductora de muerte celular, utilizamos las células N2a^{Svct2(-/-)} para realizar experimentos de supervivencia y muerte celular. Mediante análisis de viabilidad determinamos que la muerte celular inducida por la oxidación intracelular de AA es completamente prevenida en las células N2a^{Svct2(-/-)} (Figura 19A). Sin embargo, al mismo tiempo determinamos que las células N2a^{Svct2(-/-)} son altamente sensibles al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ (Figura 19A). De este modo, y con el objetivo de alcanzar porcentajes de muerte similares a los descritos previamente para las células wt, realizamos una curva de tolerancia a H₂O₂ en las células N2a^{Svct2(-/-)}. Como se aprecia en la Figura 19B, los datos muestran que 50 μM de H₂O₂ es una concentración no tóxica para las células N2a^{Svct2(-/-)}. De este modo, utilizando 50 μM de H₂O₂ llevamos a cabo experimentos de muerte celular mediante citometría de flujo. Nuestros análisis de integridad de la membrana plasmática muestran que el tratamiento con H₂O₂ en las células N2a^{Svct2(-/-)} induce un 4% de muerte celular. Mientras que el tratamiento con AA+ H₂O₂ induce solo un 6,47% de muerte, mostrando claramente que la prevención de la captación de AA inhibe la muerte celular (Figura 19C). Al comparar la muerte celular de las células wt con las KO para SVCT2, encontramos que la delección de SVCT2 previene prácticamente un 100% la muerte celular (Figura 19D). De manera interesante, utilizando la estrategia experimental de la Figura 19E, determinamos que si las células N2a^{Svct2(-/-)} son sometidas a estrés al mismo tiempo que son tratadas con DHA, la viabilidad celular disminuye de manera significativa (Figura 19F). Estos datos sugieren fuertemente, que el mecanismo inductor de muerte dependiente de vitamina C en condiciones de estrés oxidativo es debido a la

acumulación intracelular de DHA, y no se debe a la hipótesis clásica de la oxidación extracelular de AA y posterior generación de H_2O_2 .



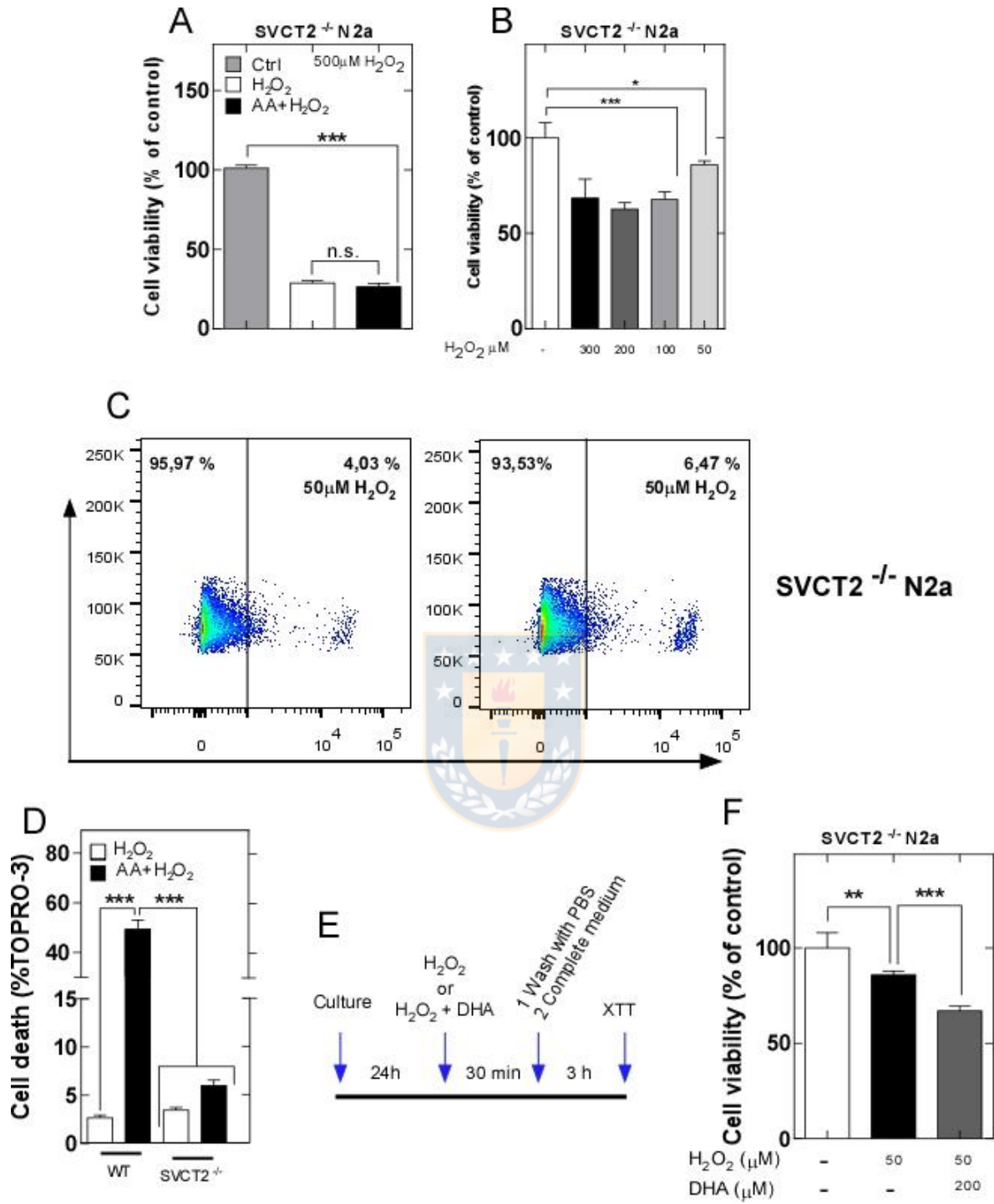


Figura 19. La delección de SVCT2 previene la muerte celular inducida por la oxidación intracelular de AA.

A. Análisis de viabilidad en células N2a^{Svct2(-/-)}. **B.** Curva de toxicidad de H₂O₂ en células N2a^{Svct2(-/-)}. **C.** Análisis de muerte celular determinado por citometría de flujo. **D.** Muerte celular de células wt y células N2a^{Svct2(-/-)}. **E.** Esquema del protocolo utilizado en F. **F.** Análisis de viabilidad en células N2a^{Svct2(-/-)} tratadas con DHA en condiciones de estrés oxidativo. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio ± SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

Capítulo 2.

2.1. La producción intracelular de DHA induce muerte por un mecanismo independiente de ROS y apoptosis.

Como se mostró en el capítulo 1, la oxidación de vitamina C en condiciones de estrés oxidativo de tipo IR, induce muerte neuronal. De este modo, y de acuerdo con nuestro objetivo de trabajo evaluamos el mecanismo de muerte celular. En primer lugar, pusimos a prueba las hipótesis clásicas de muerte celular inducida por vitamina C, que involucran aumento de ROS y apoptosis. Mediante análisis de citometría de flujo y la sonda CellRox, cuantificamos los niveles totales de ROS en células vivas a tiempo 0, 3h y 4 h post tratamiento. Las cuantificaciones de ROS muestran resultados diferentes dependiendo del tipo celular analizado. Por una parte, en la línea celular N2a, como era de esperar por el tratamiento con H₂O₂ indujo incremento de los ROS a todos los tiempos analizados (Figura 20A, B, pick azul). Sorprendentemente, cuando pre-incubamos las células con AA, y posteriormente indujimos estrés oxidativo, los niveles de ROS incrementaron inclusive más allá del tratamiento con H₂O₂ (Figura 20A, B, pick naranja). De este modo, en esta línea celular los datos muestran que la vitamina C no estaría actuando como un antioxidante. Por otro lado, en la línea celular HN33.11, encontramos que el tratamiento con H₂O₂ o H₂O₂+AA no inducen cambios en los niveles de ROS (Figura 20C, D). Posteriormente, con el objetivo de analizar si la producción de ROS es importante para la inducción de muerte, pretratamos las células con el antioxidante NAC (N-acetil-cisteína) durante 24h. Como se aprecia en la Figura 20E y 20F, el pretratamiento con dosis bajas (0,5mM) o altas (1mM) de

NAC no tiene ningún efecto protector en la viabilidad neuronal. Al mismo tiempo, evaluamos si la vía apoptótica podría estar involucrada en el proceso de muerte celular. Para evaluar la apoptosis utilizamos el inhibidor pan-caspasa zVAD.FMK. Cuando inhibimos la actividad de las caspasas, nuestros datos muestran que no existe efecto preventivo en la viabilidad celular (Figura 20G), contrariamente, como se observa en las células HN33.11, la inhibición de apoptosis favorece más aún la muerte celular (Figura 20H). De este modo, nuestros datos sugieren que el efecto antioxidante de vitamina C, no sería importante para la inducción de muerte. Mas aún, mostramos que la apoptosis no estaría involucrada en el proceso de muerte inducido por la oxidación de vitamina C.



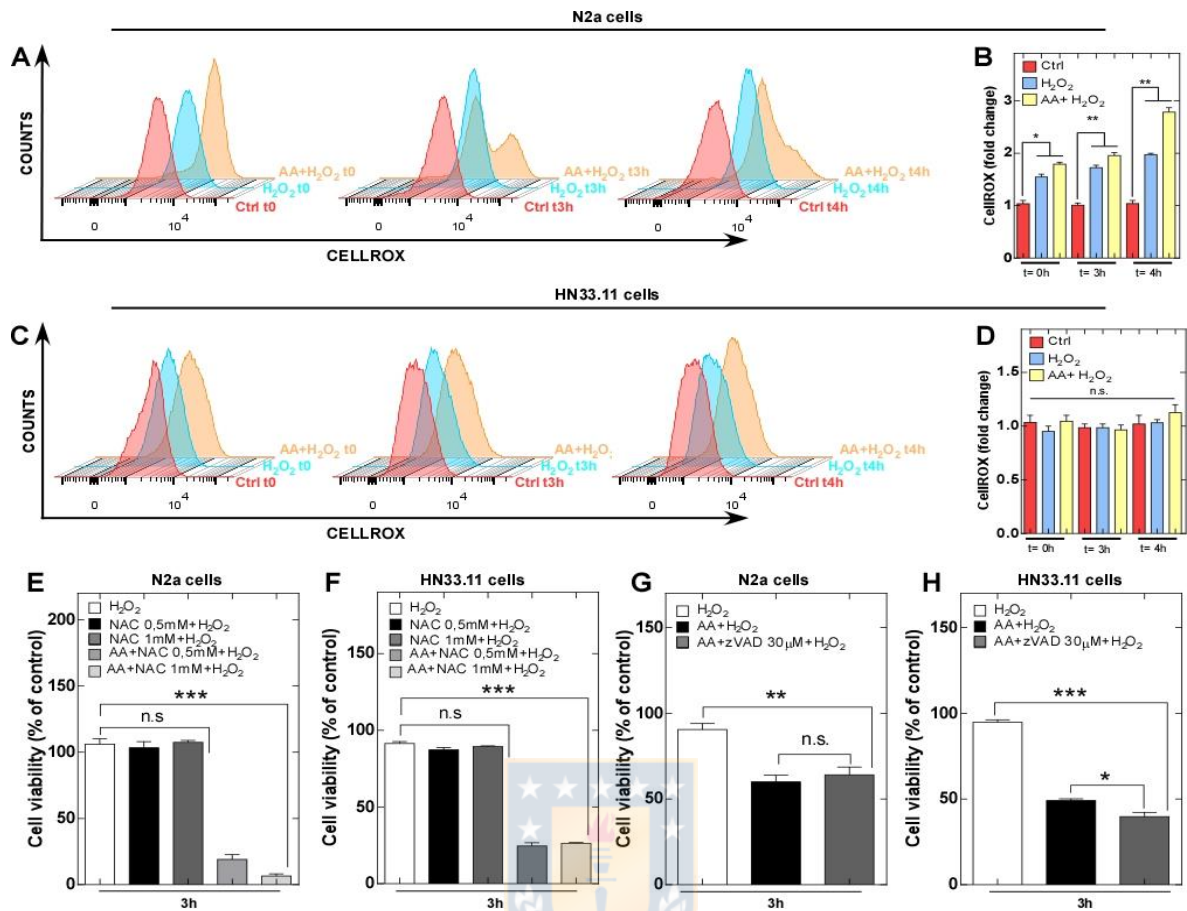


Figura 20. La inhibición de ROS o de la apoptosis no previene la muerte neuronal inducida por DHA. A,C. Producción intracelular de ROS en células N2a y HN33.11. **B,D.** Cuantificación de la producción intracelular de ROS respecto al control. **E,F.** Análisis de viabilidad en respuesta a la inhibición de ROS con NAC (pre tratamiento con NAC de 24h). **G,H.** Análisis de viabilidad en respuesta a la inhibición de la apoptosis. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Los datos representan el promedio \pm SEM (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo.

2.2. La producción intracelular de DHA, regula la expresión de RIPK1, RIPK3 y MLKL, estimulando la necroptosis.

Es este escenario, donde los ROS y la apoptosis no participan del proceso de muerte regulado por vitamina C, realizamos un análisis de la expresión de los principales genes apoptóticos y necroptóticos mediante PCR en tiempo real. Como se aprecia en la Figura 21A, 21I, la suplementación con AA tiene un efecto preventivo de la apoptosis a nivel de la expresión génica, debido a que induce sobre expresión de Bcl-2 y disminuye los niveles de caspasa 8. Al mismo tiempo, la suplementación de AA favorece la expresión de RIPK1 en ambos modelos analizados (Figura 21A, 21I). De manera interesante, la oxidación de AA mantiene los niveles de genes apoptóticos disminuidos. Sin embargo, la expresión de genes necroptóticos depende del tipo celular, por una parte, en las células N2a encontramos que la producción de DHA induce un incremento de 12 veces en la expresión de RIPK3, mientras que RIPK1 y MLKL mantienen niveles de expresión sin variación respecto a la condición control. Por otra parte, en las células HN33.11 determinamos que la producción de DHA induce una disminución significativa en los niveles de mRNA de MLKL, sin inducir cambios significativos en RIPK1 y RIPK3 (Figura 21A, 21I). Con el objetivo de corroborar si la expresión génica de los principales componentes de la maquinaria necroptótica se refleja en variaciones de los niveles proteicos, realizamos análisis de Western blot contra RIPK1 y MLKL (Figura 21B, 21J). Donde los análisis sugieren que existen cambios significativos de expresión. Nosotros cuantificamos los cambios en la expresión de las proteínas RIPK1 y MLKL mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales. Los datos muestran que la suplementación con AA induce un incremento significativo

en los niveles de RIPK1 y MLKL en las células N2a (Figura 21C-F). Mientras que en las células HN33.11 no se encontraron cambios significativos (Figura 21K-N). Posteriormente, analizamos la distribución de RIPK1, RIPK3 y MLKL mediante microscopía confocal espectral. Los análisis de inmunodetección en las células N2a muestran que AA, además de inducir aumento en la expresión de RIPK1 y MLKL, induce redistribución de estas proteínas hacia la membrana plasmática y en estructuras filamentosas en el citoplasma (Figura 21G, 21H). El patrón de redistribución recién descrito, no se observó en las células HN33.11 o en neuronas corticales (Figura 21O, 22B). Sin embargo, en ambas líneas celulares se aprecia que la oxidación de AA induce un drástico cambio morfológico, donde las células adquieren morfología “*balloon like*”, donde co-localizan RIPK1, RIPK3 y MLKL en la membrana plasmática (Figura 21G, 21O). Por otra parte, en neuronas corticales determinamos que el tratamiento con AA solo altera los niveles de mRNA de RIPK3, induciendo un incremento significativo de su expresión (Figura 22A), mientras que la producción de DHA induce una baja en la expresión de Bcl-2 y RIPK1, pero mantiene un incremento significativo en los niveles de mRNA de RIPK3 (Figura 22A). Al mismo tiempo, los niveles de proteína de RIPK1, RIPK3 y MLKL fueron determinados mediante inmunofluorescencia (Figura 22B). Estos resultados nos conducen a proponer que la vía necroptótica podría ser el mecanismo de inducción de muerte regulado por la oxidación intracelular de AA hasta DHA. De manera interesante, encontramos que la suplementación con AA regula la expresión de RIPK1 y MLKL a nivel de mRNA en neuronas corticales. Como se puede apreciar en la Figura 23A mediante PCR convencional, MLKL presenta una isoforma corta, y la suplementación con AA sugiere que se induce un aumento de la expresión de

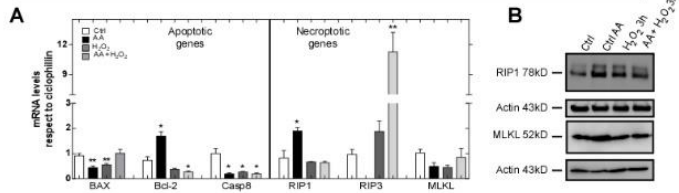
MLKL, tanto de la forma endógena como de la isoforma corta (Figura 23A). Este tipo de regulación fue observado solo en cultivos primarios, pero no en cerebro total embrionario. Por otra parte, respecto al mRNA de RIPK1 encontramos que existe una isoforma larga, la cual parece ser removida con la suplementación de AA (Figura 23B). A diferencia de lo observado con MLKL, encontramos que las isoformas de RIPK1 son encontradas solo en tejido embrionario y no en tejido adulto (Figura 23C). Con el objetivo de determinar a qué se debía esta isoforma larga, secuenciamos el producto de PCR, y los estudios de bio-informática mostraron que en el mRNA de RIPK1 existía la retención de un fragmento intrónico de DNA de 112 pares de bases entre el exón 4 y 5 (Figura 23D). Este resultado sugiere que AA favorece la expresión de la forma endógena (o activa) de RIPK1, durante el desarrollo embrionario.

Con el fin de evaluar la activación de necroptosis, analizamos la fosforilación de RIPK1 en la serina 166 mediante inmunofluorescencia. Nuestros datos muestran que existe un nivel basal de fosforilación de RIPK1 en las células tratadas con H₂O₂ (Figura 24A, superior). Sin embargo, esta fosforilación no estaría relacionada a un proceso de muerte debido a que el tratamiento con H₂O₂ no induce muerte celular bajo nuestras condiciones experimentales. Por otra parte, cuando se induce la generación intracelular de DHA y se analiza la fosforilación de RIPK1 a tiempo 0 y 1h post tratamiento, determinamos que existe un incremento significativo de la marca para P-RIPK1 (Figura 24A, inferior, 24C, 24D).

En este escenario, analizamos la inhibición de RIPK1 con Necrostatina-1 y la fosforilación de la proteína ejecutora de la necroptosis, MLKL. Como se muestra en

la Figura 25A, 25H, la inhibición de RIPK1 previene la muerte neuronal inducida por la producción de DHA de manera dosis dependiente, en ambas líneas celulares. Por otra parte, mediante inmunodetección determinamos que la producción intracelular de DHA induce fosforilación de MLKL, la cual se encuentra distribuida específicamente en la membrana plasmática en ambas líneas celulares (Figura 25B, 25I). Mediante análisis de colocalización 3D realizados con Imaris, se determinó que MLKL colocaliza con P-MLKL (Figura 25C, 25J). De manera interesante, nuestros datos muestran que previamente a que P-MLKL se distribuya hacia la membrana plasmática, ésta transloca rápidamente al núcleo (Figura 25D). Al mismo tiempo, nuestros análisis de perfil de fluorescencia muestran que MLKL y P-MLKL tienen la misma distribución espacial (Figura 25E, 25K) y ambas líneas se observa incremento en la intensidad de fluorescencia (Figura 25F, 25L). Estos datos sugieren fuertemente que la producción intracelular de DHA en condiciones de IR *in vitro* induce activación de necroptosis.

N2a



HN33.11

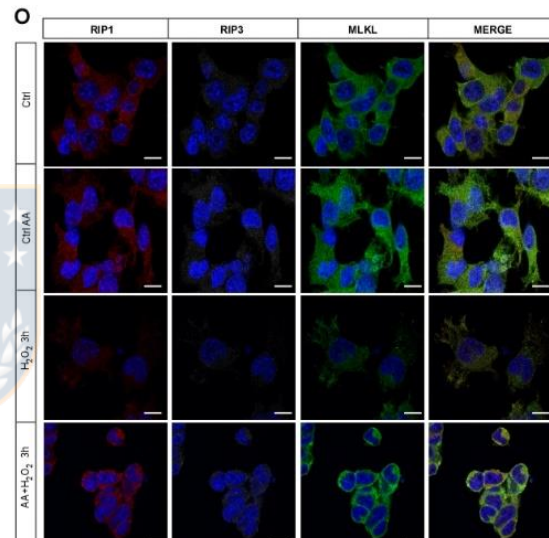
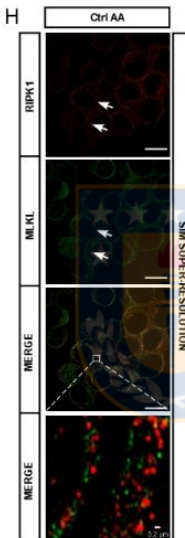
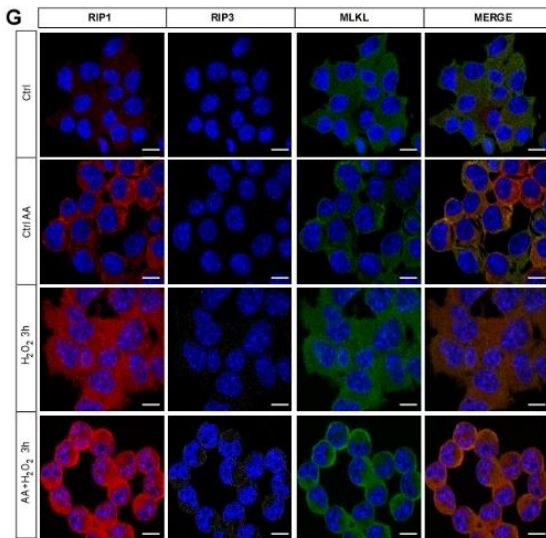
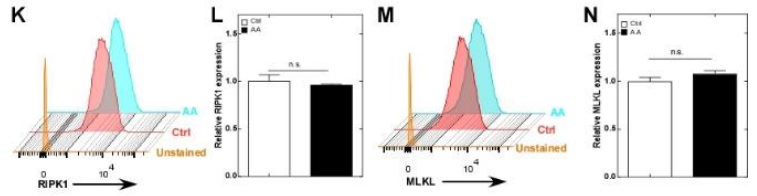
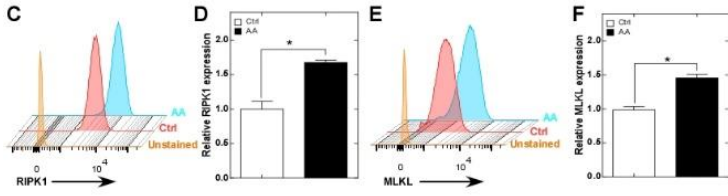
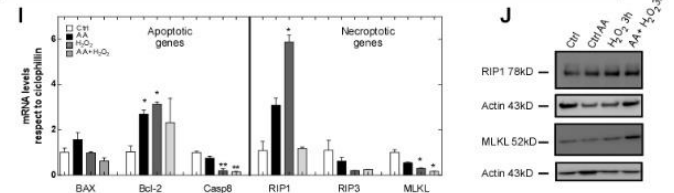


Figura 21. Vitamina C regula la expresión de RIPK1, RIPK3 y MLKL, estimulando la necroptosis.

