

ABORDAJE MULTIDISCIPLINAR DE LA VITAMINA E EN MODELOS MURINOS DE ENVEJECIMIENTO

TESIS DOCTORAL

Presentado por:

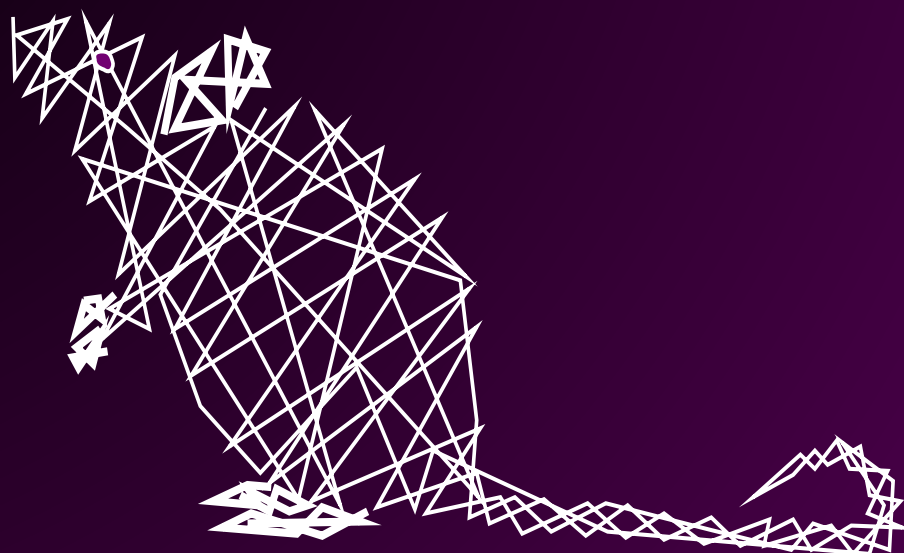
Noemí Villaseca González

Directores:

Dra. M^a del Mar Arroyo Jiménez

Dra. Virginia Rodríguez Robledo

Dr. Joaquín González Fuentes



UNIVERSIDAD DE
CASTILLA-LA MANCHA

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS
ALBACETE, 2020



Universidad de Castilla-La Mancha

Departamento de Ciencias Médicas

Facultad de Farmacia de Albacete

Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

TESIS DOCTORAL

**ABORDAJE MULTIDISCIPLINAR DE LA
VITAMINA E EN MODELOS MURINOS DE
ENVEJECIMIENTO**

Memoria para optar al Grado de Doctor

Presentada por:

Noemí Villaseca González

Directores:

Dra. María del Mar Arroyo Jiménez

Dra. Virginia Rodríguez Robledo

Dr. Joaquín González Fuentes

Albacete, 2020



La Dra. María del Mar Arroyo Jiménez, Catedrática de Universidad, y el Dr. Joaquín González Fuentes, Contratado Doctor, del Departamento de Ciencias Médicas y la Dra. Virginia Rodríguez Robledo, Profesora Titular, del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Abordaje multidisciplinar de la vitamina E en modelos murinos de envejecimiento” ha sido realizada bajo nuestra dirección y supervisión por Noemí Villaseca González en el Laboratorio de la Planta Piloto, en la Facultad de Farmacia de Albacete de la Universidad de Castilla-La Mancha.

Que consideramos que esta memoria reúne la calidad y el rigor científico para ser defendida en la Universidad de Castilla-La Mancha como requisito para que Noemí Villaseca González opte al Grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado:

Albacete, diciembre de 2020.