A,I. Niveles relativos de mRNA de genes apoptóticos y necroptóticos determinados por qRT-PCR. **B,J.** Expresión de RIPK1 y MLKL en células N2a y HN33.11 determinado por western blot. **C,K.** Expresión de RIPK1 determinada por citometría de flujo (50.000 cuentas). **D,L.** Cuantificación relativa de la expresión de RIPK1 por citometría de flujo. **E,M.** Niveles de expresión de MLKL determinados por citometría de flujo (50.000 cuentas). **F,N.** Cuantificación relativa de la expresión de MLKL por citometría de flujo. **G,O.** Análisis de expresión y localización de RIPK1, RIPK3 y MLKL por microscopía confocal. **H.** Análisis de super resolución SIM y MLKL en células N2a tratadas con AA. Las condiciones H₂O₂ y AA+H₂O₂ corresponden en todos los casos a 3h post tratamiento, células control corresponden a células sin tratar, el tratamiento con AA corresponde a tratamiento de 36 h con AA. El procediendo en detalle se encuentra descrito en los métodos. Barra de tamaño 10µm. Los datos representan el promedio ± SEM (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de t-student. *La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo.*

Cortical Neurons

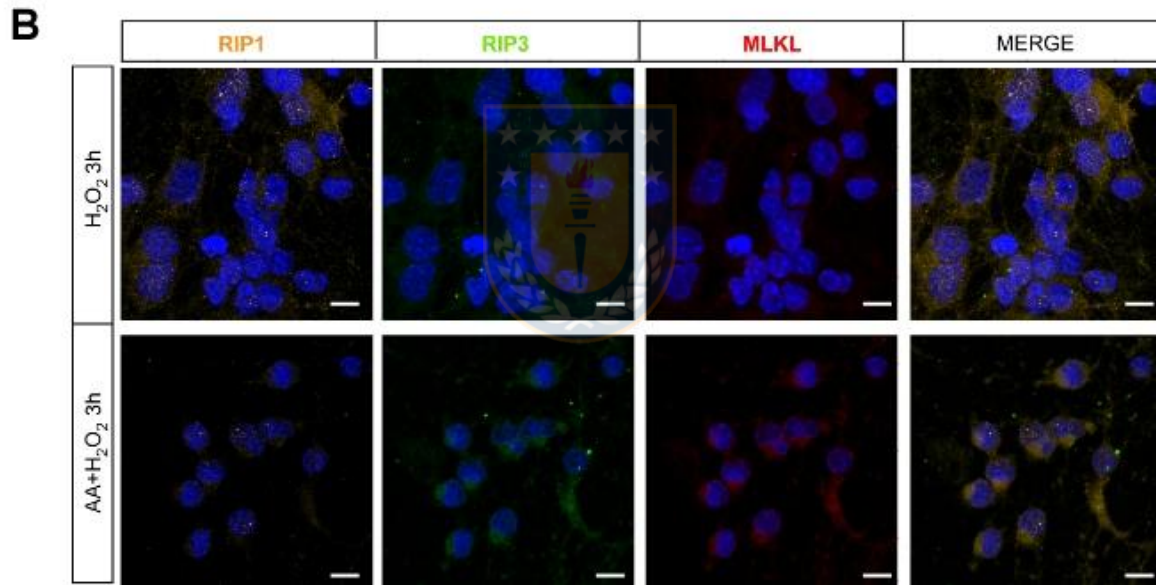
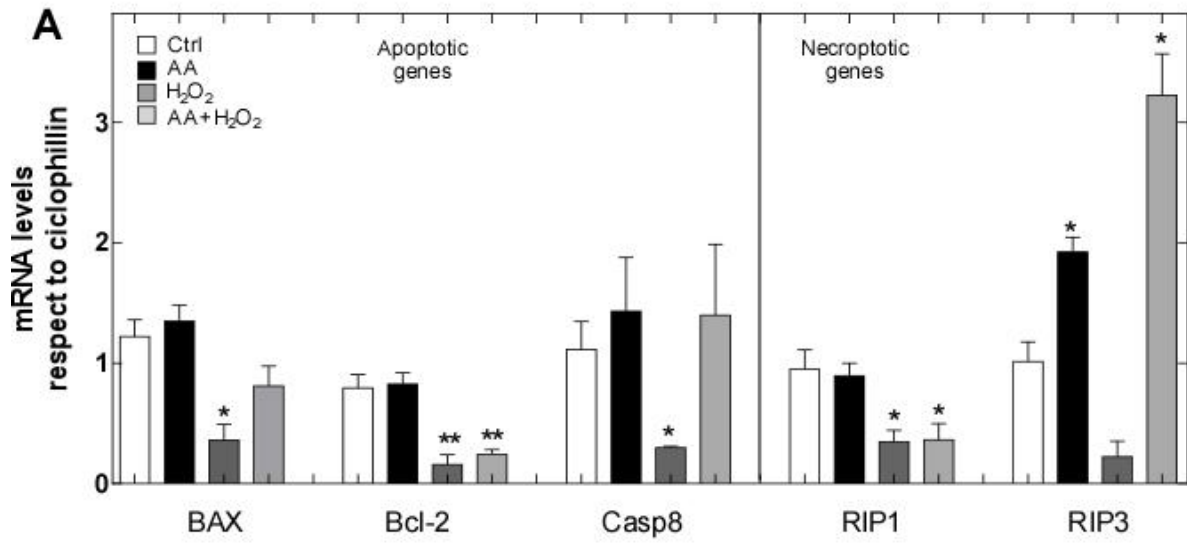


Figura 22. Vitamina C regula la expresión de RIPK1 y RIPK3 estimulando la necroptosis en neuronas corticales.

A. Niveles relativos de mRNA de genes apoptóticos y necroptóticos en neuronas corticales determinados por qRT-PCR. **B.** Análisis de expresión y localización de RIPK1, RIPK3 y MLKL en neuronas corticales determinado por microscopía confocal. Las condiciones H₂O₂ y AA+H₂O₂ corresponden en todos los casos a 3h post tratamiento, células control corresponden a células sin tratar, el tratamiento con AA corresponde a tratamiento de 36 h con AA. El procedimiento en detalle se encuentra descrito en los métodos. Barra de tamaño 10 μm. Los datos representan el promedio ± SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

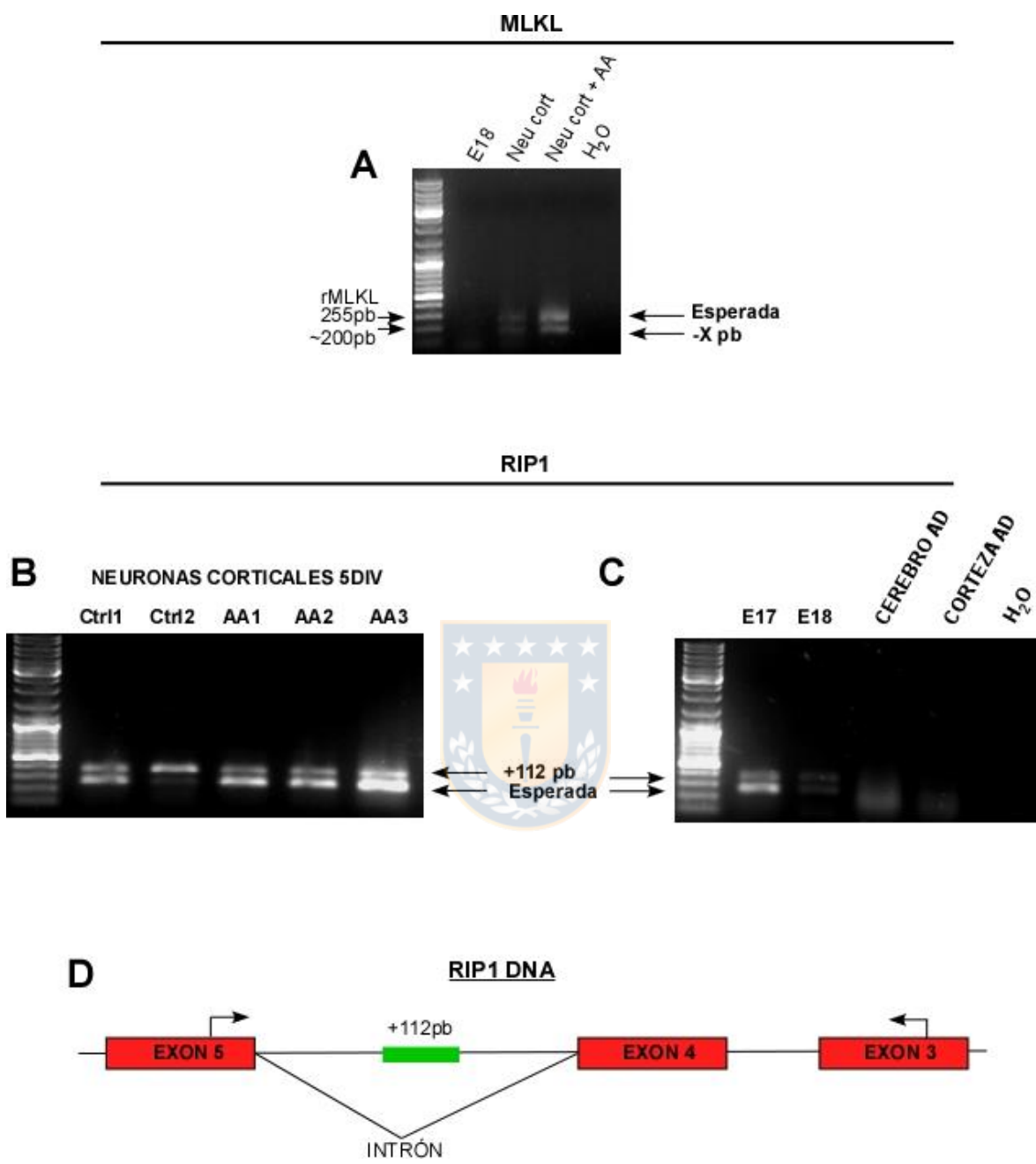


Figura 23. AA regula el splicing de MLKL y RIPK1.

A. Expresión de isoformas de MLKL determinadas por PCR convencional en respuesta al tratamiento con AA en neuronas corticales. **B.** AA favorece la expresión de la forma endógena de RIPK1 en neuronas corticales *in vitro*. **C.** La isoforma larga de RIPK1 se expresa en tejido cerebral embrionario *in vivo*. **D.** Esquema de la secuenciación de la isoforma larga de RIPK1.



N2a

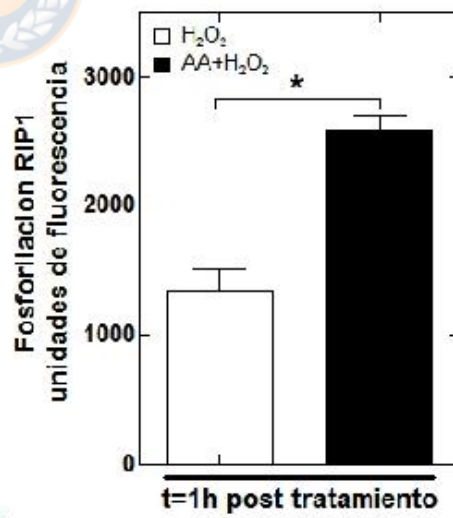
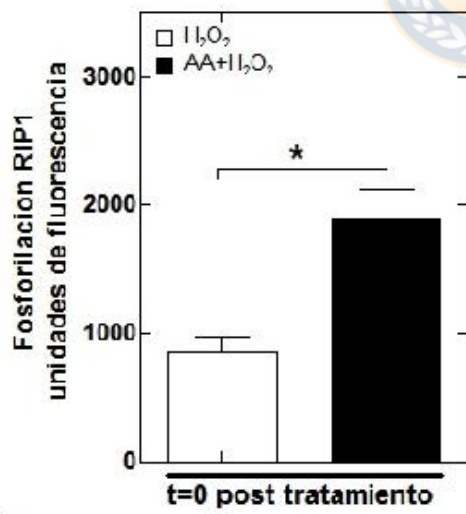
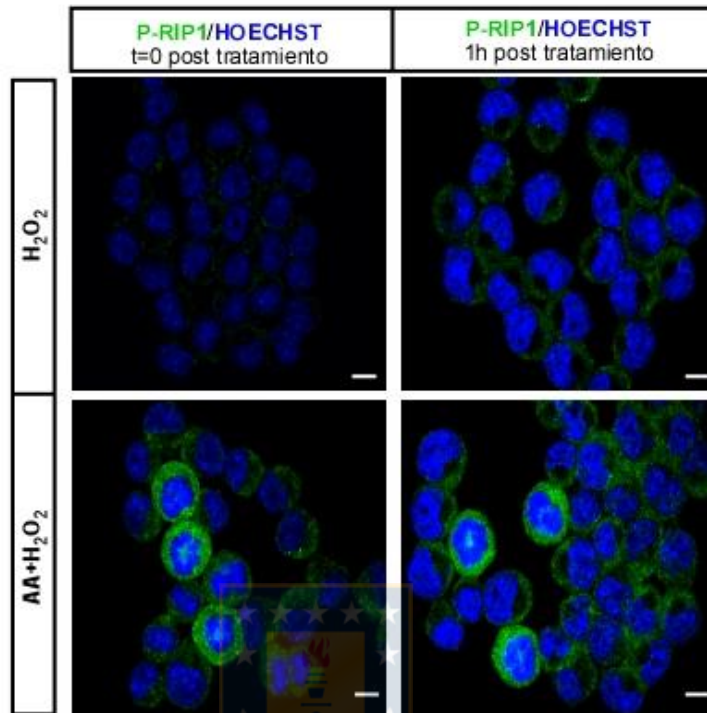


Figura 24. La oxidación intracelular de DHA favorece una rápida fosforilación de RIPK1. A. Fosforilación de RIPK1 en la serina 166 en células N2a determinado por microscopía confocal. **B,C.** Cuantificación de la fosforilación de RIPK1 a tiempo 0 y 1h post tratamiento. Barra de tamaño 10 μm . Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

N2a

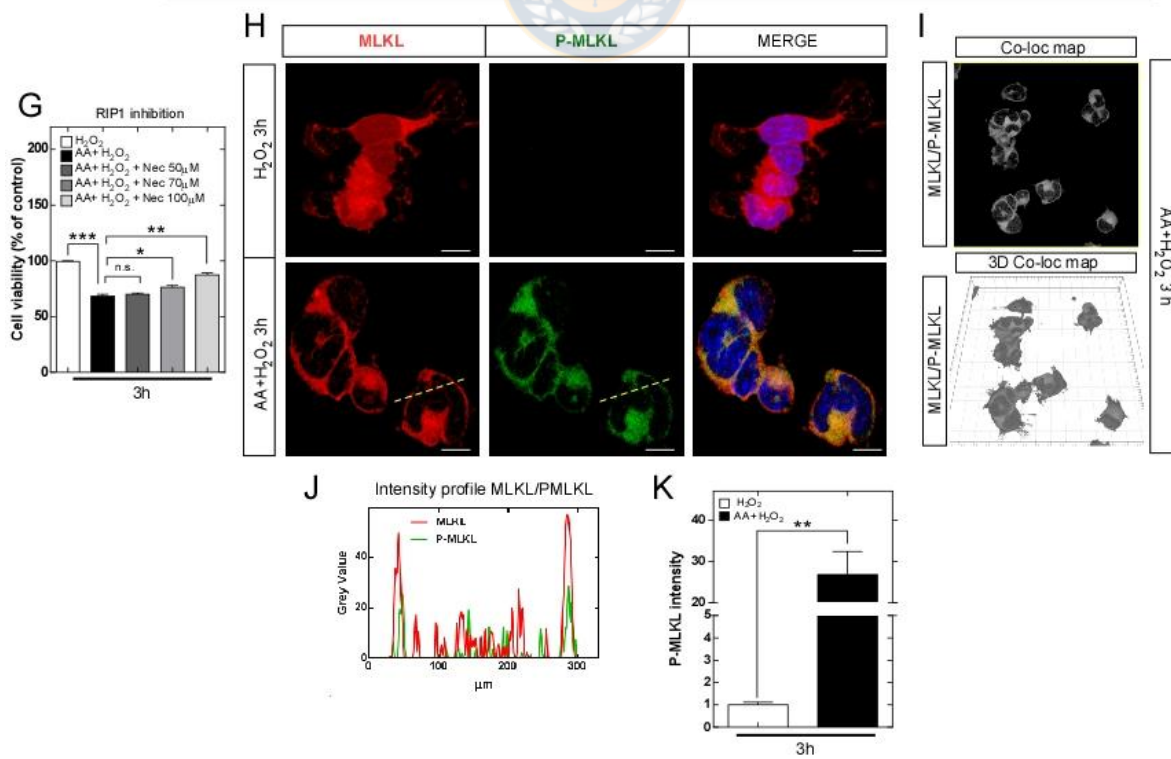
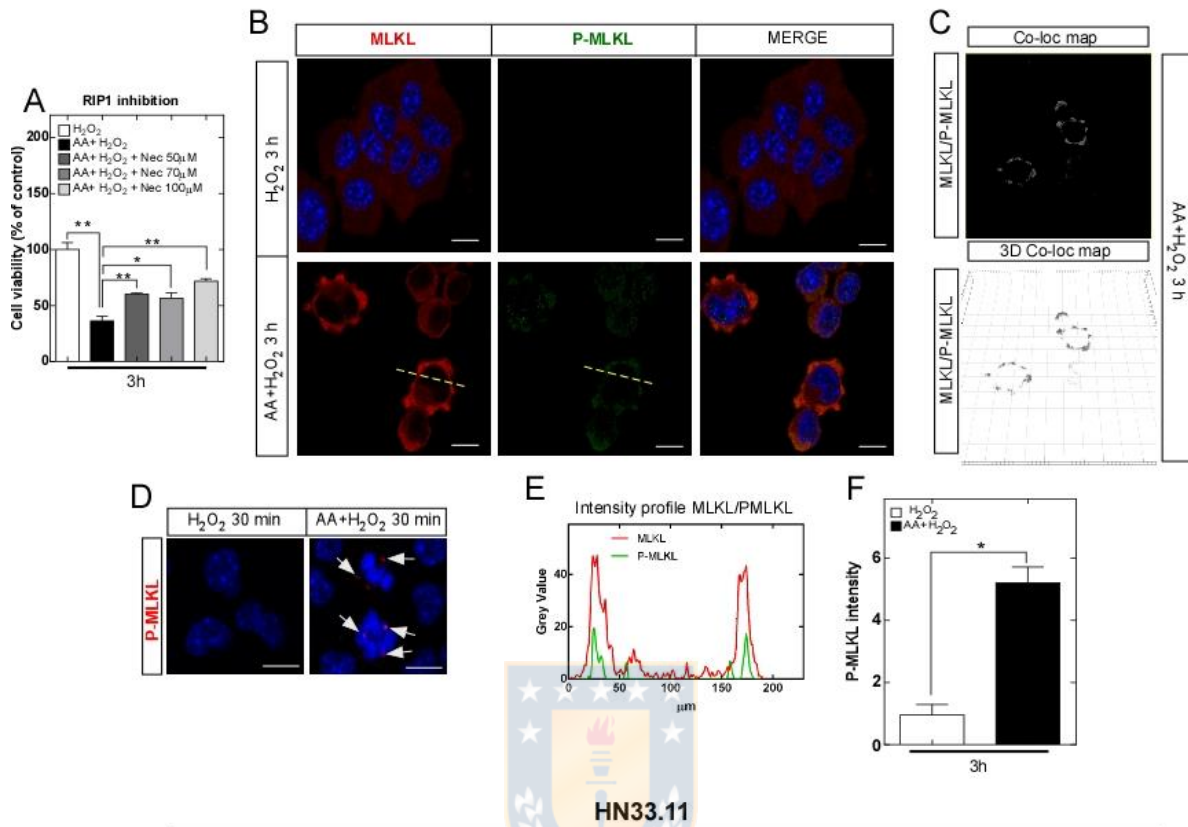


Figura 25. La producción intracelular de DHA induce muerte por necroptosis.

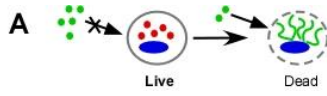
A,G. Inhibición de la necroptosis con necrostatina-1. **B,H.** Microfotografías de la fosforilación de MLKL. **C,I.** Mapa de colocación 3D de P-MLKL/MLKL determinado por Imaris. **D.** Traslocación nuclear de P-MLKL. **E,J.** Perfil de intensidad de fluorescencia de P-MLKL/MLKL. **F,K.** Cuantificación de la fosforilación de MLKL. Barra de tamaño 10µm. Los datos representan el promedio ± SD (n=3).

***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

La descripción estadística y n experimentales exactos de esta figura se encuentran en el anexo.

2.3. La muerte neuronal inducida por la producción intracelular de DHA, comparte las características de desintegración necroptótica.