Fdo: Dra. María del
Mar Arroyo Jiménez

Fdo: Dr. Joaquín
González Fuentes

Fdo: Dra. Virginia
Rodríguez Robledo

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en la Facultad de Farmacia de Albacete y el Centro Regional de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM). Ha sido financiado por la Consejería de Cultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (PEII-2014-040-P), las ayudas para la financiación de actividades de Investigación dirigida a grupos de la UCLM y la EXCMA. Diputación de Albacete (DIPUAB17RODRIGUEZROBLEDO). La doctoranda Noemí Villaseca González fue contratada como personal con cargo a proyectos de I+D+i durante su primer año de Tesis (2015-2016). Durante el período 2016-2017, fue beneficiaria de tres becas de colaboración, dos de ellas provenientes de las Ayudas para la financiación de actividades de Investigación dirigidas a grupos de la UCLM y otra del proyecto CÁTEDRA ENRESA. En 2018 fue contratada como Profesora Asociada del área de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Farmacia. Desde diciembre del 2018 hasta la actualidad trabaja en el mismo área como Profesora Ayudante por el Plan Propio de Investigación, cofinanciadas por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) (2018/11744).

Agradecimientos

Todas las etapas de la vida son como una montaña rusa de emociones y sentimientos, la etapa de doctorando no se queda atrás. Por ello, quisiera agradecer a todas las personas que me han ayudado, tanto en lo profesional como en lo personal y que, de una forma u otra, han contribuido en la realización de este trabajo.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores de Tesis por su apoyo y confianza; por ayudarme y enseñarme a crecer como investigadora en áreas completamente diferentes. A Mar, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su paciencia cada vez que le abordo por los pasillos con cualquier tema y por hacer que la Anatomía sea más bonita. A Virginia, por redescubirme el mundo de LC-MS/MS, por sus consejos tanto en lo profesional como en lo personal y su aguante cuando algo no me entra en la cabeza. A Joaquín, por su confianza desde aquel Trabajo Fin de Grado con el que comenzó esta carrera de fondo, las conversaciones cafeteras y su templanza en mis momentos de obstinación.

Al grupo de investigación "Neurobiología celular y química molecular del Sistema Nervioso Central": Vicky, Manolo y Lucía, por su apoyo, ánimos y ayuda, sobretodo cuando les bombardeo con preguntas de las "nanos"; especialmente a Pilar, por su ayuda y apoyo en el mundo de la inmunohistoquímica. Y por supuesto a mis compañeros de Tesis y laboratorio, por los buenos momentos que hemos pasado, las bromas y el apoyo cuando creemos que todo es de color gris: María y Jorge. Y a los que brevemente han pasado por el laboratorio: Carmen y Begoña.

A la Facultad de Farmacia, no sólo por la realización de esta Tesis, sino por toda la enseñanza otorgada por su personal y por ser como una segunda casa. Especialmente a Antonio, por tu ayuda en el laboratorio y por ser un compañero más cuando en los inicios de la Bioincubadora teníamos una planta entera para cada uno; y a Mayte y Cris, por vuestro apoyo y consejo en los últimos meses.

A la Universidad de Castilla-La Mancha y a la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha por el apoyo económico recibido para la realización de este trabajo, especialmente al Dr. José Julián Garde.

A todo el personal del Área de Anatomía y Embriología Humana, especialmente al Dr. Ricardo Insausti, por el apoyo recibido; a Mercedes, por toda tu ayuda y consejos en el laboratorio; y a Isidro, porque siempre tienes palabras para repartir alegría.

También quiero agradecer el apoyo y los buenos momentos a mis compañeros de viaje durante la etapa del doctorado: Pedro, Rocío, Marta, Jesús y Fer.

No quiero olvidarme de mis amigos incondicionales, pues, aunque cada uno estemos en una punta del país, siempre me habéis dado vuestro apoyo y amistad. A María y Araceli, por ser amigas, compañeras y “novatas”. A Edu, por ser un pilar importante de la amistad en mi vida. A Mire, por ser mi mayor apoyo en mi breve etapa en Ciudad Real, y aún así convertirme en una imprescindible de mi círculo de amigos. A Mai, por estar ahí cuando lo he necesitado y por las conversaciones interminables. A Nadia, por tu amistad eterna, ya van 26 años ¡y los que nos quedan!

A Juande, porque, sin duda, tu apoyo incondicional ha sido fundamental para la elaboración de esta memoria. Gracias por aguantar mis peores momentos y no dejar que me rinda nunca; por aparecer en mi vida y por estar hoy a mi lado.

También quiero dedicar unas palabras para agradecer a toda mi familia el enorme apoyo para que esta Tesis haya sido posible, especialmente a mis hermanas y a mis padres. A mis hermanas, porque la vida es más entretenida cuando tienes alguien con quien compartir las primeras etapas de la vida, gracias por apoyarme en mis elecciones y en devolverme a la Tierra cuando mi imaginación se desboca. A mis padres, porque no importa la distancia, siempre estáis ahí, gracias por vuestro amor, paciencia y educación, aunque las palabras nunca son suficientes para aquellos que te han dado la vida.

Y aunque he tratado de hacer memoria y acordarme de todos, el tiempo pasa para todos y siempre hace de las suyas, así que gracias a aquellos que, por despiste, haya podido obviar.

“Lo importante es no tener arrugas en el cerebro”

Margarita Salas Falgeras
Bioquímica (1938-2019)

RESUMEN

El envejecimiento es un proceso multifactorial caracterizado por el deterioro progresivo de las capacidades estructurales y funcionales del organismo. Debido al aumento de la esperanza de vida de la población, ha crecido el interés por desarrollar estrategias encaminadas a contrarrestar o paliar el daño que tiene lugar a nivel molecular durante el envejecimiento. El cerebro es uno de los órganos más afectados por este proceso, su alta tasa metabólica y altos requerimientos energéticos, así como una capacidad de regeneración limitada, lo hacen especialmente sensible a lesiones que se agravan con el tiempo.

El abordaje nutricional de los problemas de salud es una de las estrategias más usadas hoy día. En este sentido, las vitaminas son compuestos esenciales para los seres vivos y, por tanto, unos niveles adecuados en la dieta son necesarios para el correcto funcionamiento del organismo. Las vitaminas E y C (VitE y VitC) son las más representativas entre las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, respectivamente. Ambas desempeñan numerosas funciones en el organismo que son imprescindibles para los seres vivos, como su efecto neuroprotector, y en este sentido la asociación entre envejecimiento y el papel antioxidante que desempeñan estas vitaminas es sobradamente conocida.

En la presente Tesis Doctoral se analiza en distintos modelos murinos de envejecimiento la distribución de los transportadores de estas vitaminas, además de varios aspectos relacionados con la determinación de α -tocoferol (α T), su administración mediante nanoemulsiones y su distribución en tejidos murinos.

El papel de la VitE como agente neuroprotector contra los efectos del envejecimiento cerebral es ampliamente conocido, sin embargo, su distribución específica dentro de las diferentes áreas cerebrales y poblaciones neuronales es aún una incógnita. Así pues, en este trabajo se abordó en primer lugar el análisis de la localización de los transportadores de VitE y VitC (α TTP y SVCT2, respectivamente) a diferentes edades en el cerebro de ratón. Para ello se usaron animales que presentaban diferente genotipo para la expresión de la polimerasa μ (cuya ausencia genera un modelo de envejecimiento retardado). La distribución de ambos transportadores presentó un patrón similar en muchas regiones del cerebro, aunque en algunas áreas el patrón de distribución resultaba complementario. Tanto

α TTP como SVCT2 se encontraron principalmente en neuronas, mientras que en la glía de Bergmann sólo detectamos inmunorreacción para α TTP.

El α T es el compuesto más bioactivo de la VitE, así pues, en la segunda parte de esta Tesis Doctoral se llevó a cabo el desarrollo de una metodología analítica basada en LC-ESI-MS/MS que fue optimizada y validada con el objetivo de realizar mediciones rápidas, precisas, exactas y sencillas en diferentes tipos de muestras. Este método nos permitió determinar, por un lado, la eficacia de encapsulación en diferentes tipos de nanoemulsiones que contenían α T y, por otro, cuantificar el α T presente en muestras biológicas de distintos modelos animales.