A pesar de la evidencia antes descrita, la única forma de corroborar que existe muerte celular dependiente de necroptosis, es la evaluación de las características de desintegración durante el proceso de muerte. Nosotros evaluamos las características de desintegración mediante microscopia de célula viva en tiempo real 4D, como se resume en la Figura 26A, 256. Nuestros análisis de microscopia en tiempo real muestran claramente que las células N2a y HN33.11 reproducen las características de desintegración previamente descritas para la necroptosis (Gong et al., 2017). Como se determinó en la Figura 26B, 26C, tanto las células N2a como las HN33.11 muestran que la integridad de núcleo (azul) se mantiene durante el proceso de muerte. Al mismo tiempo, en ambas células se aprecia que a medida que se desencadena la muerte celular ocurre la formación de burbujas en la membrana plasmática (blanco, flechas) (Figura 26B, 26C). Lo que viene acompañado de una disminución de la actividad mitocondrial (rojo) (Figura 26B, 26C). Lo que finalmente converge en el colapso celular y el derramamiento del citoplasma (campo claro) y la incorporación de faloidina desde el medio de cultivo (verde) (Figura 26B, 26C). Al extender el tiempo del experimento desde la hora 3 a la hora 5, corroboramos que el proceso necroptótico ocurre en todas las células, manteniendo la integridad del núcleo, pérdida de la actividad mitocondrial y finalmente induciéndose la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y derramamiento del contenido citoplasmático al medio de cultivo (Figura 26E). Los resultados previamente descritos fueron reproducidos de igual manera en neuronas corticales (Figura 27A).



Mitotracker CMXRos/Cellmask/Hoeschst 33342/Phalloidin/ DIC

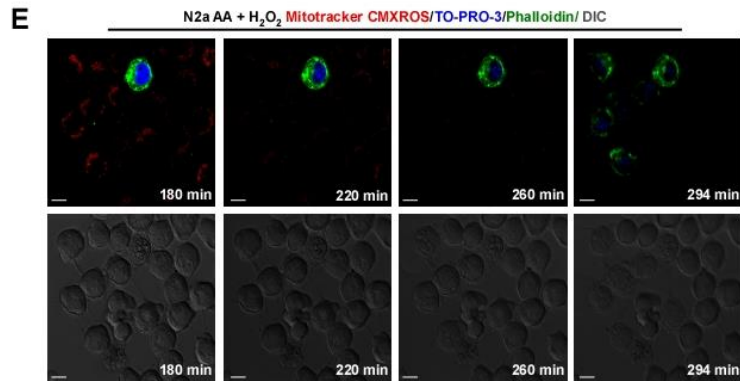
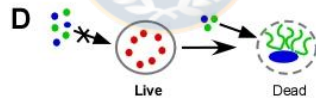
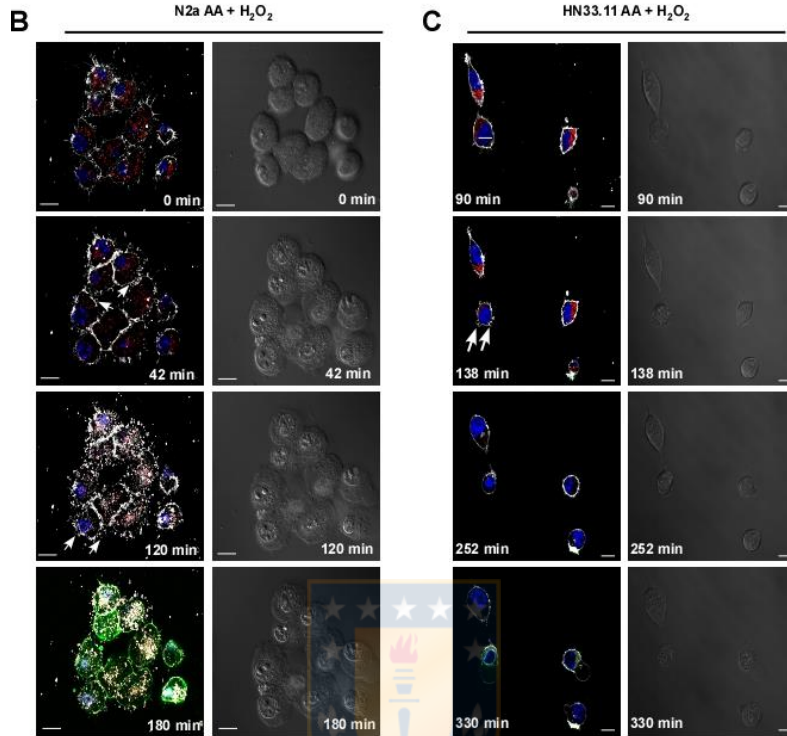


Figura 26. La producción intracelular de DHA induce características de desintegración necroptótica.

A,D. Esquema de la discriminación entre células vivas y muertas. **B,C.** Formación de burbujas y características de desintegración neuronal durante la necroptosis en células N2a y HN33.11. **E.** Actividad mitocondrial y derramamiento del citoplasma durante la necroptosis neuronal en células N2a. Barra de tamaño 10 μ m. Cellmask fue utilizado como tinción de membrana plasmática, MitotrackerCMXRos como marcador mitocondrial, Hoechst 33342 se utilizó como tinción nuclear. TOPRO-3 y faloidina-alexa 488 fueron utilizados como indicadores de la integridad de la membrana plasmática.

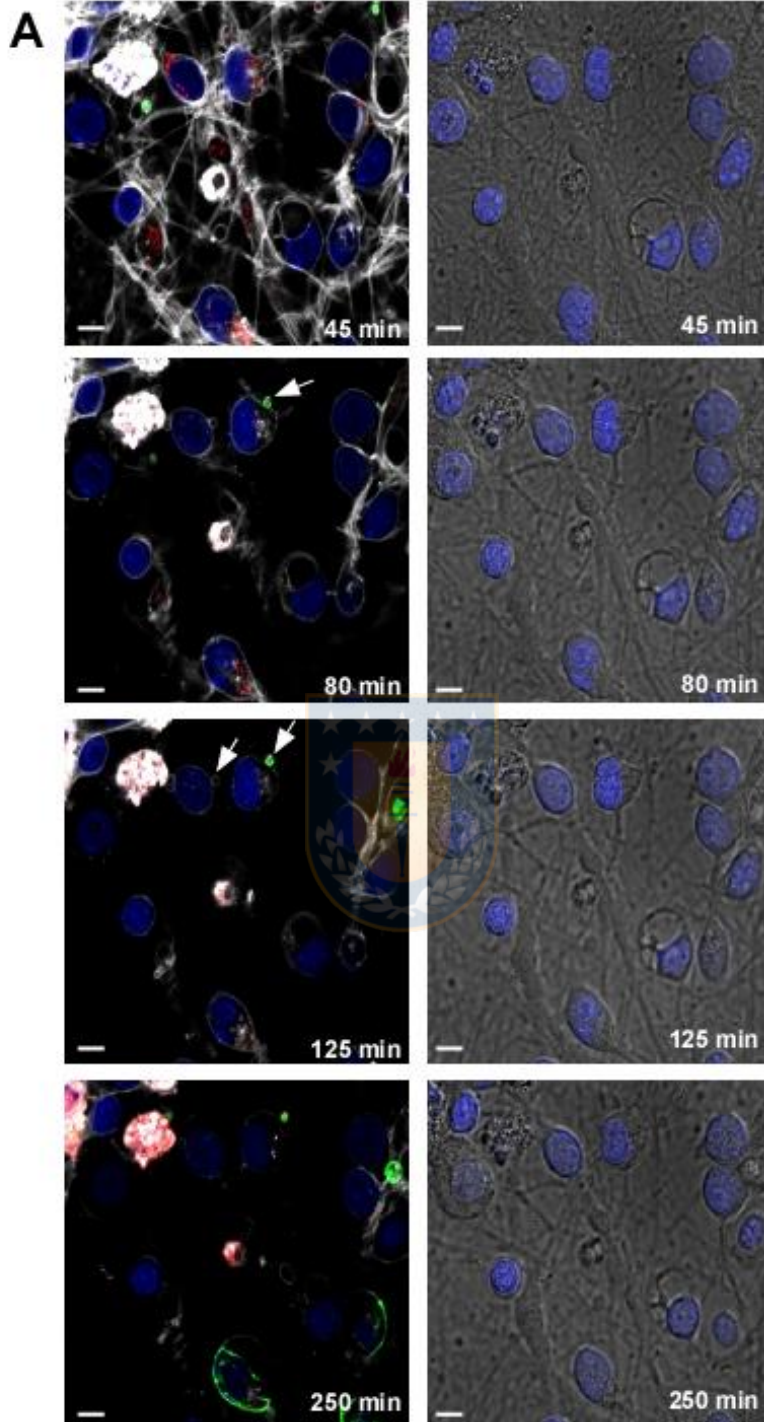


Figura 27. Análisis de microscopia de célula viva en tiempo real en neuronas corticales.

A. Formación de burbujas y características de desintegración neuronal durante la necroptosis de neuronas corticales de rata. Barra de tamaño 10 μm . Cellmask fue utilizado como tinción de membrana plasmática, MitotrackerCMXRos como marcador mitocondrial, Hoechst 33342 se utilizó como tinción nuclear. Faloidina-alexa 488 fue utilizada como indicador de la integridad de la membrana plasmática.

Como se acaba de mostrar en las Figuras 26 y 27, el proceso de muerte celular inducido por la producción intracelular de DHA detiene la actividad mitocondrial. De esta forma, mediante microscopía de super resolución SIM, analizamos si existe daño mitocondrial y si la inhibición de la fisión mitocondrial dependiente de Drp-1 previene la necroptosis neuronal. Tomando ventaja del múltiple marcaje de la microscopia de SIM, también analizamos si el transportador de vitamina C, SVCT2, se encuentra localizado en las mitocondrias de células neuronales. Los análisis de microscopia de super resolución SIM, mostraron que el tratamiento con H₂O₂ no induce daño mitocondrial (Figura 28A, 28B, 29A, 29B, 29C). Sin embargo, como se observa en la Figura 28C, 29D, 29E, 29F la producción intracelular de DHA induce gran fragmentación mitocondrial. Al mismo tiempo, nuestros datos sugieren que SVCT2 no estaría localizado en las mitocondrias (Figura 28B, 28C, 29E, 29F). Debido a que la super resolución SIM permite la toma de imágenes en 3D, cuantificamos el volumen y el tamaño mitocondrial en 3D mediante la herramienta de Bounding Box (Figura 28D). Nuestros datos muestran que la producción intracelular de DHA induce disminución del tamaño mitocondrial en los ejes x e y, mientras que el volumen también se ve disminuido de manera significativa (Figura 28E, 29G). Por otra parte, analizamos la morfología mitocondrial mediante parámetros elípticos ovalado, prolato y esfericidad. Los análisis de la forma mitocondrial en 3D muestran que la producción de DHA induce drásticos cambios morfológicos en las mitocondrias, donde se ve favorecida la morfología esférica y prolato, mientras que el carácter oblato disminuye (Figura 28F-H), cambios similares fueron observados en neuronas corticales (Figura 29H, 29I, 29J). Debido a que nuestros datos muestran que existe daño mitocondrial, evaluamos si la inhibición de

Drp-1 con Mdivi (Lackner and Nunnari, 2010) previene la muerte neuronal. En la Figura 28I, 29K se resume el protocolo utilizado para el tratamiento con Mdivi. De manera sorprendente, cuando inhibimos la fisión mitocondrial dependiente de Drp-1 no encontramos ningún efecto protector, por el contrario, los datos de viabilidad muestran que la inhibición de Drp-1 genera una tendencia a favorecer la muerte neuronal (Figura 28J, 29L, 29M). Descartando de esta forma la participación de Drp-1 en la activación de la necroptosis. Bajo estas condiciones experimentales, el daño mitocondrial sería una consecuencia de la necroptosis, pero no sería el desencadenante de esta vía, marcando una clara diferencia con la activación intrínseca de la apoptosis.



Mitochondrial parameters, N2a cells

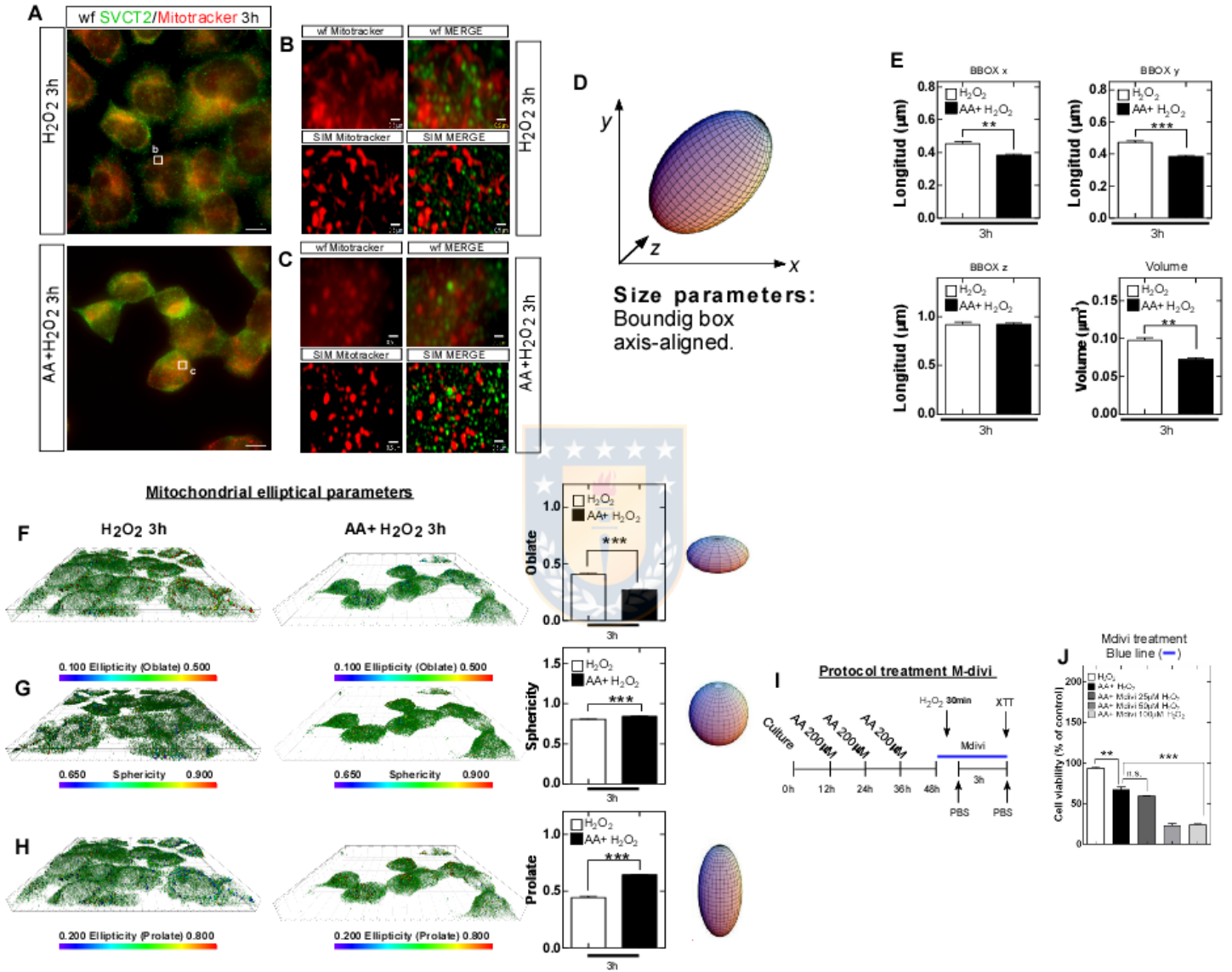
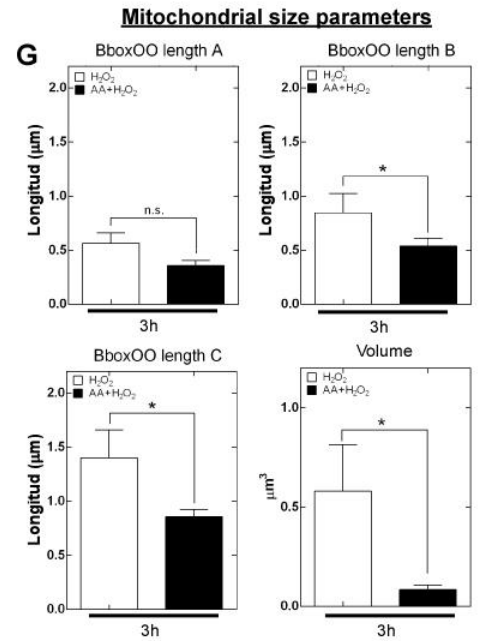
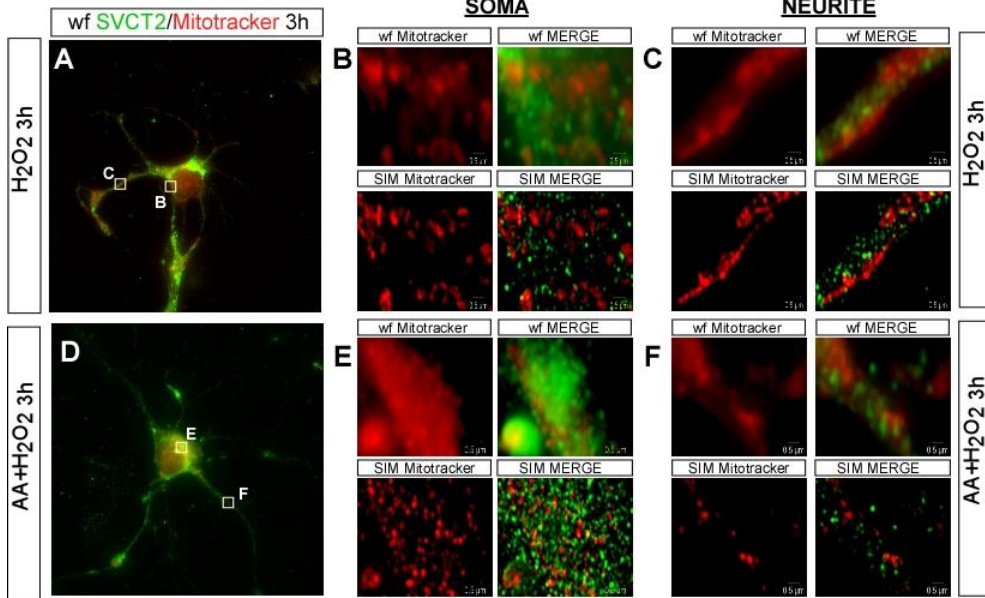


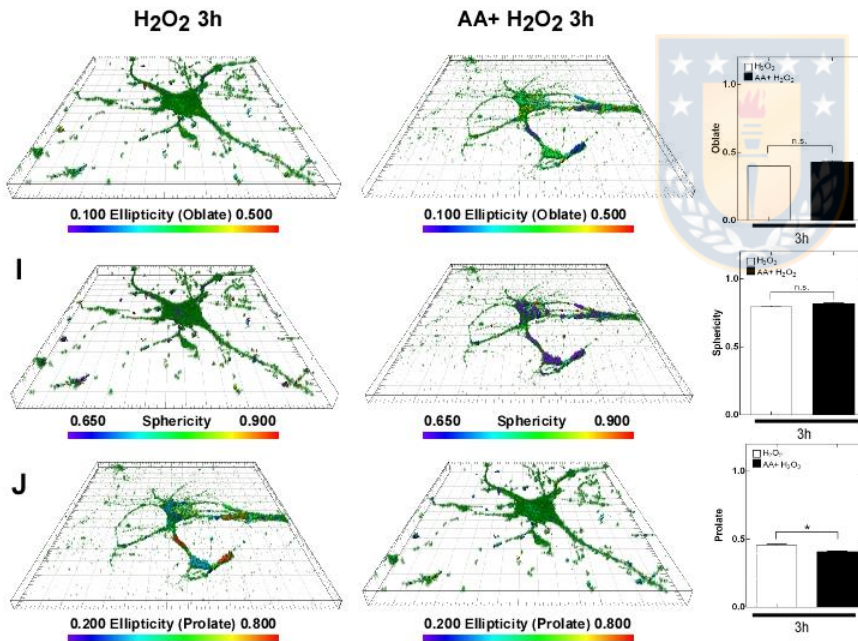
Figura 28. La producción de DHA induce daño mitocondrial independiente de Drp-1

A. Microscopía wild field. **B,C.** Microscopía de super resolución SIM. **D.** Esquema del análisis de bounding-box alineado a los ejes coordenados. **E.** Parámetros de tamaño mitocondrial. **F,G,H.** Análisis de parámetros mitocondriales elípticos (oblato, prolato y esfericidad). **I.** Esquema del tratamiento con Mdivi-1. **J.** Análisis de viabilidad 3h post tratamiento. 50nM de mitotrackerCMXRos fue utilizado como tinción mitocondrial. Barra de tamaño 500nm. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). *** $p < 0.001$ - ** $p < 0.01$ - * $p < 0.05$; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

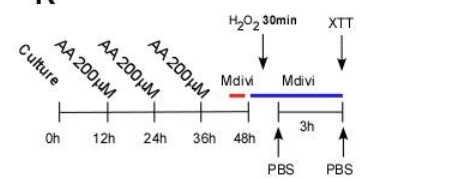
Cortical neuron



H Mitochondrial elliptical parameters



K Protocol treatment M-divi



Cortical neuron

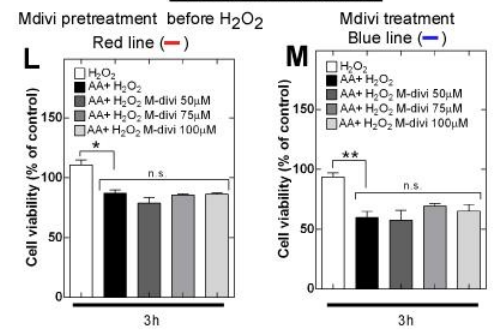


Figura 29. La producción de DHA induce daño mitocondrial independiente de Drp-1 en neuronas corticales de rata.