Las nanoemulsiones protegen a las moléculas activas que contienen del entorno fisiológico y facilitan su paso a través de membranas, especialmente en la vía oral. Por ello, una vez seleccionadas las nanoemulsiones de α T que presentaban mejores resultados *in vitro* se realizaron administraciones orales puntuales en ratones C57BL/6J (ratones sin patología ni modificación genética) para conocer la disponibilidad del α T en sangre y su distribución en tejidos. Los resultados indicaron que la nanoemulsión elevaba la concentración de α T en suero, plasma e hígado, pero no se encontraron diferencias en la concentración de α T en cerebro. Se realizaron administraciones de las mismas nanoemulsiones en ratones SAMP8 (un modelo de envejecimiento acelerado) y su control, SAMR1, para comprobar si los resultados obtenidos con la cepa C57BL/6J eran reproducibles en este modelo de envejecimiento acelerado. Los resultados mostraron que, tras la administración puntual, los niveles de α T en los ratones SAM eran mayores que los encontrados en el C57BL/6J en todas las muestras, salvo en el cerebro, donde la concentración de α T seguía sin presentar cambios significativos.

En general, estos estudios indican que, si bien la formulación y administración de α T mediante nanoemulsiones eleva los niveles de α T en sangre, la reposición o incremento de α T a nivel cerebral parece realizarse más lentamente. De modo que, quizás sea necesaria una administración prolongada en el tiempo para que los niveles de α T puedan incrementarse también a nivel cerebral y así poder entender mejor los mecanismos neuroprotectores que ejerce el α T en las poblaciones específicas de neuronas en la cuales se encuentra su transportador, el α TTP.

TABLA DE

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
LISTA DE ABREVIATURAS NEUROANATÓMICAS.....	6
INTRODUCCIÓN	15
1. Envejecimiento	17
1.1. Teorías del envejecimiento	18
1.2. Aspectos generales sobre el envejecimiento	21
1.3. Modelos animales utilizados en el estudio del envejecimiento.....	24
1.3.1. Neuroanatomía del cerebro de roedores	24
1.3.2. Modelo murino C57BL/6J.....	27
1.3.3. Modelo murino Pol μ	28
ADN polimerasas y ADN polimerasa μ	28
Ratón Knock-out para Pol μ	30
1.3.4. Modelo murino SAM.....	30
Ratón SAMP8 y SAMR1	31
1.4. Terapias antienvjecimiento	32
2. Vitamina E	34
2.1. Aspectos químicos y bioquímicos	34
2.2. Funciones biológicas de la VitE	36
2.3. VitE y α T: absorción, distribución, metabolismo y eliminación.....	38
Absorción intestinal.....	38
Transporte y distribución sistémica	40
Unión a proteínas intracelulares: relevancia de α TTP.....	42
Transportadores a nivel cerebral.....	43
Metabolismo hepático y excreción	46
Factores que afectan a la cinética y la biodisponibilidad.....	48
Inocuidad y toxicidad	49
2.4. Nuevas formas farmacéuticas de administración de α T	49
2.5. Determinación de α T mediante técnicas analíticas.....	52
2.5.1. Cromatografía Líquida: fundamentos teóricos e instrumentales.....	53
Modalidades de la Cromatografía Líquida.....	53
Preparación de muestras biológicas.....	54

Instrumentación de la cromatografía líquida de alto rendimiento	55
Acoplamiento LC-MS.....	57
2.5.2. Evolución y estado del arte.....	65
3. Vitamina C	67
3.1. Aspectos generales.....	67
3.2. Transportadores de VitC a nivel cerebral	70
4. VitE y VitC: acción sinérgica y controversia	72
OBJETIVOS.....	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
1. Modelos animales	81
1.1. Modelo murino C57BL/6J.....	81
1.2. Modelo murino de envejecimiento retardado Pol μ	81
1.3. Modelo murino de envejecimiento acelerado SAM	82
2. Diseño experimental.....	82
2.1. Análisis de la expresión de los transportadores α TTP y SVCT2 en el cerebro del modelo murino Pol μ	82
2.1.1. Genotipado de Pol μ	82
2.1.2. Perfusión intracardíaca	84
2.1.3. Procesamiento del tejido cerebral perfundido.....	84
2.1.4. Tinción de Nissl	85
2.1.5. Inmunohistoquímica	86
A. Inmunohistoquímica simple	86
B. Inmunohistoquímica doble.....	88
2.1.6. Análisis de las secciones y obtención de resultados.....	88
2.2. Instrumentación y metodología analítica usando LC-MS/MS.....	89
2.2.1. Equipo LC-MS/MS	89
2.2.2. Metodología LC-MS/MS propuesta	90
2.2.3. Eficacia de encapsulación de α T en nanoemulsiones	90
2.2.4. Determinación de α T administrado en plasma y suero	91
2.2.5. Tratamiento de muestras biológicas para la determinación de α T.....	91
A. Muestras de sangre: plasma y suero	91