A,B. Microscopia wild field. **B, E.** Microscopía de super resolución SIM del soma neuronal o de las neuritas (**C, F**). **G.** Análisis de parámetros mitocondriales de tamaño. **H,I,J.** Análisis de parámetros morfológicos mitocondriales. **K.** protocolo utilizado en **L** o **M**. **L,M.** Inhibición de Drp-1 con Mdivi-1. 50nM de mitotrackerCMXRos fue utilizado como tinción mitocondrial. Barra de tamaño 500nm. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

2.4. La producción intracelular de DHA induce muerte por necroptosis.

Como se ha mencionado con anterioridad, la proteína ejecutora de la necroptosis es MLKL. Para corroborar que la vía de muerte inducida por la producción intracelular de DHA es la necroptosis, mediante CRISPR/Cas9 generamos células KO para MLKL (Figura 30A). Al mismo tiempo, corroboramos que la deleción genética de MLKL no tiene impacto en la expresión de otros componentes de la vía necroptótica como RIPK1 (Figura 30A). Una vez establecida la línea celular N2a^{mlkl^{-/-}}, mediante microscopía de célula viva analizamos si las características de desintegración neuronal inducida por DHA. Como se aprecia en la Figura 30B, en respuesta a la producción intracelular de DHA, las células N2a wt pierden su morfología y actividad mitocondrial, forman burbujas en la membrana plasmática mientras que pierden la integridad de la membrana al mismo tiempo que se mantienen la estructura nuclear. Sorprendentemente, las células N2a^{mlkl^{-/-}} a las 3 horas post tratamiento, mantienen sus procesos, morfología y actividad mitocondrial, y tampoco se observa la formación de burbujas en la membrana plasmática (Figura 30B). Posteriormente, realizamos ensayos de muerte mediante citometría de flujo e integridad de la membrana plasmática por la incorporación de TOPRO-3. Nuestros datos muestran que las células N2a^{mlkl^{-/-}}, son resistentes a la muerte inducida por la producción intracelular de DHA (Figura 30C), corroborando de esta forma que DHA induce muerte por necroptosis en condiciones de estrés oxidativo. Sin embargo, estudios previos han mostrado que la deleción de MLKL solo retrasa la muerte celular, pero sin llegar a prevenirla de manera constante. De este modo, decidimos analizar qué pasa con la muerte celular a las 6 horas postratamiento. Nosotros analizamos la muerte celular en las células N2a^{mlkl^{-/-}}

mediante citometría de flujo, y encontramos que al extender la duración del experimento hasta las 6 horas igualmente se induce muerte neuronal (Figura 31A). Nosotros hipotetizamos que la delección de MLKL, podría inducir apoptosis descontrolada por sobre activación de RIPK1. Así, inhibimos la apoptosis con zVAD.FMK, sin embargo, no encontramos ningún efecto protector sobre la muerte neuronal inducida por DHA (Figura 31A, 31B). Al mismo tiempo, inhibimos la activación de RIPK1 con Necrostatina-1, y de manera inesperada encontramos que la inhibición de la fosforilación de RIPK1 indujo más muerte aún (Figura 31A, 31B). Sugiriendo de esta forma, que la delección de MLKL induce algún tipo de muerte dependiente de RIPK1, pero independiente de caspasas.



Live cell microscopy N2a 3h post treatment

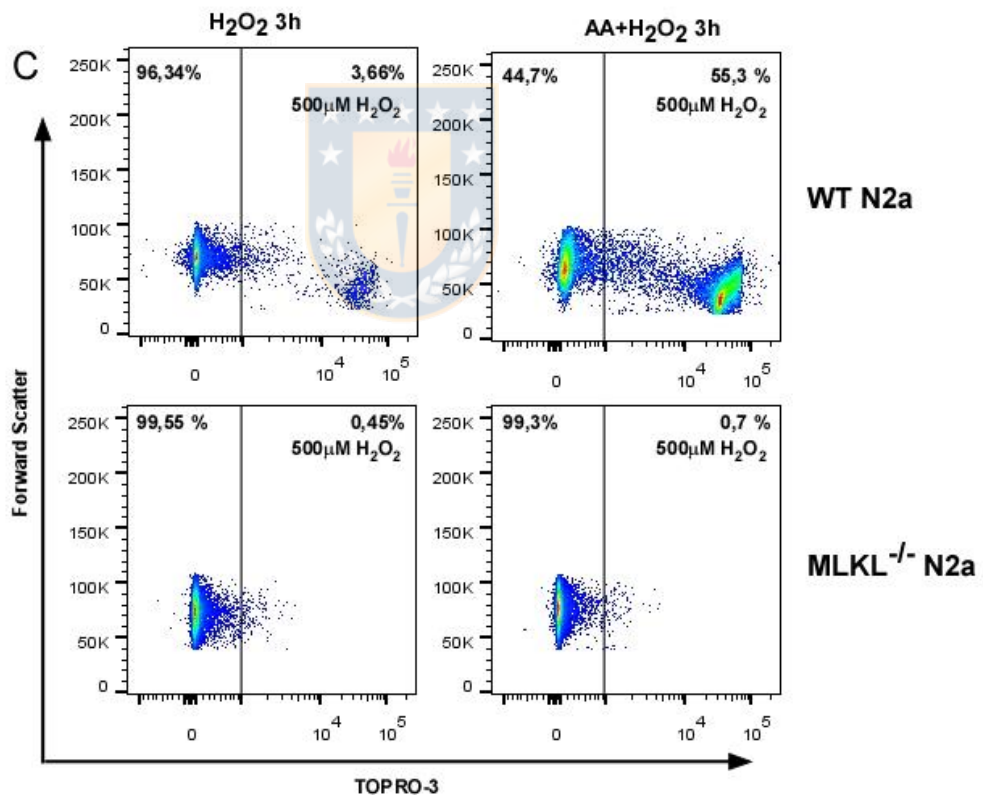
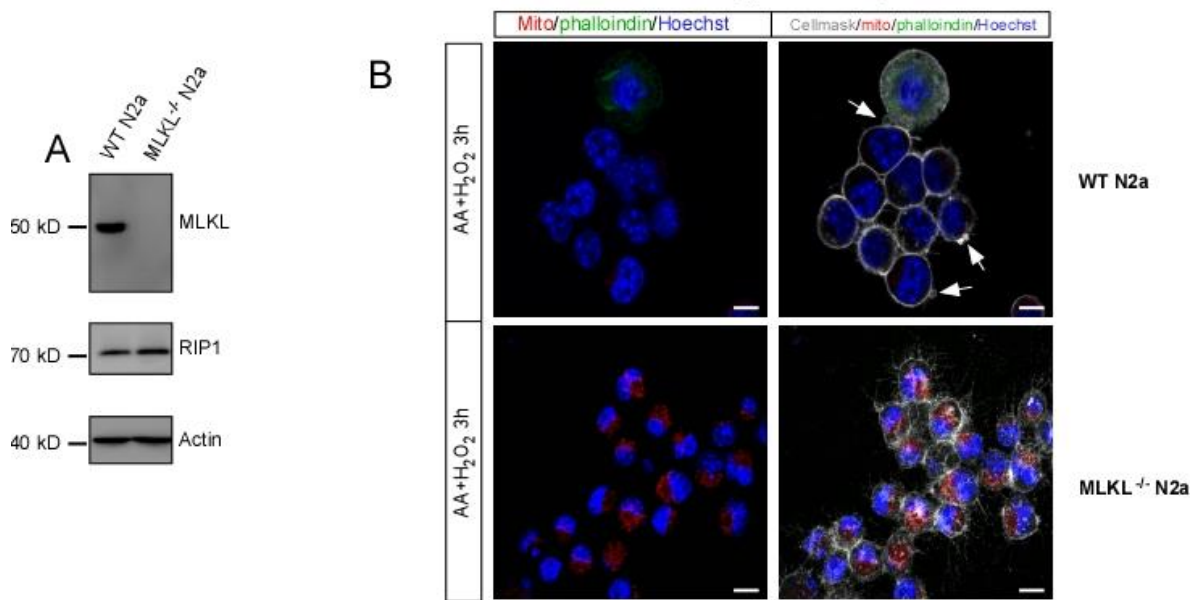


Figura 30. La delección de MLKL previene la necroptosis inducida por la producción intracelular de DHA.

A. Validación de la delección de MLKL en células N2a por western blot. **B.** La delección de MLKL previene los cambios morfológicos necroptóticos. **C.** La delección de MLKL previene la muerte neuronal inducida por DHA. Barra de tamaño 10 μ m. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001-**p<0.01-*p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

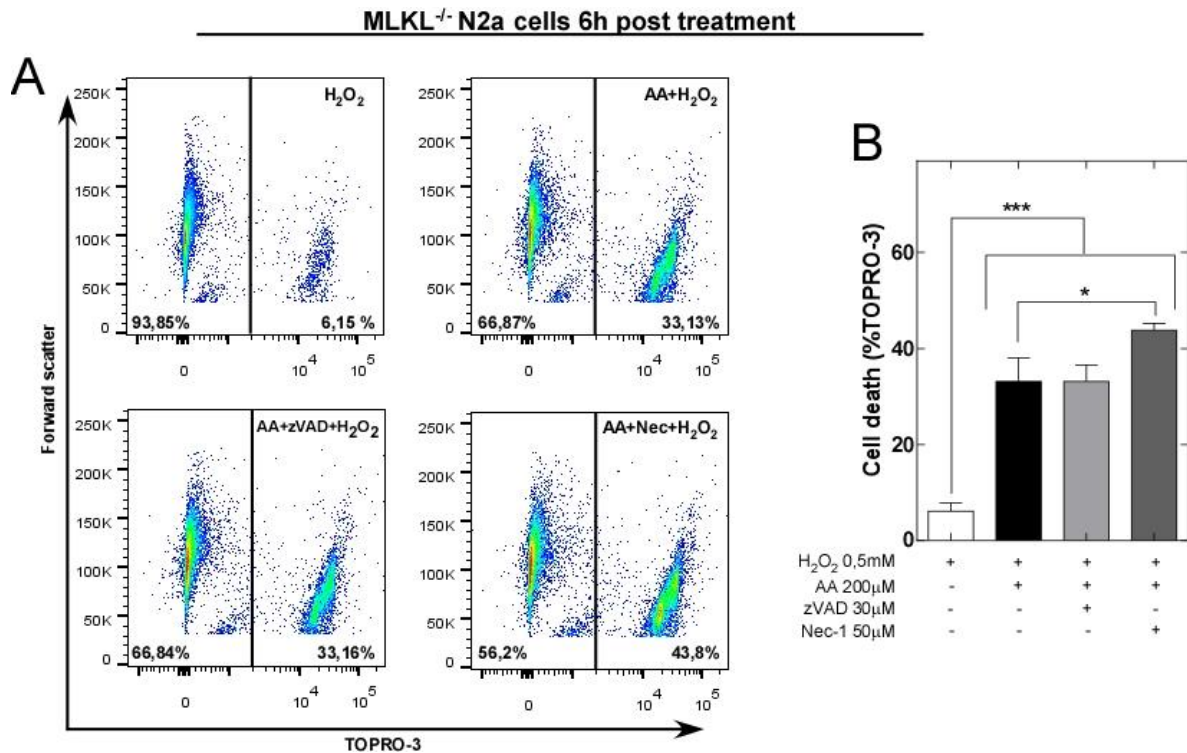


Figura 31. La delección de MLKL solo retrasa la muerte neuronal inducida por DHA.

A. Determinación de la muerte neuronal por citometría de flujo en células KO para MLKL 6 horas post tratamiento. **B.** Cuantificación de la muerte neuronal en células KO para MLKL. Los datos representan el promedio \pm SD (n=3). ***p<0.001- **p<0.01- *p<0.05; n.s.: no significativo. Análisis estadístico de *t-student*.

Capítulo 3

3.1. Infarto cerebral *in vivo*.

Como último objetivo de esta tesis propusimos estudiar el infarto cerebral en modelo *in vivo*. Dentro de las aproximaciones experimentales para la inducción de infarto, escogimos la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), debido a que este modelo representa relativamente bien lo que podría ocurrir en un cerebro humano durante IR. Debido a la gran complejidad de la cirugía, este objetivo tuvo como principal actividad estandarizar las condiciones ideales para la realización óptima del procedimiento, para evitar el sacrificio innecesario de animales en experimentos futuros. Como se muestra en la Figura 32, montamos un sistema de cirugía que incorpora una zona limpia desechable, una cama de control de temperatura, respiración y frecuencia cardíaca (Figura 32A) que monitorea estos parámetros en tiempo real (Figura 32D). Al mismo tiempo, la anestesia fue administrada de manera inhalatoria con un sistema de infusión de isoflurano impulsado por oxígeno (Figura 32B). Los animales de estudio estuvieron bajo todas las normas de bioética y se aplicaron los procedimientos de asepsia y analgesia correspondientes (Figura 32C), para un post operatorio indoloro. A pesar de la dificultad técnica de la cirugía, logramos realizar IR mediante el modelo de MCAO (Figura 33A, 33B). En las fotografías, el color rojo representa tejido vivo, mientras que las zonas blancas corresponden a las zonas de muerte debido al infarto (Figura 33A, 33B). Como se aprecia en la Figura 33B, el procedimiento de IR indujo principalmente infarto en la zona cortical. Lo que se correlaciona con los defectos motrices observados en pacientes post IR. De manera interesante, cuando

analizamos los niveles de mRNA por PCR convencional en cerebros post infartados luego de 3 horas, encontramos que existe un incremento en la expresión de genes relacionados a necroptosis como RIPK1 y MLKL o sus adaptadores como FADD (Figura 33C). Los niveles de estos genes en condiciones control, se aprecian notablemente disminuidos (Figura 33C). Por otra parte, respecto a la apoptosis extrínseca, no detectamos expresión de caspasa 8 por PCR. Mientras que los genes de apoptosis intrínseca se ven afectados de manera opuesta; por una parte, tenemos que los niveles de BAX se mantienen relativamente constantes en condiciones normales o en IR. Por otra parte, nuestros datos muestran que los niveles de Bcl-2 son bajos en condiciones normales, incrementando en respuesta a IR. Estos datos sugieren que, de manera similar a lo observado en nuestro modelo *in vitro*, en el modelo *in vivo* se favorecería la necroptosis por sobre la apoptosis. Más aún, *in vivo* se reproduce el efecto observado *in vitro*, donde existe una disminución de la expresión de los transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1. Aun cuando es necesario realizar cuantificaciones de los niveles de AA o su oxidación, y determinar las características de desintegración durante el infarto, estos datos preliminares sugieren que podría existir una correlación entre el modelo propuesto *in vitro*, sin descartar que DHA pudiese ser la molécula desencadenante de la necroptosis neuronal.

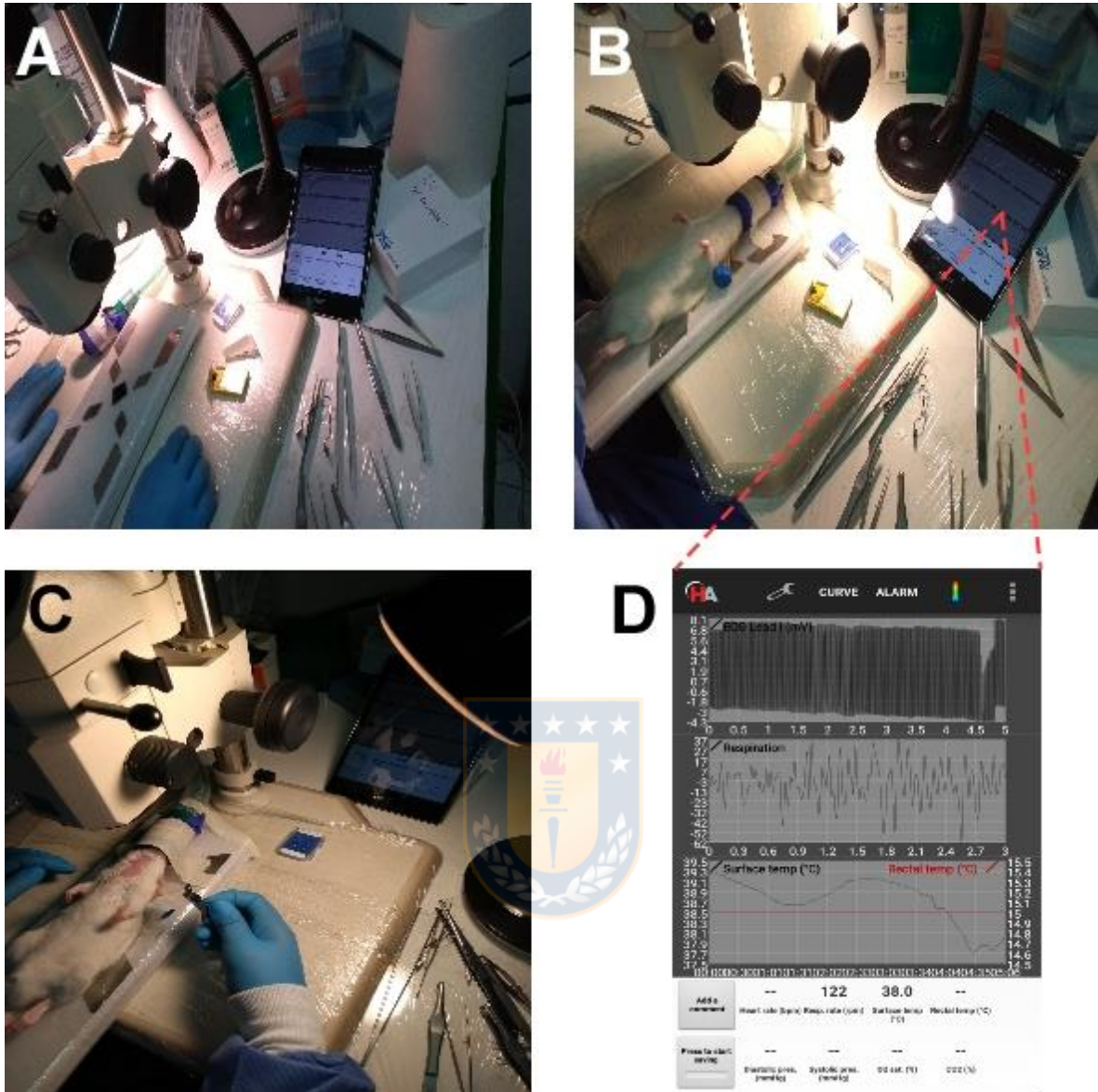


Figura 32. Estandarización del modelo de IR in vivo.

A, B. Sistema de monitoreo en tiempo real de los signos vitales (harvard apparatus small animal physiological monitoring system). **C.** Condiciones de asepsia utilizadas durante el procedimiento. **D.** Imagen representativa del menú del sistema de monitoreo de signos vitales en tiempo real.

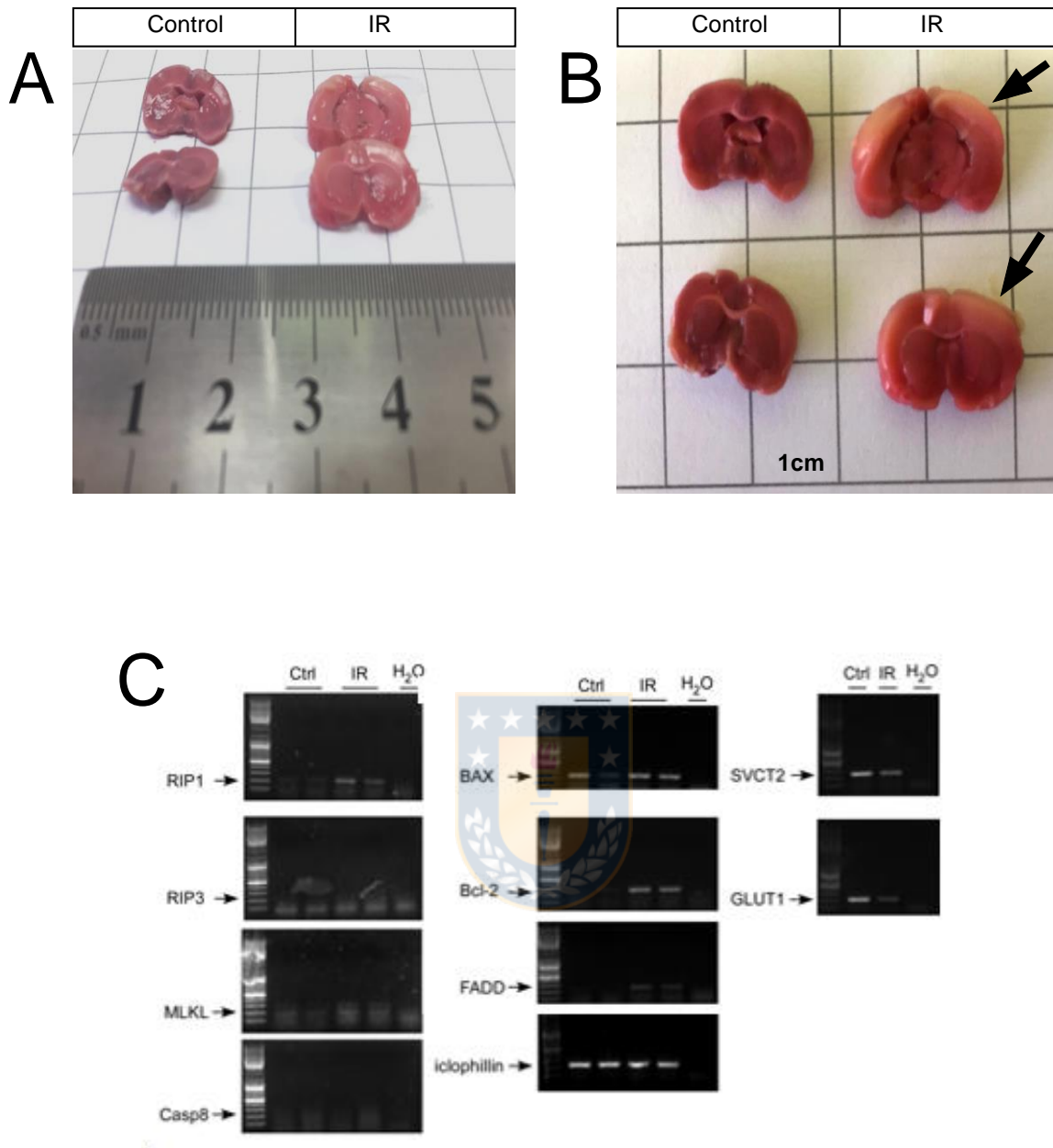


Figura 33. Inducción de IR in vivo mediante modelo de MCAO.

A,B. Fotografía representativa del tamaño del infarto 24 horas post IR mediante tinción de TTC al 2%. **C.** Análisis de PCR convencional de genes asociados a procesos de muerte y transportadores de vitamina C, 3 horas por IR. Las flechas indican la zona infartada.

VII. Discusión.

En adultos, diariamente mueren entre 10 y 100 billones de células, las que son reemplazadas por células sanas para mantener la homeostasis del organismo (Renehan et al., 2001). Desde 1972, cuando se acuñó el término apoptosis, para diferenciar la muerte programada de la necrosis (Kerr et al., 1972) y durante las décadas posteriores, la única explicación para comprender como ocurría la muerte celular fue la apoptosis. Desde ese entonces, los esfuerzos de los biólogos celulares estuvieron concentrados en comprender la apoptosis y sus implicancias en potenciales tratamientos contra el cáncer, infartos, ALS, Alzheimer, Parkinson y enfermedades autoinmunes entre otros (Renehan et al., 2001). Así, comprender la apoptosis fue considerado como tener el control sobre la vida y la muerte celular. Sin embargo, la mayoría de los análisis preclínicos y clínicos estaban basados en la marca para Anexina V⁺ y PI^{+/-} (*apoptosis rate*) (Saas et al., 2016). Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, actualmente la marca de Anexina V⁺ por sí sola, no es un marcador de apoptosis (Yoon et al., 2017, Gong et al., 2017). Por contrario, actualmente, los tipos de muerte no-apoptóticos cada vez están tomando mayor relevancia (Galluzzi et al., 2018). Esto se debe a que los datos sugieren fuertemente, que la mayoría de las patologías del sistema nervioso central (al igual que tejidos periféricos) involucran procesos de muerte con características de desintegración necrótica, como por ejemplo el infarto cerebral, Alzheimer, Parkinson y ALS (Re et al., 2014, Degterev et al., 2005, Caccamo et al., 2017) entre otras, dejando a la apoptosis como un tipo de muerte fisiológica.

Debido a que por largo tiempo se ha descrito que vitamina C induce muerte celular por necrosis en diversos modelos experimentales (Song et al., 2002, Song et al., 2001, Song et al., 1999, Evans et al., 2014, Lv et al., 2018, Tian et al., 2014), y dado a los antecedentes antes expuestos, en esta tesis evaluamos si la oxidación intracelular de AA hasta DHA podría estar regulando la necroptosis neuronal bajo condiciones experimentales de isquemia y reperfusión. Nuestros datos muestran que la suplementación con AA en concentraciones fisiológicas, no altera la sobrevivencia ni la proliferación celular (Figura 6). Sugiriendo de esta forma, que el efecto extracelular inductor de muerte reportado por otros grupos de investigación no se reproduce en condiciones fisiológicas, y que el fenómeno necrótico descontrolado solo responde a mega dosis de vitamina C y medios de cultivo particulares (Chen et al., 2005, Chen et al., 2008, Levine et al., 2009, Schoenfeld et al., 2017). De este modo, nuestros resultados sugieren fuertemente que el AA en condiciones fisiológicas no tiene efectos citotóxicos. Por otra parte, mediante análisis de microscopía en célula viva de tiempo real, mostramos que tanto el modelo inmortalizado como el cultivo primario tienen la maquinaria protéica necesaria para realizar necroptosis inducida farmacológicamente (Figura 5). Debido a que los modelos de IR *in vitro* actuales (OGD, entre otros) inducen apoptosis (Qu et al., 2016) y no consideran que las condiciones experimentales son de tipo escorbútico, debido a que los medios de cultivo (excepto MEM alpha) no contienen AA (Michels and Frei, 2013), recuperamos a las células de escorbuto agregando AA al medio. Sorprendentemente, cuando las células son crecidas en condiciones fisiológicas de AA que simulan lo que ocurre *in vivo*, y ocurre un estrés agudo de tipo isquémico, se induce muerte celular que no es prevenida por la inhibición de las

caspasas (Figura 20). En primera instancia, estos resultados no tendrían novedad alguna, porque solo serían la clásica y ampliamente descrita necrosis convencional inducida por AA (Chen et al., 2005, Chen et al., 2008), debido a que la muerte no es inhibida por bloqueo de la apoptosis. Sin embargo, la necrosis se caracteriza por ser un proceso totalmente accidental, irreversible e imposible de inhibir (Galluzzi et al., 2018). De manera interesante, cuando realizamos experimentos de co-cultivo neurona-astrocitos, encontramos 2 observaciones principales: primero, que la muerte inducida por AA en condiciones de estrés oxidativo puede ser parcialmente prevenida (Figura 9, Figura 34A). De este modo, bajo nuestras condiciones experimentales, la oxidación de AA no estaría induciendo necrosis convencional. En segundo lugar, nos sugiere que el inductor de muerte sería la forma oxidada de la vitamina C, el DHA. Por otra parte, el uso de citocalasina B como inhibidor de la captación de DHA, previene el efecto protector de los astrocitos, sugiriendo que lo importante para la prevención de la muerte es el reciclaje de vitamina C, y no la secreción de citoquinas por parte de los astrocitos (Figura 34A). Mas aún, en nuestras condiciones experimentales de IR *in vitro* se observa que se induce oxidación de AA intracelular, de igual forma a lo que ocurre durante IR *in vivo* (Pedersen et al., 1998). Dada la necesidad de corroborar que DHA es la molécula inductora de muerte, y debido a que no existen inhibidores específicos del transporte de AA (Caprile et al., 2009), generamos la primera línea celular descrita hasta la fecha KO para SVCT2 mediante la tecnología de CRISPR/Cas9. La delección de SVCT2, nos permitió determinar que, si las células no incorporaran AA desde el medio, la muerte celular no ocurre. Descartando completamente la hipótesis clásica del efecto inductor de muerte extracelular inducido por AA. Mas aún, cuando las

células son tratadas con un pulso de DHA al mismo tiempo que son estresadas, la sobrevivencia celular disminuye. Estos resultados nos llevan a proponer un mecanismo de muerte regulado por vitamina C completamente diferente al actual, donde en condiciones de estrés oxidativo la producción intracelular de DHA induciría muerte neuronal. De manera interesante, de la delección y sobre expresión de SVCT2 se desprendió la observación que mientras las células N2a^{Svct2^{-/-}} son altamente sensibles al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en ausencia de AA, las células N2a-hSVCT2wt-EYFP son altamente resistentes al estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Sugiriendo por primera vez, que SVCT2 tendría funciones más allá que solo transportar AA, y que estas funciones podrían estar estrechamente vinculadas a la resistencia al estrés oxidativo en condiciones fisio(*pato*)lógicas.

Una vez establecido nuestro modelo de estudio, analizamos las características morfológicas que ocurren durante el proceso de muerte celular. Esto se debe a que históricamente, la muerte celular se ha clasificado por las características de desintegración (Galluzzi et al., 2018). Tomando ventaja del múltiple marcaje que ofrece la tecnología de microscopía confocal espectral, analizamos la distribución de los transportadores de vitamina C SVCT2 y GLUT1 al mismo tiempo que realizamos reconstrucciones 3D. Nuestros datos mostraron que la producción intracelular DHA induce drásticos cambios morfológicos, previos a la muerte celular (Figura 11, 14,). Sin embargo, estos cambios morfológicos, no comparten características comunes con la apoptosis, debido a que no hay fragmentación nuclear, no existe formación de *blebs* y no hay disminución del tamaño celular (Green and Reed, 1998, McArthur and Kile, 2018). Por el contrario,

las células adquieren morfología redondeada *balloon-like* (Vanden Berghe et al., 2010), mantienen la integridad del núcleo y se observaron estructuras tipo burbuja en la membrana (Gong et al., 2017). Estas características morfológicas, son muy similares a las descritas para la necroptosis (Vanden Berghe et al., 2010). De manera interesante, encontramos que en las condiciones de muerte inducida por DHA, ocurre una redistribución de GLUT1 hacia un compartimiento perinuclear (Figura 34A), distinto a la lámina nuclear, porque como se muestra en nuestros datos existe degradación de la lámina nuclear durante la necroptosis (Figura 12). Sin embargo, la doble membrana de GLUT1 podría ser atribuido a que se encuentre secuestrado entre el retículo endoplásmico y el núcleo por proteínas NVJ (nuclear vacuolar junction) (Henne et al., 2015), dado que también observados cambios en la distribución de la tubulina. Esta redistribución de los transportadores de vitamina C y el rearrreglo del citoesqueleto, eventualmente podrían ser características para detectar la activación de necroptosis *in vivo*. Desafortunadamente, nuestros análisis muestran que este fenómeno solo ocurrió en el modelo neuronal N2a, por lo que son necesarios más análisis para poder determinar si el patrón descrito corresponde a un tipo celular particular, o si pudiese ser reproducido en otros modelos cerebrales o periféricos.

Respecto a los mecanismos que regulan la muerte neuronal, encontramos que la apoptosis es crucial para el desarrollo normal del SNC, mientras que las neuronas adultas son resistentes a este tipo de muerte (Heckmann et al., 2019, Yuan et al., 2019, Sarosiek et al., 2017, Kole et al., 2013). Por otra parte, se ha determinado que en múltiples condiciones experimentales la detección de caspasa

3 clivada en el neuronas *in vivo* y/o *in vitro*, no está asociada a un proceso de muerte, sino más bien se debe a funciones fisiológicas no apoptóticas de las caspasas (Oomman et al., 2005, Rohn et al., 2004, Fernando et al., 2005, Mukherjee and Williams, 2017, McArthur and Kile, 2018). Mas aún en condiciones fisiopatológicas, la evidencia muestra que la apoptosis tampoco sería la principal causa de la muerte neuronal. Esto se debe a que las observaciones están principalmente basadas en análisis de TUNEL. Por ejemplo, en Parkinson se ha observado marca positiva para TUNEL (Jellinger, 2001). Sin embargo, la expresión de caspasas en pacientes con dicha enfermedad es marginal respecto a la tasa de muerte neuronal (Wullner et al., 1999, Kingsbury et al., 1998). Mientras que, en Alzheimer se ha encontrado que tanto la apoptosis como la necroptosis podrían estar favoreciendo la muerte neuronal (Heckmann et al., 2019, Yuan et al., 2019). Sin embargo, un reciente estudio de GWAS mostró que en pacientes con Alzheimer existen 2 variantes de riesgo asociadas a mutaciones en la caspasa 8, las que tienen una reducida capacidad para activar a caspasa 3 (Rehker et al., 2017). Estos resultados se correlacionan con las observaciones en pacientes con Alzheimer, donde se ha encontrado que los cerebros más livianos son los que poseen altos niveles de expresión de RIPK1 y MLKL (Caccamo et al., 2017), sugiriendo un incremento en la muerte neuronal por necroptosis. En línea con esta noción, en la patología donde más se ha descrito la participación de la necroptosis es el infarto cerebral (Degterev et al., 2005, Chen et al., 2018, Zhang et al., 2016, King et al., 2014). Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cuál es la molécula iniciadora de la cascada necroptótica durante IR, debido a que la inhibición de la producción de ROS, de super oxido, de H₂O₂ o la administración de vitamina E no previene la

necroptosis (Degterev et al., 2005). Nuestros datos sugieren que DHA podría ser un candidato como señal iniciadora de necroptosis (Figura 34B). Esto se debe a que la muerte inducida por la producción intracelular de DHA durante IR *in vitro*, no depende de ROS ni caspasas, pero si depende de la maquinaria necroptótica. Por una parte, tenemos que la suplementación con AA desfavorece la expresión de genes pro-apoptóticos, mientras que induce la sobre expresión de genes anti-apoptóticos y proteínas pro-necroptóticas (Figura 21). De esta forma, en un contexto fisiológico neuronal se da el escenario ideal para que, frente a un estrés oxidativo agudo, el AA se oxide hasta DHA. La acumulación de DHA puede inhibir a p38 (Carcamo et al., 2004), lo que induciría inactivación de MK2, y por lo tanto activación de RIPK1 en el citoplasma (Jaco et al., 2017). La activación citoplasmática de RIPK1 permitiría su reclutamiento por los adaptadores de muerte, y posterior activación por autofosforilación debido a que en presencia de DHA, IKK α/β no podría mantener a RIPK1 inhibida en el complejo I (Dondelinger et al., 2015, Carcamo et al., 2004). En este contexto, DHA podría activar a RIPK1 y desencadenar muerte neuronal por necroptosis.

Nuestra evidencia muestra, la producción intracelular de DHA induce una rápida fosforilación de RIPK1 (Figura 24). Al mismo tiempo, cuando inhibimos la fosforilación de RIPK1 con Nec-1 la muerte celular es prevenida. Sin embargo, si dejamos que proceda el fenómeno de muerte celular encontramos que existe una rápida fosforilación de MLKL, la que viene acompañado de su traslocación al núcleo (Figura 25), lo que favorecería la formación del necrosoma en el citosol (Weber et al., 2018, Yoon et al., 2016). Posterior a la traslocación de P-MLKL al núcleo en

respuesta a la oxidación intracelular de DHA, determinamos que P-MLKL se encuentra distribuida en la membrana plasmática, una clara señal de la activación y posterior ejecución de la necroptosis. Sin embargo, la única forma de determinar si las células realmente mueren es por la integridad de la membrana plasmática (Kroemer et al., 2009, Galluzzi et al., 2015, Galluzzi et al., 2018). A pesar de que existen varias técnicas para analizar la integridad de la membrana plasmática, la mejor aproximación experimental es la microscopía de célula viva en tiempo real (Wallberg et al., 2016). Debido a que permite correlacionar los cambios morfológicos, estado metabólico e integridad de la membrana plasmática de manera simultánea. En este escenario, implementamos el primer sistema de 5 marcas simultaneas para microscopía de célula viva en tiempo real, descrito hasta la fecha. Tomando ventaja de la espectralidad del microscopio LSM 780 de Zeiss, utilizamos de manera paralela sondas para teñir la membrana plasmática, mitocondrias, núcleo, la integridad de la membrana plasmática y además agregamos el canal de contraste de fase. Esta aproximación experimental, nos permitió determinar de manera precisa el momento en el que ocurre la muerte celular (si es que ocurre), la que no necesariamente se correlaciona con los resultados obtenidos por XTT. Mientras que por XTT, encontramos que existe aproximadamente un 50% de muerte neuronal en todos los modelos utilizados a las 3h post tratamiento, por microscopía de célula viva encontramos que ese porcentaje solo se refleja en las células N2a, debido a que las células HN33.11 o neuronas corticales tienen un proceso de muerte más retardado. De esta forma, nuestros datos sugieren fuertemente que se debe poner especial cuidado en la interpretación de los resultados de viabilidad obtenidos por métodos que dependan de la actividad mitocondrial o metabólica.

Dado que estos no indican, necesariamente, pérdida de células, muerte o viabilidad por lo que es necesario acompañar estos resultados de análisis complementarios como citometría de flujo (Jouan-Lanhouet et al., 2014). Al mismo tiempo, de los análisis de microscopía en célula viva pudimos comprobar que las características de desintegración celular corresponden a necroptosis debido a que observamos la principal *hallmark* que es la formación de burbujas en la membrana plasmática (Gong et al., 2017). Mas aún, gracias a tinción de Faloidina determinamos que las burbujas liberadas al medio corresponden a membrana plasmática dañada, debido a que son permeables a Faloidina y positivas a cellmask. De manera interesante, en todos los modelos neuronales que analizamos observamos que previamente a la muerte celular ocurre disminución de la actividad mitocondrial y fragmentación mitocondrial (Figura 26-27). Sin embargo, cuando inhibimos la fisión mitocondrial dependiente de Drp-1, no encontramos ningún efecto protector sobre la viabilidad celular (Figura 28-29). Lo que corrobora una vez más que la vía canónica de necroptosis está involucrada en el proceso de muerte, debido a que la mitocondria no participaría del desencadenamiento de necroptosis (Moujalled et al., 2014). Al mismo tiempo, nuestros datos de microscopía de super resolución muestran que SVCT2 no estaría presente en las mitocondrias neuronales, sugiriendo de esta forma, que los reportes previos de SVCT2 en las mitocondrias, solo estaría restringido a tejidos periféricos bajo condiciones experimentales específicas (Munoz-Montesino et al., 2014).

Aun cuando toda la evidencia muestra que la vía de muerte es la necroptosis, era necesario inhibir el ejecutor de la vía: MLKL. De manera desafortunada, hasta

la fecha no existen inhibidores farmacológicos para MLKL (Galluzzi et al., 2017). Así, para inhibir la necroptosis mediante edición genética con CRISPR/Cas9 deletamos MLKL de células de ratón. Cuando analizamos las células N2a^{MLKL^{-/-}} mediante microscopía de célula viva, encontramos que la delección de MLKL inhibe la alteración morfológica, la formación de burbujas y mantiene la actividad mitocondrial (Figura 30). Mas aún, cuando analizamos la muerte celular inducida por la producción intracelular de DHA por citometría de flujo, encontramos que esta es completamente prevenida por la delección de MLKL. Este resultado es clave, debido a que muestra que MLKL es el ejecutor de la muerte celular, y que por lo tanto la producción de DHA induce muerte por necroptosis. Sin embargo, de manera desafortunada, cuando analizamos la muerte celular a largos períodos de tiempo (6h post tratamiento), determinamos que la muerte celular inducida por la producción intracelular de DHA, ocurre de igual forma (Figura 31). Este resultado sugiere, que la delección de MLKL solo retrasa la muerte celular, pero que posiblemente existen otros mecanismos de muerte asociados a la acumulación de DHA (Remijnsen et al., 2014). Este tipo de muerte aun seguiría siendo independiente de caspasas, pero parece depender de RIPK1. Este resultado propone por primera vez, que DHA podría estar regulando algún otro tipo de muerte no apoptótica, sin descartar que eventualmente DHA pueda controlar su *propio* tipo de muerte celular de manera directa. Lamentablemente, hasta la fecha los estudios relativos a DHA son escasos, debido a las hipótesis populares que apuntan que DHA es altamente inestable e incapaz de realizar alguna acción fisiológica. Sin embargo, gracias al uso de ¹³C-NMR se ha logrado determinar que la vida media de DHA en PBS es alrededor de 50 min (Himmelreich et al., 1998). Más aún, al tratar eritrocitos

humanos con DHA 6mM, células que incorporan vitamina C a la forma de DHA para luego reducirlo hasta AA, y determinar las especies químicas presentes a los 20 min post tratamiento por ^{13}C -NMR, se comprobó que en solución y presencia de eritrocitos, aún existe un 46% de DHA, 32 % de AA y solo un 17% de DKG (Himmelreich et al., 1998). Determinado de esta forma que DHA, tanto en solución como en presencia de células, es lo suficientemente estable como para llevar a cabo funciones fisiológicas. La literatura más actual apoya la hipótesis que DHA y no AA, sería la molécula que regula la viabilidad y el metabolismo de células tumorales periféricas. Debido a que, cuando células de cáncer de colon con mutaciones en KRAS y BRAF son tratadas con DHA se induce muerte celular, la que es prevenida por la suplementación con GSH (Yun et al., 2015). No obstante, este modelo de muerte también podría ser aplicado en células nerviosas (Ferrada et al., 2017).



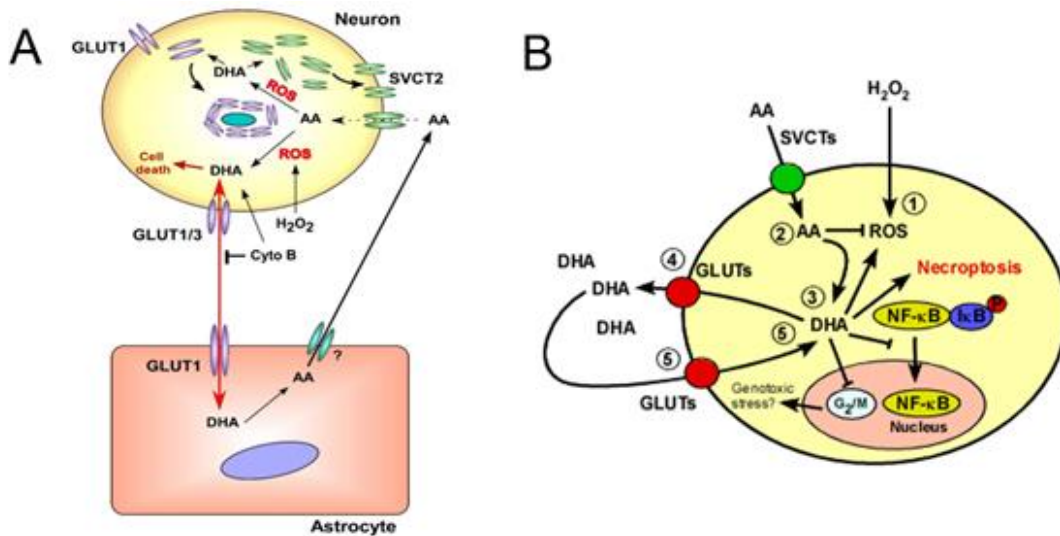


Figura 34. Principales efectos de la acumulación de DHA en la neurona.

A. Principales efectos de la acumulación de DHA en la neurona, en presencia o ausencia de células recicladoras. **B.** Modelo propuesto de la inducción de necroptosis por DHA. (1) H_2O_2 favorece la producción de ROS, los que son neutralizados por AA (2) formando DHA (3). El DHA a su vez, puede salir de celular por GLUTs (4). Sin embargo, este puede ser reincorporado en ausencia de células recicladoras (5). Este fenómeno de auto reciclaje de DHA, favorecería la acumulación de DHA intracelular desencadenando necroptosis.

VIII. Anexo

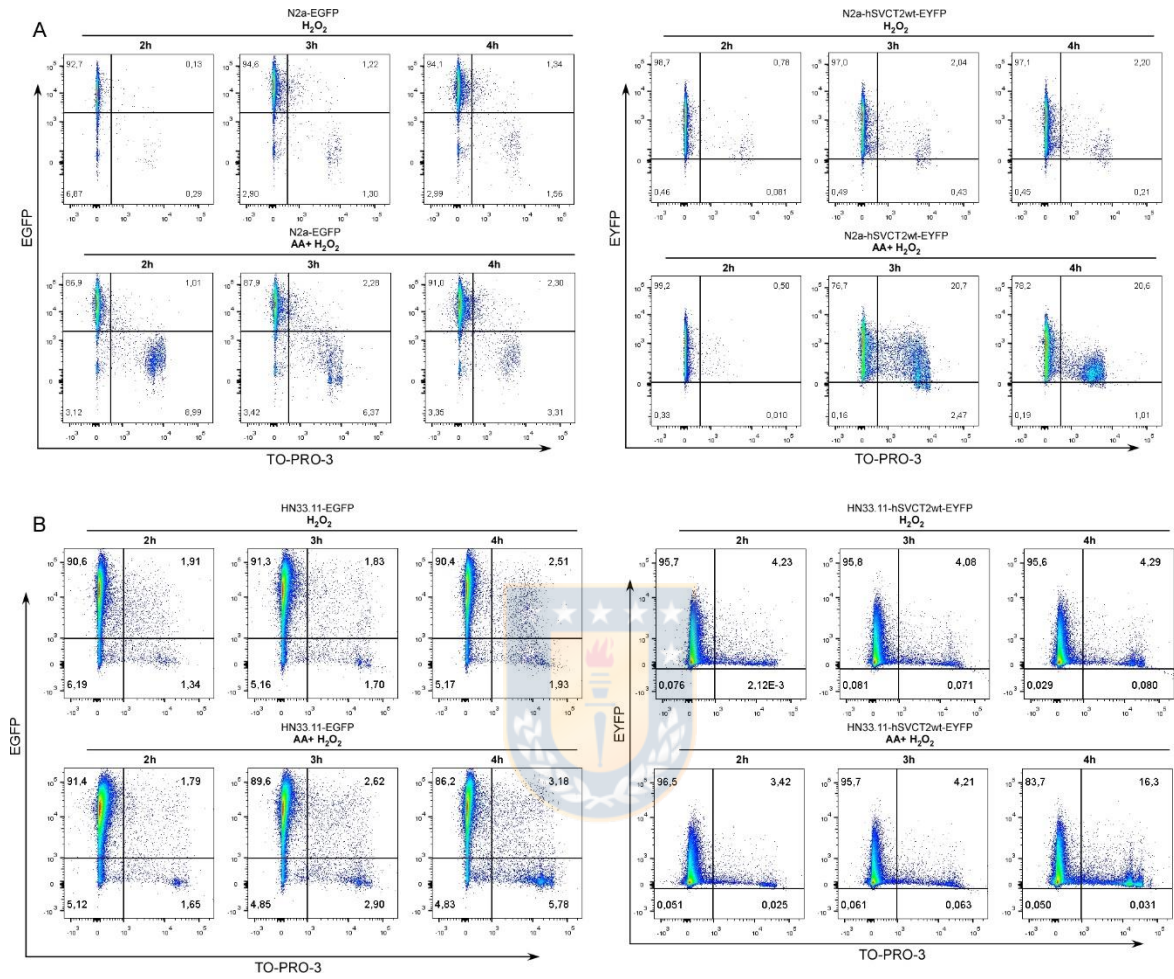


Figura 1. Gates utilizados para determinar la muerte celular en células que sobre expresan EGFP y SVCT2. A. Células N2a B. Células HN.33.11.