B. Muestras de tejidos: hígado, cerebro y pulmón.....	93
2.3. Estudio cinético tras la administración de α T por vía oral.....	94
2.3.1. Formulación de las nanoemulsiones de α T.....	94
2.3.2. Administración y obtención de muestras en los modelos murinos C57BL/6J y SAM.....	94
3. Análisis estadístico.....	95
4. Reactivos y disoluciones.....	96
4.1. Reactivos y disolventes.....	96
4.2. Disoluciones.....	98
A. Tampones.....	98
B. Paraformaldehído (PFA) 4 %, PB 0.2 M pH 7.4.....	100
C. Líquido de recogida de secciones.....	100
D. Revelado con 4-cloro-naftol.....	101
E. DABCO.....	101
F. Disoluciones de α T y d6- α T.....	101
RESULTADOS.....	103
1. Distribución de αTTP y SVCT2 en el cerebro de Pol μ.....	105
1.1. Distribución regional del transportador de la VitE, α TTP.....	106
1.2. Distribución regional del transportador de la VitC, SVCT2.....	107
1.3. Colocalización de los trasportadores α TTP y SVCT2.....	108
1.4. Poblaciones celulares que expresan α TTP y/o SVCT2.....	115
2. Determinación de αT mediante LC-ESI-MS/MS.....	118
2.1. Optimización del método analítico.....	118
2.1.1. Parámetros cromatográficos (HPLC).....	118
2.1.2. Parámetros del ESI-MS/MS.....	121
2.2. Validación del método analítico propuesto.....	127
2.2.1. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad.....	128
2.2.2. Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ).....	129
2.2.3. Selectividad.....	130
2.2.4. Intervalo lineal y calibración.....	130
2.2.5. Exactitud.....	132

2.2.6. Optimización del pretratamiento de muestras biológicas para la determinación de α T.....	133
2.3. Aplicación del método LC-ESI-MS a formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas	135
2.3.1. Medida de la eficacia de encapsulación de α T en nanoemulsiones...	135
2.3.2. Determinación de α T en plasma y suero de ratones Pol μ	136
3. Administración oral de αT-NE en modelos animales.....	138
3.1. Cinética y distribución de α T en el modelo murino C57BL/6J	138
3.1.1. Niveles de α T en plasma.....	138
3.1.2. Niveles de α T en suero	140
3.1.3. Cálculo del área bajo la curva en muestras de plasma y suero.....	142
3.1.4. Niveles de α T en extractos de hígado	142
3.1.5. Niveles de α T en extractos de cerebro	144
3.1.6. Niveles de α T en extractos de pulmón	145
3.2. Administración puntual y cuantificación de α T en modelos murinos de envejecimiento: SAMP8 y SAMR1	145
3.2.1. Niveles de α T en plasma.....	146
3.2.2. Niveles de α T en extractos de hígado	147
3.2.3. Niveles de α T en extractos de cerebro	147
DISCUSIÓN	149
1. Estudio de la distribución de los transportadores αTTP y SVCT2 en cerebro murino	152
1.1. α TTP.....	153
1.2. SVCT2.....	156
1.3. α TTP/SVCT2.....	159
2. Determinación de αT mediante LC-ESI-MS/MS.....	161
2.1. Optimización del método analítico.....	161
2.2. Validación del método cromatográfico	164
2.2.1. Estudio sobre el tratamiento de tejidos biológicos	165
2.3. Aplicación del método propuesto en la determinación de α T en formas farmacéuticas y muestras biológicas	167
2.3.1. Eficacia de encapsulación de nanoemulsiones.....	167
2.3.2. Determinación de α T en muestras de plasma y suero murino.....	167