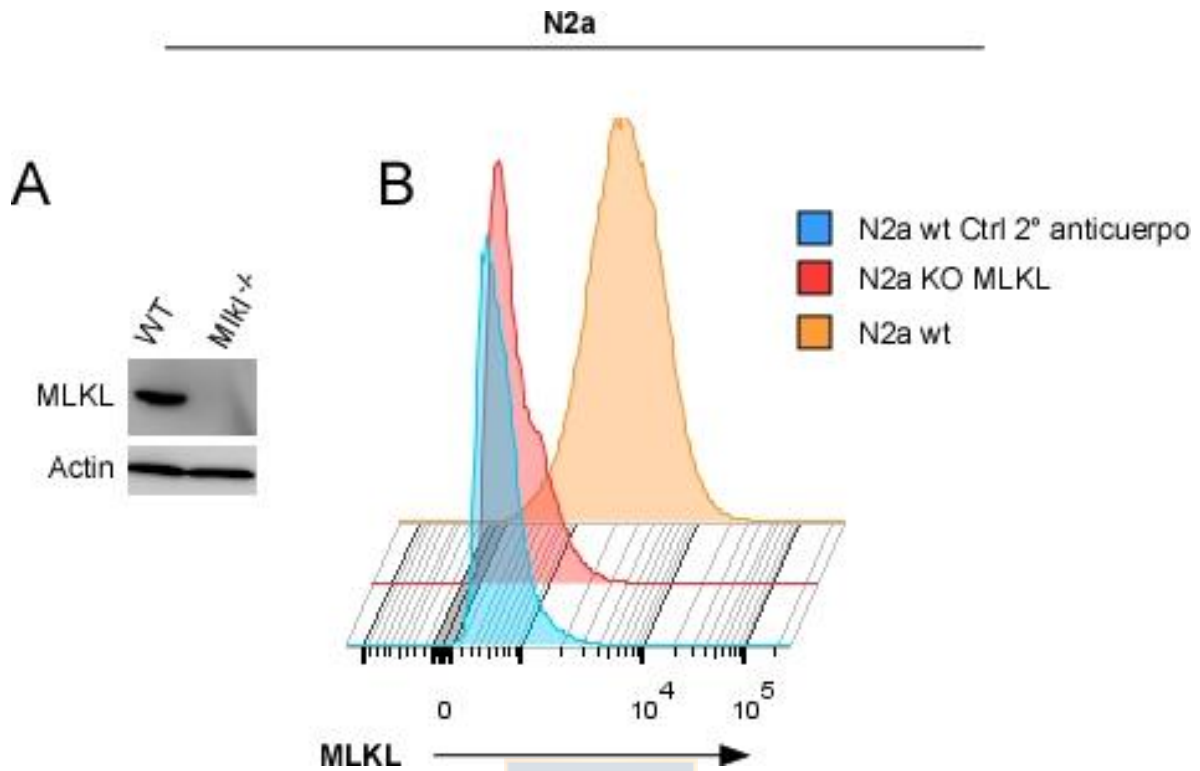


Figura 2. Validación anticuerpo contra MLKL para uso citometría de flujo.

A. Validación del anticuerpo contra MLKL por western blot, mediante la delección de MLKL por CRISPR/Cas9. **B.** Validación del anticuerpo contra MLKL para citometría de flujo, mediante el uso de células N2a^{Mkl1^{-/-}}.

Información estadística detallada de las figuras clave.

Análisis estadístico relacionado a las Figuras 11 y 14.

A. Protocol scheme of treatment with vitamin C and oxidative stress induction. **B,I.** Intracellular measurement of AA. The control condition represents the intracellular concentration of AA prior to treatment with H₂O₂. The time in minutes is post-treatment with H₂O₂. **N2a:** Ctrl (Mean \pm SEM=213.3 \pm 9.02) vs. time (min); 0: P=0.0001; t=15.24; df=4; mean \pm SEM=122.84 \pm 8.642; 30: P=0.0593; t=2.612; df=4; mean \pm SEM=147.4 \pm 23.54; 60: P 0.4450; t=0.8464; df=4; mean \pm SEM=197.2 \pm 16.67; 120: P=0.0009; t=8.812; df=4; mean \pm SEM =96.91 \pm 9.642 180: P=0.0007; t=9.297; df=4; mean \pm SEM=108.5 \pm 6.746. **HN33.11:** Ctrl (Mean \pm SEM=20.53 \pm 0.5637) vs. time (min) 0: P=0.0024; t=15.84; df=4; mean \pm SEM=15.79 \pm 0.4005; 30: P<0.0001; t=15.84 df=4; mean \pm SEM=8.769 \pm 0.4840; 60: P<0.0001; t=36.43; df=4; mean \pm SEM=0; 120: P=0.0097; t=4.645; df=4; mean \pm SEM=6.107 \pm 3.054; 180: P<0.0001; t=36.43 df=4 mean \pm SEM=0. n=3 biologically independent samples. **C,J.** Cell viability at 3 h post-treatment (N2a: H₂O₂ vs. AA+H₂O₂: P=0.0009; t=8.818; df=4; Mean_{H₂O₂} \pm SEM=95.27 \pm 3.121; Mean_{AA+H₂O₂} \pm SEM= 57.67 \pm 2.906. n=3 biologically independent samples). **D,K.** GLUT1 and SVCT2 distribution at 3 h post-treatment. **E.** 2D and 3D super-resolution SIM of N2a cells 3 h post-treatment. **F,L.** Imaris 3D reconstruction at 3 h post-treatment. **G,N.** Morphological analysis in N2a and HN33.11 cells (**N2a** sphericity : H₂O₂ (mean \pm SEM 0.3273 \pm 0.005588) vs. AA+H₂O₂ (mean \pm SEM= 0.4990 \pm 0.01170); P<0.0001; t=13.25 df=6. Oblate: H₂O₂ (mean \pm SEM 0.7705 \pm 0.01293) vs. AA+H₂O₂ (mean \pm SEM= 0.5108 \pm 0.02418); P<0.0001; t=9.472; df=6. Prolate: H₂O₂ (mean \pm SEM 0.1338 \pm

0.003924) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 0.2958 ± 0.03540) P=0.0039; t=4.548 df=6. n=4 biologically independent samples. **HN33.11** sphericity: H₂O₂ (mean ± SEM 0.4150 ± 0.006292) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 0.5217 ± 0.04635); P=0.0846; t=2.282; df=4. Oblate: H₂O₂ (mean ± SEM 0.5414 ± 0.03743) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 0.3133 ± 0.01856); P= 0.0055; t=5.459; df=4. Prolate: H₂O₂ (mean ± SEM 0.1661 ± 0.003879) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM 0.3410 ± 0.05804); P=0.0397 t=3.007 df=4. n=3 biologically independent samples. **H,O.** Cell size analysis with Imaris bounding box tool. (**N2a** Bbox x: H₂O₂ (mean ± SEM 24.21 ± 0.5412) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM=16.00 ± 0.6829); P=0.0007; t=9.420; df=4. Bbox y: H₂O₂ (mean ± SEM 23.55 ± 0.4952) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 18.46 ± 0.9573); P=0.0091; t=4.726; df=4. Bbox; z: H₂O₂ (mean ± SEM 8.226 ± 0.4609) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 11.28 ± 0.1162 N=3); P=0.0030; t=6.414; df=4). n=3 biologically independent samples. **HN33.11** Bbox x: H₂O₂ (mean ± SEM 30.53 ± 1.481) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 18.99 ± 1.303); P=0.0043; t=5.850; df=4. Bbox y: H₂O₂ (mean ± SEM 31.42 ± 2.274) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 20.74 ± 1.481); P=0.0170; t=3.936 df=4. Bbox z: H₂O₂ (mean ± SEM 7.377 ± 0.5974) vs. AA+H₂O₂ (mean ± SEM= 14.12 ± 1.057); P=0.0051; t=5.552 df=4. n=3 biologically independent samples. **M.** 3D morphological alterations of the plasma membrane in HN33.11 cells, the arrows show bubble-like structures. Scale bar 10 μm. Data are shown *t*-student (two-tailed) as mean ± SEM; All data are representative of three separate experiments. *P≤ 0.05, **P≤ 0.01, ***P≤ 0.001.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 20.

A,C. Intracellular ROS production in N2a and HN33.11. **B,D.** Quantification of ROS production with respect to control. N2a: Ctrl (Mean \pm SEM= 1.035 \pm 0.0650) vs. time (h): 0h_{H₂O₂}: P=0.0268; t=5.990 df=2; mean \pm SEM= 1.545 \pm 0.05500. 0h_{AA+H₂O₂}: P=0.0101; t=9.892 df=2; mean \pm SEM= 1.790 \pm 0.04000. 3h_{H₂O₂}: P=0.0070; t=11.88 df=2; mean \pm SEM= 1.725 \pm 0.04500. 3h_{AA+H₂O₂}: P=0.0051; t=13.90 df=2; mean \pm SEM= 1.955 \pm 0.05500. 4h_{H₂O₂}: P=0.0048; t=14.38 df=2; mean \pm SEM= 1.975 \pm 0.02500. 4h_{AA+H₂O₂}: P=0.0035; t=16.77 df=2; mean \pm SEM= 2.785 \pm 0.08500. n= 2 biologically independent samples. **E,F.** Cell viability analysis of ROS inhibition with N-acetyl-Cysteine (NAC, 24 h before treatment) in N2a and HN33.11 cells. **N2a:** H₂O₂ (mean \pm SEM= 106.2 \pm 3.957) vs. treatment: AA+NAC 0.5mM+H₂O₂: P<0.0001; t=16.29 df=4; mean \pm SEM= 19.10 \pm 3.592. AA+NAC 1mM+H₂O₂: P<0.0001; t=23.42 df=4; mean \pm SEM= 6.600 \pm 1.553. **HN33.11:** H₂O₂ (mean \pm SEM= 91.43 \pm 1.212) vs. treatment: AA+NAC 0.5mM+H₂O₂: P<0.0001; t=27.86 df=4; mean \pm SEM= 24.67 \pm 2.067. AA+NAC 1mM+H₂O₂: P<0.0001; t=48.03 df=4; mean \pm SEM= 26.37 \pm 0.6064). n= 3 biologically independent samples. **G,H.** Cell viability analysis of apoptosis inhibition in N2a cells. H₂O₂ (mean \pm SEM= 90.55 \pm 3.525) vs treatment: AA+H₂O₂: P=0.0045; t=5.766 df=4; mean \pm SEM= 59.97 \pm 3.962. AA+H₂O₂+zVAD: P=0.0078; t=4.951 df=4; mean \pm SEM= 63.38 \pm 4.205), and HN33.11 cells H₂O₂ (mean \pm SEM= 94.77 \pm 1.488) vs. treatment: AA+H₂O₂: P<0.0001; t=25.04 df=4; mean \pm SEM= 49.13 \pm 1.053. AA+H₂O₂+zVAD: P<0.0001; t=18.99 df=4; mean \pm SEM= 39.73 \pm 2.488. AA+H₂O₂ vs. AA+H₂O₂+zVAD: P=0.0253; t=3.480 df=4). n= 3 biologically independent samples. Data are shown t-

student (two-tailed) as mean \pm SEM; all data are representative of three separate experiments. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, n.s., not significant.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 21.

A,I. mRNA levels of apoptotic and necroptotic genes (**N2a:** Bax_{AA}: P=0.0081; t=4.894 df=4; mean \pm SEM=0.4313 \pm 0.07881. Bax_{H2O2}: P=0.0084; t=4.842 df=4; mean \pm SEM=0.5522 \pm 0.04602. Bcl-2_{AA}: P=0.0134; t=4.231 df=4; mean \pm SEM=1.701 \pm 0.1765. Bcl-2_{AA+H2O2}: P=0.0397; t=3.007 df=4; mean \pm SEM= 0.2699 \pm 0.03356. Casp8_{AA}: P=0.0178; t=3.882 df=4; mean \pm SEM=0.1862 \pm 0.03860. Casp8_{H2O2}: P=0.0234; t=3.569 df=4; mean \pm SEM= 0.2583 \pm 0.02712. Casp8_{AA+H2O2}: P=0.0177; t=3.890 df=4; mean \pm SEM= 0.1912 \pm 0.02803. RIP1_{AA}: P=0.0321; t=3.227 df=4; mean \pm SEM= 1.894 \pm 0.1433. RIP3_{AA+H2O2}: P=0.0064; t=5.220 df=4; mean \pm SEM= 11.26 \pm 1.962. n=3 biologically independent samples. Data are shown *t*-student (two-tailed) as mean \pm SEM. **HN33.11:** Bcl-2_{AA}: P=0.0331; t=5.358 df=2; mean \pm SEM= 2.700 \pm 0.1776. Bcl-2_{H2O2}: P=0.0171; t=7.551 df=2; mean \pm SEM= 3.129 \pm 0.1084. Casp8_{H2O2}: P= 0.0041; t=15.65 df=2; mean \pm SEM= 0.08362 \pm 0.02710. Casp8_{AA+H2O2}: P=0.0041; t=15.62 df=2; mean \pm SEM= 0.1446 \pm 0.01746. RIP1_{H2O2}: P=0.0113; t=9.348 df=2; mean \pm SEM= 5.885 \pm 0.3056. MLKL_{H2O2}: P=0.0273; t=5.929 df=2; mean \pm SEM= 0.2998 \pm 0.01661. MLKL_{AA+H2O2}: P=0.0194; t=7.071 df=2; mean \pm SEM= 0.1682 \pm 0.01106. n=2 biologically independent samples. **B,J.** Expression of RIPK1 and MLKL in N2a and HN33.11 cells. **C,K.** RIPK1 expression determined by flow cytometry (50,000 counts) **D,L.** Relative quantification of RIPK1 by flow cytometry (N2a_{ctrl}: mean \pm SEM= 1.000 \pm 0.08000; N2a_{AA}: P=0.0163; t=7.730 df=2; mean \pm SEM=1.675 \pm 0.03500; n=2 biologically

independent samples). **E,M.** MLKL levels determined by flow cytometry (50,000 counts). **F,N.** Relative quantification of MLKL by flow cytometry (N2a_{ctrl}: mean \pm SEM= 0.9850 \pm 0.0350; N2a_{AA}: P=0.0187; t=7.209 df=2; mean \pm SEM=1.455 \pm 0.05500. n=2 biologically independent samples). **G,O.** Analysis of the expression and localization of RIPK1, RIPK3 and MLKL. **H.** SIM super-resolution of RIPK1 and MLKL in N2a cells treated with AA. Scale bar 10 μ m Data are shown *t*-student (two-tailed) as mean \pm SEM. Experiment was independently reproduced three times. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, n.s. not significant. Ctrl, untreated cells.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 25.

A,G. Necroptosis inhibition with necrostatin-1. **N2a:** H₂O₂ (mean \pm SEM= 100.1 \pm 6.181) vs, AA+ H₂O₂: P=0.0011; t=8.447 df=4; mean \pm SEM= 36.23 \pm 4.355. AA+H₂O₂ vs. AA+Nec 50 μ M H₂O₂: P=0.0057; t=5.387 df=4; mean \pm SEM= 60.20 \pm 0.9074. AA+Nec 70 μ M H₂O₂: P=0.0377; t=3.060 df=4; mean \pm SEM= 56.47 \pm 4.975. AA+Nec 100 μ M H₂O₂: P=0.0020; t=7.216 df=4; mean \pm SEM= 71.77 \pm 2.298. **HN33.11:** H₂O₂ (mean \pm SEM= 99.53 \pm 0.5044) vs. AA+ H₂O₂: P<0.0001; t=17.36 df=4; mean \pm SEM= 68.40 \pm 1.721. AA+ H₂O₂ vs. AA+Nec 70 μ M H₂O₂: P=0.0302; t=3.292 df=4; mean \pm SEM= 76.27 \pm 1.658. AA+Nec 100 μ M H₂O₂: P=0.0017; t=7.462 df=4; mean \pm SEM= 87.37 \pm 1.870. **B,H.** Microphotographs analyses of MLKL phosphorylation. **C,I.** Co-location map of MLKL/P-MLKL determined with Imaris. **D.** Nuclear translocation of MLKL by phosphorylation. **E,J.** Intensity profile of MLKL/P-MLKL. **F,K.** Quantification of MLKL phosphorylation. **N2a:** H₂O₂ (mean \pm SEM= 1.033 \pm 0.2404 vs. AA+ H₂O₂: P=0.0108; t=4.505 df=4; mean \pm SEM 4.970 \pm 0.8402. **HN33.11:** N2a H₂O₂ (mean \pm SEM= 1.000 \pm 0.06928 vs. AA+H₂O₂:

$P=0.0096$; $t=4.658$ $df=4$; mean \pm SEM 26.84 ± 5.546). $n= 3$ biologically independent samples in all experiments). Scale bar $10 \mu\text{m}$. Data are shown t -student (two-tailed) as mean \pm SEM. Experiment was independently reproduced three times. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, n.s. not significant.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 16.

A, D. SIM super resolution of overexpression of hSVCT2. **B, E.** Quantification of cell death in stable N2a and HN33.11 cells transduced with control EGFP (30,000 count). **N2a-EGFP:** 3 h H_2O_2 (mean \pm SEM= 4.625 ± 0.1750) vs. 3 h AA+ H_2O_2 : $P=0.0222$; $t=6.599$ $df=2$; mean \pm SEM= 11.65 ± 1.050 . 4 h H_2O_2 (mean \pm SEM= 5.155 ± 0.1550) vs. 4 h AA+ H_2O_2 : $P=0.0439$; $t=4.612$ $df=2$; mean \pm SEM= 110.05 ± 1.050 .) $n= 2$ biologically independent samples **C, F.** Quantification of cell death in stable N2a and HN33.11 cells transduced with lenti-hSVCT2wt-EYFP (30,000 count). **N2a-hSVCT2:** 3 h H_2O_2 (mean \pm SEM= 3.980 ± 0.5500) vs. 3 h AA+ H_2O_2 : $P=0.0022$; $t=21.26$ $df=2$; mean \pm SEM= 26.40 ± 0.9000 . 4 h H_2O_2 (mean \pm SEM= 5.350 ± 0.4700) vs. 4 h AA+ H_2O_2 : $P=0.0283$; $t=5.812$ $df=2$; mean \pm SEM= 23.00 ± 3.000 . **HN33.11-hSVCT2:** 4 h H_2O_2 (mean \pm SEM= 5.000 ± 0.7000) vs. 4 h AA+ H_2O_2 : $P=0.0210$; $t=6.791$ $df=2$; mean \pm SEM= 16.55 ± 1.550) $n= 2$ biologically independent samples. Scale bar $10 \mu\text{m}$. Data are shown t -student (two-tailed) as mean \pm SEM. Experiment was independently reproduced three times. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, n.s. not significant.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 19 y 30.

A,B. CRISPR/cas9 validation for MLKL and SVCT2. **C-D.** Cell viability at 3 h post-treatment in SVCT2^{-/-} N2a cells. Ctrl (mean ± SEM= 101.0 ± 1.155) vs. 500µM H₂O₂: P<0.0001; t=49.78 df=4; mean ± SEM= 28.67 ± 0.8819. AA+500µM H₂O₂: P<0.0001; t=45.20 df=4; mean ± SEM= 25.67 ± 1.202). Ctrl (mean ± SEM= 100.0 ± 4.583) vs. 300µM H₂O₂: P=0.0071; t=5.078 df=4; mean ± SEM= 65.53 ± 5.007. 200µM H₂O₂: P=0.0017; t=7.501 df=4; mean ± SEM= 62.70 ± 1.931. 100µM H₂O₂: P=0.0033; t=6.269 df=4; mean ± SEM= 67.63 ± 2.378). n= 3 biologically independent samples.

E-F. Quantification of cell death in WT, MLKL^{-/-} and SVCT2^{-/-} N2a cells WT: H₂O₂ (mean ± SEM= 2.667 ± 0.2728) vs. AA+H₂O₂: P=0.0003; t=12.02 df=4; mean ± SEM= 49.22 ± 3.862. WT_{AA+H₂O₂} vs. KO MLKL_{AA+H₂O₂}: P=0.0002 t=12.64 df=4; mean ± SEM= 0.3333 ± 0.1856. KO SVCT2_{AA+H₂O₂}: P=0.0004 t=11.07 df=4; mean ± SEM= 6.000 ± 0.5774) n=3 biologically independent samples. **G.** Scheme of the protocol used in Figure H. **H.** Cell viability at 3 h post-treatment in SVCT2^{-/-} N2a cells. Ctrl (mean ± SEM= 100.0 ± 4.583) vs. H₂O₂: P=0.0407; t=2.981 df=4; mean ± SEM= 85.90 ± 1.172. H₂O₂ vs. DHA+H₂O₂: P=0.0005; t=10.23 df=4; mean ± SEM= 67.03 ± 1.424). Data are shown *t*-student (two-tailed) as mean ± SEM. Each experiment was independently reproduced three times. *P≤ 0.05, **P≤ 0.01, ***P≤ 0.001, n.s. not significant.

Análisis estadístico relacionado a la Figura 31.

A. Live cell microscopy analysis. Arrows indicate the formation of bubbles in N2a wild-type cells. **B.** Quantification of cell death. H₂O₂ (Mean \pm SEM=6.150 \pm 0.9701) vs. AA + H₂O₂: P=0.0008; t=9.049 df=4; mean \pm SEM=33.13 \pm 2.820; AA+H₂O₂+zVAD: P=0.0002; t=12.42 df=4; mean \pm SEM= 33.17 \pm 1.946. AA+H₂O₂+Nec-1: P<0.0001; t=30.04 df=4; mean \pm SEM= 43.80 \pm 0.7937. AA+H₂O₂ vs. AA+H₂O₂+Nec-1: P=0.0219; t=3.641 df=4.) n=3 biologically independent samples. Cells were assayed in triplicate at each condition. Scale bar 10 μ m. Data are shown *t*-student (two-tailed) as mean \pm SEM; all data are representative of three separate experiments. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001.



IX Referencias

- ABHILASH, P. A., HARIKRISHNAN, R. & INDIRA, M. 2014. Ascorbic acid suppresses endotoxemia and NF-kappaB signaling cascade in alcoholic liver fibrosis in guinea pigs: a mechanistic approach. *Toxicol Appl Pharmacol*, 274, 215-24.
- ADHAMI, F., LIAO, G., MOROZOV, Y. M., SCHLOEMER, A., SCHMITHORST, V. J., LORENZ, J. N., DUNN, R. S., VORHEES, C. V., WILLS-KARP, M., DEGEN, J. L., DAVIS, R. J., MIZUSHIMA, N., RAKIC, P., DARDZINSKI, B. J., HOLLAND, S. K., SHARP, F. R. & KUAN, C. Y. 2006. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol*, 169, 566-83.
- AMIN, P., FLOREZ, M., NAJAFOV, A., PAN, H., GENG, J., OFENGEIM, D., DZIEDZIC, S. A., WANG, H., BARRETT, V. J., ITO, Y., LAVOIE, M. J. & YUAN, J. 2018. Regulation of a distinct activated RIPK1 intermediate bridging complex I and complex II in TNFalpha-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- ANNIBALDI, A., WICKY JOHN, S., VANDEN BERGHE, T., SWATEK, K. N., RUAN, J., LICCARDI, G., BIANCHI, K., ELLIOTT, P. R., CHOI, S. M., VAN COILLIE, S., BERTIN, J., WU, H., KOMANDER, D., VANDENABEELE, P., SILKE, J. & MEIER, P. 2018. Ubiquitin-Mediated Regulation of RIPK1 Kinase Activity Independent of IKK and MK2. *Mol Cell*, 69, 566-580 e5.

- ARYA, S. P., JAIN, P. & MAHAJAN, M. 2002. A new method for the ascorbic acid assay using iron(II)-pyridine-2,6-dicarboxylic acid complex. *Ann Chim*, 92, 1159-64.
- ASTUYA, A., CAPRILE, T., CASTRO, M., SALAZAR, K., GARCIA MDE, L., REINICKE, K., RODRIGUEZ, F., VERA, J. C., MILLAN, C., ULLOA, V., LOW, M., MARTINEZ, F. & NUALART, F. 2005. Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res*, 79, 146-56.
- BERTRAND, M. J., MILUTINOVIC, S., DICKSON, K. M., HO, W. C., BOUDREAU, A., DURKIN, J., GILLARD, J. W., JAQUITH, J. B., MORRIS, S. J. & BARKER, P. A. 2008. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 30, 689-700.
- BIJUR, G. N., BRIGGS, B., HITCHCOCK, C. L. & WILLIAMS, M. V. 1999. Ascorbic acid-dehydroascorbate induces cell cycle arrest at G2/M DNA damage checkpoint during oxidative stress. *Environ Mol Mutagen*, 33, 144-52.
- BOWIE, A. & O'NEILL, L. A. 1997. Vitamin C inhibits NF kappa B activation in endothelial cells. *Biochem Soc Trans*, 25, 131S.
- BOWIE, A. G. & O'NEILL, L. A. 2000. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*, 165, 7180-8.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.

- CACCAMO, A., BRANCA, C., PIRAS, I. S., FERREIRA, E., HUENTELMAN, M. J., LIANG, W. S., READHEAD, B., DUDLEY, J. T., SPANGENBERG, E. E., GREEN, K. N., BELFIORE, R., WINSLOW, W. & ODDO, S. 2017. Necroptosis activation in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*, 20, 1236-1246.
- CAO, Y., ZHANG, L., SUN, S., YI, Z., JIANG, X. & JIA, D. 2016. Neuroprotective effects of syringic acid against OGD/R-induced injury in cultured hippocampal neuronal cells. *Int J Mol Med*, 38, 567-73.
- CAPRILE, T., SALAZAR, K., ASTUYA, A., CISTERNAS, P., SILVA-ALVAREZ, C., MONTECINOS, H., MILLAN, C., DE LOS ANGELES GARCIA, M. & NUALART, F. 2009. The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem*, 108, 563-77.
- CARCAMO, J. M., PEDRAZA, A., BORQUEZ-OJEDA, O. & GOLDE, D. W. 2002. Vitamin C suppresses TNF alpha-induced NF kappa B activation by inhibiting I kappa B alpha phosphorylation. *Biochemistry*, 41, 12995-3002.
- CARCAMO, J. M., PEDRAZA, A., BORQUEZ-OJEDA, O., ZHANG, B., SANCHEZ, R. & GOLDE, D. W. 2004. Vitamin C is a kinase inhibitor: dehydroascorbic acid inhibits I kappa B alpha kinase beta. *Mol Cell Biol*, 24, 6645-52.
- CISTERNAS, P., SILVA-ALVAREZ, C., MARTINEZ, F., FERNANDEZ, E., FERRADA, L., OYARCE, K., SALAZAR, K., BOLANOS, J. P. & NUALART, F. 2014. The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *J Neurochem*, 129, 663-71.

- CORPE, C. P., ECK, P., WANG, J., AL-HASANI, H. & LEVINE, M. 2013. Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. *J Biol Chem*, 288, 9092-101.
- CROFT, M., BENEDICT, C. A. & WARE, C. F. 2013. Clinical targeting of the TNF and TNFR superfamilies. *Nat Rev Drug Discov*, 12, 147-68.
- CUI, H. J., LIU, S., YANG, R., FU, G. H. & LU, Y. 2017. N-stearoyltyrosine protects primary cortical neurons against oxygen-glucose deprivation-induced apoptosis through inhibiting anandamide inactivation system. *Neurosci Res*.
- CHACON, M. R., JENSEN, M. B., SATTIN, J. A. & ZIVIN, J. A. 2008. Neuroprotection in cerebral ischemia: emphasis on the SAINT trial. *Curr Cardiol Rep*, 10, 37-42.
- CHEN, H., KIM, G. S., OKAMI, N., NARASIMHAN, P. & CHAN, P. H. 2011a. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation. *Neurobiol Dis*, 42, 341-8.
- CHEN, H., YOSHIOKA, H., KIM, G. S., JUNG, J. E., OKAMI, N., SAKATA, H., MAIER, C. M., NARASIMHAN, P., GOEDERS, C. E. & CHAN, P. H. 2011b. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*, 14, 1505-17.
- CHEN, Q., ESPEY, M. G., KRISHNA, M. C., MITCHELL, J. B., CORPE, C. P., BUETTNER, G. R., SHACTER, E. & LEVINE, M. 2005. Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13604-9.

- CHEN, Q., ESPEY, M. G., SUN, A. Y., POOPUT, C., KIRK, K. L., KRISHNA, M. C., KHOSH, D. B., DRISKO, J. & LEVINE, M. 2008. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11105-9.
- CHEN, X., LI, W., REN, J., HUANG, D., HE, W. T., SONG, Y., YANG, C., LI, W., ZHENG, X., CHEN, P. & HAN, J. 2014. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res*, 24, 105-21.
- CHEN, Y., ZHANG, L., YU, H., SONG, K., SHI, J., CHEN, L. & CHENG, J. 2018. Necrostatin-1 Improves Long-term Functional Recovery Through Protecting Oligodendrocyte Precursor Cells After Transient Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Neuroscience*, 371, 229-241.
- CHO, Y. S., CHALLA, S., MOQUIN, D., GENGA, R., RAY, T. D., GUILDFORD, M. & CHAN, F. K. 2009. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137, 1112-23.
- CHOMCZYNSKI, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 15, 532-4, 536-7.
- CHRISTOFFERSON, D. E., LI, Y. & YUAN, J. 2014. Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annu Rev Physiol*, 76, 129-50.
- DASKALOPOULOS, R., KORCOK, J., TAO, L. & WILSON, J. X. 2002. Accumulation of intracellular ascorbate from dehydroascorbic acid by astrocytes is decreased after oxidative stress and restored by propofol. *Glia*, 39, 124-32.

- DE ALMAGRO, M. C., GONCHAROV, T., IZRAEL-TOMASEVIC, A., DUTTLE, S., KIST, M., VARFOLOMEEV, E., WU, X., LEE, W. P., MURRAY, J., WEBSTER, J. D., YU, K., KIRKPATRICK, D. S., NEWTON, K. & VUCIC, D. 2017. Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death Differ*, 24, 26-37.
- DE TORRES, C., MUNELL, F., FERRER, I., REVENTOS, J. & MACAYA, A. 1997. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neurosci Lett*, 230, 1-4.
- DECLERCQ, W., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2009. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival. *Cell*, 138, 229-32.
- DEGTEREV, A., HITOMI, J., GERMSCHIED, M., CH'EN, I. L., KORKINA, O., TENG, X., ABBOTT, D., CUNY, G. D., YUAN, C., WAGNER, G., HEDRICK, S. M., GERBER, S. A., LUGOVSKOY, A. & YUAN, J. 2008. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*, 4, 313-21.
- DEGTEREV, A., HUANG, Z., BOYCE, M., LI, Y., JAGTAP, P., MIZUSHIMA, N., CUNY, G. D., MITCHISON, T. J., MOSKOWITZ, M. A. & YUAN, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1, 112-9.
- DEGTEREV, A. & YUAN, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 378-90.
- DHAR-MASCARENO, M., CARCAMO, J. M. & GOLDE, D. W. 2005. Hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med*, 38, 1311-22.

- DONDELINGER, Y., DELANGHE, T., ROJAS-RIVERA, D., PRIEM, D., DELVAEYE, T., BRUGGEMAN, I., VAN HERREWEGHE, F., VANDENABEELE, P. & BERTRAND, M. J. M. 2017. MK2 phosphorylation of RIPK1 regulates TNF-mediated cell death. *Nat Cell Biol*, 19, 1237-1247.
- DONDELINGER, Y., JOUAN-LANHOUE, S., DIVERT, T., THEATRE, E., BERTIN, J., GOUGH, P. J., GIANANTI, P., HECK, A. J., DEJARDIN, E., VANDENABEELE, P. & BERTRAND, M. J. 2015. NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Mol Cell*, 60, 63-76.
- DONG, Z., SAIKUMAR, P., WEINBERG, J. M. & VENKATACHALAM, M. A. 1997. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol*, 151, 1205-13.
- DUCRUET, A. F., MACK, W. J., MOCCO, J., HOH, D. J., COON, A. L., D'AMBROSIO, A. L., WINFREE, C. J., PINSKY, D. J. & CONNOLLY, E. S., JR. 2011. Preclinical evaluation of postischemic dehydroascorbic Acid administration in a large-animal stroke model. *Transl Stroke Res*, 2, 399-403.
- ENDRES, M., NAMURA, S., SHIMIZU-SASAMATA, M., WAEBER, C., ZHANG, L., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B. T. & MOSKOWITZ, M. A. 1998. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 238-47.
- ENGELMANN, C., WEIH, F. & HAENOLD, R. 2014. Role of nuclear factor kappa B in central nervous system regeneration. *Neural Regen Res*, 9, 707-11.

- EVANS, M. K., TOVMASYAN, A., BATINIC-HABERLE, I. & DEVI, G. R. 2014. Mn porphyrin in combination with ascorbate acts as a pro-oxidant and mediates caspase-independent cancer cell death. *Free Radic Biol Med*, 68, 302-14.
- FERNANDO, P., BRUNETTE, S. & MEGENEY, L. A. 2005. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J*, 19, 1671-3.
- FERRADA, L., SALAZAR, K. & NUALART, F. 2017. Vitamin C Transporter (SVCT2) Distribution in Developing and Adult Brains.
- GALLUZZI, L., BRAVO-SAN PEDRO, J. M., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., ANDREWS, D., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., BAEHRECKE, E. H., BAZAN, N. G., BERTRAND, M. J., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BREDESEN, D. E., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CANDI, E., CECCONI, F., CHAN, F. K., CHANDEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K. M., DI DANIELE, N., DIXIT, V. M., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., FIMIA, G. M., FLAVELL, R. A., FULDA, S., GARRIDO, C., GOUGEON, M. L., GREEN, D. R., GRONEMEYER, H., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HENGARTNER, M. O., ICHIJO, H., JOSEPH, B., JOST, P. J., KAUFMANN, T., KEPP, O., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LOPEZ-OTIN, C., LUGLI, E., MADEO, F., MALORNI, W., MARINE, J. C., MARTIN, S. J., MARTINOU, J. C., MEDEMA, J. P., MEIER, P., MELINO, S.,

MIZUSHIMA, N., MOLL, U., MUNOZ-PINEDO, C., NUNEZ, G., OBERST, A., PANARETAKIS, T., PENNINGER, J. M., PETER, M. E., PIACENTINI, M., PINTON, P., PREHN, J. H., PUTHALAKATH, H., RABINOVICH, G. A., RAVICHANDRAN, K. S., RIZZUTO, R., RODRIGUES, C. M., RUBINSZTEIN, D. C., RUDEL, T., SHI, Y., SIMON, H. U., STOCKWELL, B. R., SZABADKAI, G., TAIT, S. W., TANG, H. L., TAVERNARAKIS, N., TSUJIMOTO, Y., VANDEN BERGHE, T., VANDENABEELE, P., VILLUNGER, A., WAGNER, E. F., et al. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*, 22, 58-73.

GALLUZZI, L., KEPP, O., CHAN, F. K. & KROEMER, G. 2017. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol*, 12, 103-130.

GALLUZZI, L., VITALE, I., AARONSON, S. A., ABRAMS, J. M., ADAM, D., AGOSTINIS, P., ALNEMRI, E. S., ALTUCCI, L., AMELIO, I., ANDREWS, D. W., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M., ANTONOV, A. V., ARAMA, E., BAEHRECKE, E. H., BARLEV, N. A., BAZAN, N. G., BERNASSOLA, F., BERTRAND, M. J. M., BIANCHI, K., BLAGOSKLONNY, M. V., BLOMGREN, K., BORNER, C., BOYA, P., BRENNER, C., CAMPANELLA, M., CANDI, E., CARMONA-GUTIERREZ, D., CECCONI, F., CHAN, F. K., CHANDEL, N. S., CHENG, E. H., CHIPUK, J. E., CIDLOWSKI, J. A., CIECHANOVER, A., COHEN, G. M., CONRAD, M., CUBILLOS-RUIZ, J. R., CZABOTAR, P. E., D'ANGIOLELLA, V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., DE LAURENZI, V., DE MARIA, R., DEBATIN, K. M., DEBERARDINIS, R. J., DESHMUKH, M., DI DANIELE, N., DI VIRGILIO, F., DIXIT, V. M., DIXON, S. J., DUCKETT, C. S., DYNLACHT, B. D., EL-DEIRY, W. S., ELROD, J. W., FIMIA, G. M.,

- FULDA, S., GARCIA-SAEZ, A. J., GARG, A. D., GARRIDO, C., GAVATHIOTIS, E., GOLSTEIN, P., GOTTLIEB, E., GREEN, D. R., GREENE, L. A., GRONEMEYER, H., GROSS, A., HAJNOCZKY, G., HARDWICK, J. M., HARRIS, I. S., HENGARTNER, M. O., HETZ, C., ICHIJO, H., JAATTELA, M., JOSEPH, B., JOST, P. J., JUIN, P. P., KAISER, W. J., KARIN, M., KAUFMANN, T., KEPP, O., KIMCHI, A., KITSIS, R. N., KLIONSKY, D. J., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LEE, S. W., LEMASTERS, J. J., LEVINE, B., LINKERMANN, A., LIPTON, S. A., LOCKSHIN, R. A., LOPEZ-OTIN, C., LOWE, S. W., LUEDDE, T., LUGLI, E., MACFARLANE, M., MADEO, F., MALEWICZ, M., MALORNI, W., MANIC, G., et al. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 25, 486-541.
- GARCIA-KRAUSS, A., FERRADA, L., ASTUYA, A., SALAZAR, K., CISTERNAS, P., MARTINEZ, F., RAMIREZ, E. & NUALART, F. 2015. Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Mol Neurobiol*.
- GARCIA-KRAUSS, A., FERRADA, L., ASTUYA, A., SALAZAR, K., CISTERNAS, P., MARTINEZ, F., RAMIREZ, E. & NUALART, F. 2016. Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Mol Neurobiol*, 53, 5847-5863.
- GILL, R., SORIANO, M., BLOMGREN, K., HAGBERG, H., WYBRECHT, R., MISS, M. T., HOEFER, S., ADAM, G., NIEDERHAUSER, O., KEMP, J. A. & LOETSCHER, H. 2002. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-

- induced neurodegeneration in adult and neonatal brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 420-30.
- GONG, Y. N., GUY, C., OLAUSON, H., BECKER, J. U., YANG, M., FITZGERALD, P., LINKERMANN, A. & GREEN, D. R. 2017. ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell*, 169, 286-300 e16.
- GOUGH, D. R. & COTTER, T. G. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis*, 2, e213.
- GREEN, D. R. & REED, J. C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-12.
- GROOTJANS, S., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2017. Initiation and execution mechanisms of necroptosis: an overview. *Cell Death Differ*.
- GUAQUIL, V. H., GOLDE, D. W., BECKLES, D. L., MASCARENO, E. J. & SIDDIQUI, M. A. 2004. Vitamin C inhibits hypoxia-induced damage and apoptotic signaling pathways in cardiomyocytes and ischemic hearts. *Free Radic Biol Med*, 37, 1419-29.
- HAN, J. M., CHANG, B. J., LI, T. Z., CHOE, N. H., QUAN, F. S., JANG, B. J., CHO, I. H., HONG, H. N. & LEE, J. H. 2007. Protective effects of ascorbic acid against lead-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat hippocampus in vivo. *Brain Res*, 1185, 68-74.
- HE, S., WANG, L., MIAO, L., WANG, T., DU, F., ZHAO, L. & WANG, X. 2009. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell*, 137, 1100-11.

- HECKMANN, B. L., TUMMERS, B. & GREEN, D. R. 2019. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death Differ*, 26, 41-52.
- HEGER, K. & DIXIT, V. M. 2018. TBK1 and IKKepsilon restrain cell death. *Nat Cell Biol*, 20, 1330-1331.
- HENNE, W. M., ZHU, L., BALOGI, Z., STEFAN, C., PLEISS, J. A. & EMR, S. D. 2015. Mdm1/Snx13 is a novel ER-endolysosomal interorganelle tethering protein. *J Cell Biol*, 210, 541-51.
- HILDEBRAND, J. M., TANZER, M. C., LUCET, I. S., YOUNG, S. N., SPALL, S. K., SHARMA, P., PIEROTTI, C., GARNIER, J. M., DOBSON, R. C., WEBB, A. I., TRIPAYDONIS, A., BABON, J. J., MULCAIR, M. D., SCANLON, M. J., ALEXANDER, W. S., WILKS, A. F., CZABOTAR, P. E., LESSENE, G., MURPHY, J. M. & SILKE, J. 2014. Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 15072-7.
- HIMMELREICH, U., DREW, K. N., SERIANNI, A. S. & KUCHEL, P. W. 1998. ¹³C NMR studies of vitamin C transport and its redox cycling in human erythrocytes. *Biochemistry*, 37, 7578-88.
- HU, B. R., LIU, C. L., OUYANG, Y., BLOMGREN, K. & SIESJO, B. K. 2000. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1294-300.
- HYSLOP, P. A., ZHANG, Z., PEARSON, D. V. & PHEBUS, L. A. 1995. Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro. *Brain Res*, 671, 181-6.

- JACO, I., ANNIBALDI, A., LALAOU, N., WILSON, R., TENEV, T., LAURIEN, L., KIM, C., JAMAL, K., WICKY JOHN, S., LICCARDI, G., CHAU, D., MURPHY, J. M., BRUMATTI, G., FELTHAM, R., PASPARAKIS, M., SILKE, J. & MEIER, P. 2017. MK2 Phosphorylates RIPK1 to Prevent TNF-Induced Cell Death. *Mol Cell*, 66, 698-710 e5.
- JELLINGER, K. A. 2001. Cell death mechanisms in neurodegeneration. *J Cell Mol Med*, 5, 1-17.
- JIANG, L., TIXEIRA, R., CARUSO, S., ATKIN-SMITH, G. K., BAXTER, A. A., PAONE, S., HULETT, M. D. & POON, I. K. 2016. Monitoring the progression of cell death and the disassembly of dying cells by flow cytometry. *Nat Protoc*, 11, 655-63.
- JOUAN-LANHOUE, S., RIQUET, F., DUPREZ, L., VANDEN BERGHE, T., TAKAHASHI, N. & VANDENABEELE, P. 2014. Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models. *Semin Cell Dev Biol*, 35, 2-13.
- JUNG, J. E., KIM, G. S., CHEN, H., MAIER, C. M., NARASIMHAN, P., SONG, Y. S., NIIZUMA, K., KATSU, M., OKAMI, N., YOSHIOKA, H., SAKATA, H., GOEDERS, C. E. & CHAN, P. H. 2010. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol*, 41, 172-9.
- KALOGERIS, T., BAINES, C. P., KRENZ, M. & KORTHUIS, R. J. 2012. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298, 229-317.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.