3. Administración oral de αT-NE	168
3.1. Determinación de α T en sangre del modelo murino C57BL/6J	171
3.2. Distribución de α T en tejidos del modelo murino C57BL/6J	173
3.3. Determinación de α T en el modelo murino SAM.....	174
 CONCLUSIONES.....	 179
 BIBLIOGRAFÍA	 183
 PUBLICACIONES	 221
 ANEXOS.....	 225
ANEXO 1: Terminología y parámetros cromatográficos.....	227
 LISTA DE FIGURAS	
Figura 1. Población mayor de 65 años en España entre 1900-2068.....	17
Figura 2. Regiones anatómicas del cerebro de ratón.....	25
Figura 3. Células del SNC.. ..	26
Figura 4. Fases del ciclo celular.	29
Figura 5. Estructuras que integran la VitE.	35
Figura 6. Absorción, distribución, metabolismo y excreción del α T.....	39
Figura 7. Transporte cerebral del α T.....	44
Figura 8. Esquema de los componentes de un sistema HPLC.....	56
Figura 9. Etapas y componentes del análisis con MS.....	59
Figura 10. Fuente de ionización por ESI.....	61
Figura 11. Esquema de un analizador de masas de cuadrupolo.....	63
Figura 12. Estructura de un MS de QqQ.....	64
Figura 13. Transportadores y reciclaje de la VitC en cerebro.....	71
Figura 14. Reciclaje de VitE y VitC en el organismo.	73

Figura 15. Desarrollo de la PCR para la determinación del genotipo de animales Pol μ .	83
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa.	84
Figura 17. Esquema de la disposición y almacenamiento de las series a partir de las secciones cerebrales obtenidas en el micrótopo de congelación.	85
Figura 18. Tinción de Nissl.	86
Figura 19. Tratamiento de plasma y suero a partir de una muestra de sangre.	92
Figura 20. Tratamiento de diferentes tejidos murinos.	93
Figura 21. Diseño del estudio.	95
Figura 22. Especificidad de los anticuerpos primarios frente a α TTP y SVCT2.	105
Figura 23. Microfotografías de IHQ frente a α TTP en el modelo Pol μ .	106
Figura 24. Microfotografía de la IHQ de SVCT2 en el modelo Pol μ .	108
Figura 25. Doble IHQ para α TTP y SVCT2.	112
Figura 26. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2.	113
Figura 27. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2.	113
Figura 28. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2.	114
Figura 29. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2.	114
Figura 30. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2.	114
Figura 31. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para α TTP y NeuN.	115
Figura 32. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para SVCT2 y NeuN.	116
Figura 33. Imágenes de microscopio confocal de IHQ para α TTP y GFAP.	117
Figura 34. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para SVCT2 y GFAP.	117

Figura 35. Influencia del volumen de inyección frente al área de pico relativa (RPA).	120
Figura 36. Espectro de masas de α T.....	122
Figura 37. Estructura del α T, el ion precursor y su ruta de fragmentación para la obtención de sus iones producto.	123
Figura 38. Estructura del d_6 - α T, el ion precursor y su ruta de fragmentación para la obtención de sus iones producto.	123
Figura 39. Influencia del flujo del gas sobre el área de pico relativa (RPA) del α T.	124
Figura 40. Influencia de la temperatura del gas en el área de pico relativa (RPA).	125
Figura 41. Influencia de la presión del nebulizador en el área de pico relativa (RPA).	126
Figura 42. Cromatograma de iones extraídos (EIC) de α T y d_6 - α T.	127
Figura 43. Cuantificación de α T en hígado (A) y cerebro (B) de ratón mediante los tres protocolos de aumento del volumen de los disolventes (AVD).	134
Figura 44. Cromatogramas extraídos de los iones cuantitativos de α T en hígado (A), cerebro (B) y pulmón (C) de ratón aplicando los tres protocolos de aumento del volumen de reconstitución (AVR).	135
Figura 45. Cuantificación de α T en plasma y suero de ratones Pol μ +/-.....	137
Figura 46. Perfil concentración-tiempo de α T en plasma.	139
Figura 47. Perfil concentración-tiempo de α T en suero.....	141
Figura 48. Perfil concentración-tiempo de α T en hígado.....	143
Figura 49. Comparación entre los niveles de α T en plasma de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1.....	146
Figura 50. Comparación entre los niveles de α T en hígado de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1.....	147