- KING, M. D., WHITAKER-LEA, W. A., CAMPBELL, J. M., ALLEYNE, C. H., JR. & DHANDAPANI, K. M. 2014. Necrostatin-1 reduces neurovascular injury after intracerebral hemorrhage. *Int J Cell Biol*, 2014, 495817.
- KINGSBURY, A. E., MARDSEN, C. D. & FOSTER, O. J. 1998. DNA fragmentation in human substantia nigra: apoptosis or perimortem effect? *Mov Disord*, 13, 877-84.
- KOIKE, M., SHIBATA, M., TADAKOSHI, M., GOTOH, K., KOMATSU, M., WAGURI, S., KAWAHARA, N., KUIDA, K., NAGATA, S., KOMINAMI, E., TANAKA, K. & UCHIYAMA, Y. 2008. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol*, 172, 454-69.
- KOLE, A. J., ANNIS, R. P. & DESHMUKH, M. 2013. Mature neurons: equipped for survival. *Cell Death Dis*, 4, e689.
- KORCOK, J., DIXON, S. J., LO, T. C. & WILSON, J. X. 2003. Differential effects of glucose on dehydroascorbic acid transport and intracellular ascorbate accumulation in astrocytes and skeletal myocytes. *Brain Res*, 993, 201-7.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L., VANDENABEELE, P., ABRAMS, J., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., EL-DEIRY, W. S., GOLSTEIN, P., GREEN, D. R., HENGARTNER, M., KNIGHT, R. A., KUMAR, S., LIPTON, S. A., MALORNI, W., NUNEZ, G., PETER, M. E., TSCHOPP, J., YUAN, J., PIACENTINI, M., ZHIVOTOVSKY, B. & MELINO, G. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16, 3-11.

- LACKNER, L. L. & NUNNARI, J. 2010. Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. *Chem Biol*, 17, 578-83.
- LAFEMINA, M. J., SHELDON, R. A. & FERRIERO, D. M. 2006. Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatr Res*, 59, 680-3.
- LAFONT, E., DRABER, P., RIESER, E., REICHERT, M., KUPKA, S., DE MIGUEL, D., DRABEROVA, H., VON MASSENHAUSEN, A., BHAMRA, A., HENDERSON, S., WOJDYLA, K., CHALK, A., SURINOVA, S., LINKERMANN, A. & WALCZAK, H. 2018. TBK1 and IKKepsilon prevent TNF-induced cell death by RIPK1 phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 20, 1389-1399.
- LEVINE, M., ESPEY, M. G. & CHEN, Q. 2009. Losing and finding a way at C: new promise for pharmacologic ascorbate in cancer treatment. *Free Radic Biol Med*, 47, 27-9.
- LEWERENZ, J., ATES, G., METHNER, A., CONRAD, M. & MAHER, P. 2018. Oxytosis/Ferroptosis-(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. *Front Neurosci*, 12, 214.
- LI, X., ZHAO, Y., XIA, Q., ZHENG, L., LIU, L., ZHAO, B. & SHI, J. 2016. Nuclear translocation of annexin 1 following oxygen-glucose deprivation-reperfusion induces apoptosis by regulating Bid expression via p53 binding. *Cell Death Dis*, 7, e2356.

- LIU, C. L., SIESJO, B. K. & HU, B. R. 2004. Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience*, 127, 113-23.
- LV, H., WANG, C., FANG, T., LI, T., LV, G., HAN, Q., YANG, W. & WANG, H. 2018. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2. *NPJ Precis Oncol*, 2, 1.
- MACMANUS, J. P., BUCHAN, A. M., HILL, I. E., RASQUINHA, I. & PRESTON, E. 1993. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett*, 164, 89-92.
- MALEK, R., BOROWICZ, K. K., JARGIELLO, M. & CZUCZWAR, S. J. 2007. Role of nuclear factor kappaB in the central nervous system. *Pharmacol Rep*, 59, 25-33.
- MAY, J. M. 2012. Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem*, 56, 85-103.
- MCARTHUR, K. & KILE, B. T. 2018. Apoptotic Caspases: Multiple or Mistaken Identities? *Trends Cell Biol*, 28, 475-493.
- MENG, H., LIU, Z., LI, X., WANG, H., JIN, T., WU, G., SHAN, B., CHRISTOFFERSON, D. E., QI, C., YU, Q., LI, Y. & YUAN, J. 2018. Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115, E2001-E2009.
- MICHELS, A. J. & FREI, B. 2013. Myths, Artifacts, and Fatal Flaws: Identifying Limitations and Opportunities in Vitamin C Research. *Nutrients*, 5, 5161-5192.

- MOUJALLED, D. M., COOK, W. D., MURPHY, J. M. & VAUX, D. L. 2014. Necroptosis induced by RIPK3 requires MLKL but not Drp1. *Cell Death Dis*, 5, e1086.
- MUKHERJEE, A. & WILLIAMS, D. W. 2017. More alive than dead: non-apoptotic roles for caspases in neuronal development, plasticity and disease. *Cell Death Differ*, 24, 1411-1421.
- MUNOZ-MONTESINO, C., ROA, F. J., PENA, E., GONZALEZ, M., SOTOMAYOR, K., INOSTROZA, E., MUNOZ, C. A., GONZALEZ, I., MALDONADO, M., SOLIZ, C., REYES, A. M., VERA, J. C. & RIVAS, C. I. 2014. Mitochondrial ascorbic acid transport is mediated by a low-affinity form of the sodium-coupled ascorbic acid transporter-2. *Free Radic Biol Med*, 70, 241-54.
- MURPHY, J. M., CZABOTAR, P. E., HILDEBRAND, J. M., LUCET, I. S., ZHANG, J. G., ALVAREZ-DIAZ, S., LEWIS, R., LALAOUI, N., METCALF, D., WEBB, A. I., YOUNG, S. N., VARGHESE, L. N., TANNAHILL, G. M., HATCHELL, E. C., MAJEWSKI, I. J., OKAMOTO, T., DOBSON, R. C., HILTON, D. J., BABON, J. J., NICOLA, N. A., STRASSER, A., SILKE, J. & ALEXANDER, W. S. 2013. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39, 443-53.
- NUALART, F., GODOY, A. & REINICKE, K. 1999. Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res*, 824, 97-104.
- NUALART, F., MACK, L., GARCIA, A., CISTERNAS, P., BONGARZONE, E. R., HEITZER, M., JARA, N., MARTINEZ, F., FERRADA, L., ESPINOZA, F., BAEZA, V. & SALAZAR, K. 2014. Vitamin C Transporters, Recycling and the

- Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J Stem Cell Res Ther*, 4, 209.
- NUALART, F. J., RIVAS, C. I., MONTECINOS, V. P., GODOY, A. S., GUAQUIL, V. H., GOLDE, D. W. & VERA, J. C. 2003. Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem*, 278, 10128-33.
- O'COLLINS, V. E., DONNAN, G. A. & HOWELLS, D. W. 2011a. History of animal models of stroke. *Int J Stroke*, 6, 77-8.
- O'COLLINS, V. E., MACLEOD, M. R., COX, S. F., VAN RAAY, L., ALEKSOSKA, E., DONNAN, G. A. & HOWELLS, D. W. 2011b. Preclinical drug evaluation for combination therapy in acute stroke using systematic review, meta-analysis, and subsequent experimental testing. *J Cereb Blood Flow Metab*, 31, 962-75.
- O'COLLINS, V. E., MACLEOD, M. R., DONNAN, G. A., HORKY, L. L., VAN DER WERP, B. H. & HOWELLS, D. W. 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol*, 59, 467-77.
- O'COLLINS, V. E., MACLEOD, M. R., DONNAN, G. A. & HOWELLS, D. W. 2012. Evaluation of combination therapy in animal models of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32, 585-97.
- OOMMAN, S., STRAHLENDORF, H., FINCKBONE, V. & STRAHLENDORF, J. 2005. Non-lethal active caspase-3 expression in Bergmann glia of postnatal rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res*, 160, 130-45.
- PASPALJ, D., NIKIC, P., SAVIC, M., DJURIC, D., SIMANIC, I., ZIVKOVIC, V., JEREMIC, N., SREJOVIC, I. & JAKOVLJEVIC, V. 2015. Redox status in acute ischemic stroke: correlation with clinical outcome. *Mol Cell Biochem*.

- PASPARAKIS, M. & VANDENABEELE, P. 2015. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517, 311-20.
- PEDERSEN, J. Z., BERNARDI, G., CENTONZE, D., PISANI, A., ROSSI, L., ROTILIO, G. & CALABRESI, P. 1998. Hypoglycemia, hypoxia, and ischemia in a corticostriatal slice preparation: electrophysiologic changes and ascorbyl radical formation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 18, 868-75.
- PEREZ-CRUZ, I., CARCAMO, J. M. & GOLDE, D. W. 2003. Vitamin C inhibits FAS-induced apoptosis in monocytes and U937 cells. *Blood*, 102, 336-43.
- PEREZ-CRUZ, I., CARCAMO, J. M. & GOLDE, D. W. 2007. Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. *Apoptosis*, 12, 225-34.
- PRABHAKARAN, S., RUFF, I. & BERNSTEIN, R. A. 2015. Acute stroke intervention: a systematic review. *JAMA*, 313, 1451-62.
- PUSKAS, F., GERGELY, P., JR., BANKI, K. & PERL, A. 2000. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J*, 14, 1352-61.
- QU, Y., SHI, J., TANG, Y., ZHAO, F., LI, S., MENG, J., TANG, J., LIN, X., PENG, X. & MU, D. 2016. MLKL inhibition attenuates hypoxia-ischemia induced neuronal damage in developing brain. *Exp Neurol*, 279, 223-31.
- RE, D. B., LE VERCHE, V., YU, C., AMOROSO, M. W., POLITI, K. A., PHANI, S., IKIZ, B., HOFFMANN, L., KOOLEN, M., NAGATA, T., PAPADIMITRIOU, D., NAGY, P., MITSUMOTO, H., KARIYA, S., WICHTERLE, H., HENDERSON, C. E. & PRZEDBORSKI, S. 2014. Necroptosis drives motor neuron death in models of both sporadic and familial ALS. *Neuron*, 81, 1001-8.

- REHKER, J., RODHE, J., NESBITT, R. R., BOYLE, E. A., MARTIN, B. K., LORD, J., KARACA, I., NAJ, A., JESSEN, F., HELISALMI, S., SOININEN, H., HILTUNEN, M., RAMIREZ, A., SCHERER, M., FARRER, L. A., HAINES, J. L., PERICAK-VANCE, M. A., RASKIND, W. H., CRUCHAGA, C., SCHELLENBERG, G. D., JOSEPH, B. & BRKANAC, Z. 2017. Caspase-8, association with Alzheimer's Disease and functional analysis of rare variants. *PLoS One*, 12, e0185777.
- REMIJSEN, Q., GOOSSENS, V., GROOTJANS, S., VAN DEN HAUTE, C., VANLANGENAKKER, N., DONDELINGER, Y., ROELANDT, R., BRUGGEMAN, I., GONCALVES, A., BERTRAND, M. J., BAEKELANDT, V., TAKAHASHI, N., BERGHE, T. V. & VANDENABEELE, P. 2014. Depletion of RIPK3 or MLKL blocks TNF-driven necroptosis and switches towards a delayed RIPK1 kinase-dependent apoptosis. *Cell Death Dis*, 5, e1004.
- RENEHAN, A. G., BOOTH, C. & POTTEN, C. S. 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322, 1536-8.
- RICE, M. E. 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 23, 209-16.
- ROHN, T. T., CUSACK, S. M., KESSINGER, S. R. & OXFORD, J. T. 2004. Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells. *Exp Cell Res*, 295, 215-25.
- RUMSEY, S. C., DARUWALA, R., AL-HASANI, H., ZARNOWSKI, M. J., SIMPSON, I. A. & LEVINE, M. 2000. Dehydroascorbic acid transport by GLUT4 in *Xenopus* oocytes and isolated rat adipocytes. *J Biol Chem*, 275, 28246-53.

- RUMSEY, S. C., KWON, O., XU, G. W., BURANT, C. F., SIMPSON, I. & LEVINE, M. 1997. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem*, 272, 18982-9.
- SAAS, P., DAGUINDAU, E. & PERRUCHE, S. 2016. Concise Review: Apoptotic Cell-Based Therapies-Rationale, Preclinical Results and Future Clinical Developments. *Stem Cells*, 34, 1464-73.
- SALAZAR, K., CERDA, G., MARTINEZ, F., SARMIENTO, J. M., GONZALEZ, C., RODRIGUEZ, F., GARCIA-ROBLES, M., TAPIA, J. C., CIFUENTES, M. & NUALART, F. 2014. SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem*, 130, 693-706.
- SALAZAR, K., MARTINEZ, M., ULLOA, V., BERTINAT, R., MARTINEZ, F., JARA, N., ESPINOZA, F., BONGARZONE, E. R. & NUALART, F. 2016. SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling. *Mol Neurobiol*, 53, 6668-6679.
- SAROSIEK, K. A., FRASER, C., MUTHALAGU, N., BHOLA, P. D., CHANG, W., MCBRAYER, S. K., CANTLON, A., FISCH, S., GOLOMB-MELLO, G., RYAN, J. A., DENG, J., JIAN, B., CORBETT, C., GOLDENBERG, M., MADSEN, J. R., LIAO, R., WALSH, D., SEDIVY, J., MURPHY, D. J., CARRASCO, D. R., ROBINSON, S., MOSLEHI, J. & LETAI, A. 2017. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell*, 31, 142-156.
- SCHOENFELD, J. D., SIBENALLER, Z. A., MAPUSKAR, K. A., WAGNER, B. A., CRAMER-MORALES, K. L., FURQAN, M., SANDHU, S., CARLISLE, T. L.,

- SMITH, M. C., ABU HEJLEH, T., BERG, D. J., ZHANG, J., KEECH, J., PAREKH, K. R., BHATIA, S., MONGA, V., BODEKER, K. L., AHMANN, L., VOLLSTEDT, S., BROWN, H., SHANAHAN KAUFFMAN, E. P., SCHALL, M. E., HOHL, R. J., CLAMON, G. H., GREENLEE, J. D., HOWARD, M. A., SCHULTZ, M. K., SMITH, B. J., RILEY, D. P., DOMANN, F. E., CULLEN, J. J., BUETTNER, G. R., BUATTI, J. M., SPITZ, D. R. & ALLEN, B. G. 2017. O₂- and H₂O₂-Mediated Disruption of Fe Metabolism Causes the Differential Susceptibility of NSCLC and GBM Cancer Cells to Pharmacological Ascorbate. *Cancer Cell*, 31, 487-500 e8.
- SCHRODER, E. & EATON, P. 2008. Hydrogen peroxide as an endogenous mediator and exogenous tool in cardiovascular research: issues and considerations. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 153-9.
- SHAN, B., PAN, H., NAJAFOV, A. & YUAN, J. 2018. Necroptosis in development and diseases. *Genes Dev*, 32, 327-340.
- SHEMBADE, N., MA, A. & HARHAJ, E. W. 2010. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, 327, 1135-9.
- SONG, J. H., SHIN, S. H. & CHUNG, I. M. 2002. Effects of glutamate on dehydroascorbate uptake and its enhanced vulnerability to the peroxidation in cerebral cortical slices. *Exp Mol Med*, 34, 419-25.
- SONG, J. H., SHIN, S. H. & ROSS, G. M. 1999. Prooxidant effects of ascorbate in rat brain slices. *J Neurosci Res*, 58, 328-36.

- SONG, J. H., SHIN, S. H. & ROSS, G. M. 2001. Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system. *Brain Res*, 895, 66-72.
- SUN, L., WANG, H., WANG, Z., HE, S., CHEN, S., LIAO, D., WANG, L., YAN, J., LIU, W., LEI, X. & WANG, X. 2012. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148, 213-27.
- SUN, Z., HU, W., YIN, S., LU, X., ZUO, W., GE, S. & XU, Y. 2017. NGF protects against oxygen and glucose deprivation-induced oxidative stress and apoptosis by up-regulation of HO-1 through MEK/ERK pathway. *Neurosci Lett*, 641, 8-14.
- TIAN, W., WANG, Y., XU, Y., GUO, X., WANG, B., SUN, L., LIU, L., CUI, F., ZHUANG, Q., BAO, X., SCHLEY, G., CHUNG, T. L., LASLETT, A. L., WILLAM, C., QIN, B., MAXWELL, P. H. & ESTEBAN, M. A. 2014. The hypoxia-inducible factor renders cancer cells more sensitive to vitamin C-induced toxicity. *J Biol Chem*, 289, 3339-51.
- TSIVGOULIS, G., KATSANOS, A. H. & ALEXANDROV, A. V. 2014. Reperfusion therapies of acute ischemic stroke: potentials and failures. *Front Neurol*, 5, 215.
- VAN ASCH, C. J., LUITSE, M. J., RINKEL, G. J., VAN DER TWEEL, I., ALGRA, A. & KLIJN, C. J. 2010. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*, 9, 167-76.

- VANDEN BERGHE, T., KAISER, W. J., BERTRAND, M. J. & VANDENABEELE, P. 2015. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol*, 2, e975093.
- VANDEN BERGHE, T., LINKERMANN, A., JOUAN-LANHOUE, S., WALCZAK, H. & VANDENABEELE, P. 2014. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 135-47.
- VANDEN BERGHE, T., VANLANGENAKKER, N., PARTHOENS, E., DECKERS, W., DEVOS, M., FESTJENS, N., GUERIN, C. J., BRUNK, U. T., DECLERCQ, W. & VANDENABEELE, P. 2010. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ*, 17, 922-30.
- VANDENABEELE, P., RIQUET, F. & CAPPE, B. 2017. Necroptosis: (Last) Message in a Bubble. *Immunity*, 47, 1-3.
- WALLBERG, F., TENEV, T. & MEIER, P. 2016. Time-Lapse Imaging of Cell Death. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016, pdb prot087395.
- WANG, L., DU, F. & WANG, X. 2008. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133, 693-703.
- WANG, X., MORI, T., SUMII, T. & LO, E. H. 2002. Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: caspase activation and oxidative stress. *Stroke*, 33, 1882-8.
- WEBER, K., ROELANDT, R., BRUGGEMAN, I., ESTORNES, Y. & VANDENABEELE, P. 2018. Nuclear RIPK3 and MLKL contribute to cytosolic necrosome formation and necroptosis. *Commun Biol*, 1, 6.

- WULLNER, U., KORNUBER, J., WELLER, M., SCHULZ, J. B., LOSCHMANN, P. A., RIEDERER, P. & KLOCKGETHER, T. 1999. Cell death and apoptosis regulating proteins in Parkinson's disease--a cautionary note. *Acta Neuropathol*, 97, 408-12.
- XIA, Q., LI, X., ZHOU, H., ZHENG, L. & SHI, J. 2018. S100A11 protects against neuronal cell apoptosis induced by cerebral ischemia via inhibiting the nuclear translocation of annexin A1. *Cell Death Dis*, 9, 657.
- XU, Y., WANG, J., SONG, X., QU, L., WEI, R., HE, F., WANG, K. & LUO, B. 2016. RIP3 induces ischemic neuronal DNA degradation and programmed necrosis in rat via AIF. *Sci Rep*, 6, 29362.
- YAMANAKA, K., SAITO, Y., YAMAMORI, T., URANO, Y. & NOGUCHI, N. 2011. 24(S)-hydroxycholesterol induces neuronal cell death through necroptosis, a form of programmed necrosis. *J Biol Chem*, 286, 24666-73.
- YI, F., FRAZZETTE, N., CRUZ, A. C., KLEBANOFF, C. A. & SIEGEL, R. M. 2018. Beyond Cell Death: New Functions for TNF Family Cytokines in Autoimmunity and Tumor Immunotherapy. *Trends Mol Med*, 24, 642-653.
- YOON, S., BOGDANOV, K., KOVALENKO, A. & WALLACH, D. 2016. Necroptosis is preceded by nuclear translocation of the signaling proteins that induce it. *Cell Death Differ*, 23, 253-60.
- YOON, S., KOVALENKO, A., BOGDANOV, K. & WALLACH, D. 2017. MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation. *Immunity*, 47, 51-65 e7.
- YUAN, J. 2009. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis*, 14, 469-77.

- YUAN, J., AMIN, P. & OFENGEIM, D. 2019. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases. *Nat Rev Neurosci*, 20, 19-33.
- YUAN, J., CUI, G., LI, W., ZHANG, X., WANG, X., ZHENG, H., ZHANG, J., XIANG, S. & XIE, Z. 2016. Propofol Enhances Hemoglobin-Induced Cytotoxicity in Neurons. *Anesth Analg*, 122, 1024-30.
- YUN, J., MULLARKY, E., LU, C., BOSCH, K. N., KAVALIER, A., RIVERA, K., ROPER, J., CHIO, II, GIANNOPOULOU, E. G., RAGO, C., MULEY, A., ASARA, J. M., PAIK, J., ELEMENTO, O., CHEN, Z., PAPPIN, D. J., DOW, L. E., PAPADOPOULOS, N., GROSS, S. S. & CANTLEY, L. C. 2015. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*, 350, 1391-6.
- ZHANG, D., ZOU, X., SY, C., QIN, H., WANG, Y., LIAO, X. & LIU, L. 2014. Thrombolysis and reperfusion: advanced understanding of early management strategies in acute ischemic stroke. *Neurol Res*, 36, 391-6.
- ZHANG, D. W., SHAO, J., LIN, J., ZHANG, N., LU, B. J., LIN, S. C., DONG, M. Q. & HAN, J. 2009. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science*, 325, 332-6.
- ZHANG, S., WANG, Y., LI, D., WU, J., SI, W. & WU, Y. 2016. Necrostatin-1 Attenuates Inflammatory Response and Improves Cognitive Function in Chronic Ischemic Stroke Mice. *Medicines (Basel)*, 3.
- ZHANG, Y., CHEN, X., GUEYDAN, C. & HAN, J. 2018. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res*, 28, 9-21.
- ZHAO, Y., LI, X., GONG, J., LI, L., CHEN, L., ZHENG, L., CHEN, Z., SHI, J. & ZHANG, H. 2017. Annexin A1 nuclear translocation induces retinal ganglion

cell apoptosis after ischemia-reperfusion injury through the p65/IL-1beta pathway. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 1350-1358.

ZHAO, Y., WANG, J., JIANG, H., YU, Z., LI, X. & SHI, J. 2015. Following OGD/R, annexin 1 nuclear translocation and subsequent induction of apoptosis in neurons are assisted by myosin IIA in a TRPM7 kinase-dependent manner. *Mol Neurobiol*, 51, 729-42.

ZHU, C., WANG, X., XU, F., BAHR, B. A., SHIBATA, M., UCHIYAMA, Y., HAGBERG, H. & BLOMGREN, K. 2005. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ*, 12, 162-76.

ZHU, X., TAO, L., TEJIMA-MANDEVILLE, E., QIU, J., PARK, J., GARBER, K., ERICSSON, M., LO, E. H. & WHALEN, M. J. 2012. Plasmalemma permeability and necrotic cell death phenotypes after intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke*, 43, 524-31.