Figura 51. Comparación entre los niveles de α T en cerebro de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1.....148

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación de anticuerpos primarios y sus respectivos anticuerpos secundarios utilizados en las IHQ..... 96

Tabla 2. Reactivos empleados para la realización de la presente Tesis Doctoral. ... 98

Tabla 3. Disolventes empleados..... 98

Tabla 4. Distribución de la α TTP y SVCT2 en el cerebro de ratones con y sin expresión de Pol μ entre los 4 y 24 meses.....111

Tabla 5. Parámetros optimizados de la LC.....121

Tabla 6. Características de las transiciones de α T y d6- α T.....122

Tabla 7. Parámetros del acoplamiento de la fuente de electrospray con la espectrometría en tándem (ESI-MS/MS) optimizados.126

Tabla 8. Estudio de la presión del método analítico.....129

Tabla 9. Análisis del intervalo lineal.131

Tabla 10. Evaluación de la recuperación y la exactitud en plasma.132

Tabla 11. Estudio de la recuperación y la exactitud en suero.....133

Tabla 12. Esquema resumen de los protocolos de aumento del volumen de los disolventes (AVD) utilizados para procesar las muestras.....133

Tabla 13. Esquema resumen de los protocolos de aumento del volumen de reconstitución (AVR) utilizados para procesar las muestras.134

Tabla 14. Estudio de la eficacia de encapsulación.....136

Tabla 15. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en plasma.....140

Tabla 16. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en suero.....	142
Tabla 17. Área bajo la curva en el intervalo del tiempo de 0.75-24 h ($ABC_{0.75-24}$) de plasma y suero para todos los grupos.....	142
Tabla 18. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en hígado.....	144
Tabla 19. Niveles de αT en función del tiempo en cerebro.....	144
Tabla 20. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en cerebro.....	145
Tabla 21. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en plasma.....	146
Tabla 22. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en hígado.....	147
Tabla 23. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en cerebro.....	148

ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

α T	α -tocoferol
α T-NE	α -tocoferol nanoemulsionado
α TTP	Proteína de transferencia de α -tocoferol (<i>α-tocopherol transfer protein</i>)
β T	β -tocoferol
γ T	γ -tocoferol
δ T	δ -tocoferol
13'-COOH	13'-carboxicromanol
13'-OH	13'-hidroxicromanol
AA	Ácido ascórbico
ABC	Área bajo la curva
ABCA1	Transportador de cassette de unión a ATP A1 (<i>ATP-binding cassette transporter A1</i>)
APA	Área de pico absoluta
APCI	Ionización química por presión atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ApoE	Apolipoproteína E
ARNm	ARN mensajero
AVD	Aumento del volumen de los disolventes
AVED	Ataxia con deficiencia de vitamina E (<i>ataxia with vitamin E deficiency</i>)
AVR	Aumento del volumen de reconstitución
BHE	Barrera hematoencefálica
BHT	Butilhidroxitolueno
CD36	Glicoproteína determinante de grupo 36 (<i>cluster of differentiation 36</i>)
CEHC	Carboxietilhidroxicromanoles
CETP	Proteína de transferencia de colesterol éster (<i>cholesterol ester transfer protein</i>)
d6- α T	Fenil-5,7-dimetil-d6- α -tocoferol
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano

ABREVIATURAS

DAD	Detector de diodos (<i>diode array detection</i>)
DHA	Ácido dehidroascórbico (<i>dehydroascorbic acid</i>)
DSBs	Rotura de doble cadena de ADN (<i>double-strand break</i>)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EM	Efecto matriz
ESI	Electrospray (<i>electrospray ionization</i>)
EtOH	Etanol
GC	Grupo control
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GLUT1- GLUT3	Transportadores de glucosa (<i>glucose transporter</i>) tipo 1 y 3
GNE	Grupo de α -tocoferol nanoemulsionado
GnNE	Grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado
HDL	Lipoproteínas de alta densidad (<i>high density lipoprotein</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IHQ	Inmunohistoquímica
IPA	Isopropanol
IR	Inmunorreactividad
IS	Patrón interno (<i>internal standard</i>)
KO	<i>knock-out</i>
LC	Cromatografía líquida (<i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas en tándem
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad
LOD	Límite de detección (<i>limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>limit of quantitation</i>)
LPL	Lipoproteína lipasa
LRP1	Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>)

m/z	Relación masa/carga
MDR1/3	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 y 3 (<i>multidrug resistance protein 1 and 3</i>)
MRM	Seguimiento de reacciones múltiples (<i>multiple reaction monitoring</i>)
MS	Espectrometría/espectrómetro de masas (<i>mass spectrometry</i>)
NaCl	Cloruro sódico
NeuN	Núcleos neuronales (<i>neuronal nuclei</i>)
NHEJ	Unión final no homóloga (<i>non-homologous end-joining</i>)
NPC1L1	Proteína 1 similar a C1 de Niemann-Pick (<i>Niemann-Pick C1-like protein-1</i>)
PB	Tampón fosfato (<i>phosphate buffer</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehído
PLTP	Proteína de transferencia de fosfolípidos plasmáticos (<i>phospholipid transfer protein</i>)
Pol μ	Polimerasa μ
QC	Control de calidad (<i>quality control</i>)
QqQ	Triple cuadrupolo
r	Coefficiente de correlación lineal
r^2	Coefficiente de determinación
ROS	Especies reactivas del oxígeno (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	Área de pico relativa (<i>relative peak area</i>)
RSD	Desviación estándar relativa (<i>relative standard deviation</i>)
S/N	Relación señal/ruido (<i>signal/noise</i>)
SAM	Ratón de senescencia acelerada (<i>senescence accelerated mouse</i>)
SAMP	Ratón propenso a la senescencia acelerada (<i>senescence accelerated mouse prone</i>)
SAMR	Ratón resistente a la senescencia acelerada (<i>senescence accelerated mouse resistant</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>standard error of mean</i>)

ABREVIATURAS

SNC	Sistema nervioso central
SR-B1	Receptor de barrido clase B tipo 1 (<i>scavenger receptor class B type 1</i>)
SVCT1-SVCT2	Transportador de vitamina C dependiente de sodio 1 y 2 (<i>sodium-dependent vitamin C transporter</i>)
TBS	Tampón tris salino (<i>tris buffered saline</i>)
TdT	Terminal desoxinucleotidil trasnsferasa
t _R	Tiempo de retención
UCLM	Universidad de Castilla-La Mancha
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visible
VitC	Vitamina C
VitE	Vitamina E
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad (<i>very low density lipoprotein</i>)
WT	<i>Wild-type</i>

LISTA DE ABREVIATURAS NEUROANATÓMICAS

3n	Nervio oculomotor
3V	Tercer ventrículo
4V	Cuarto ventrículo
7N	Núcleo del nervio facial
7n	Nervio facial
8vn	Nervio vestibular
A5	Grupo 5 de células noradrenérgicas
AAA	Área amigdalina anterior
AcbSh	Núcleo accumbens, corteza
AcN	Núcleo accumbens
ACo	Área amigdalina cortical anterior
AHiAL	Área amigdalohipocámpica, porción anterolateral
AID	Corteza insular agranular, porción dorsal
AIV	Corteza insular agranular, porción ventral
AM	Núcleo anteromedial del tálamo
AMV	Núcleo anteromedial del tálamo, porción ventral

AngT	Núcleo angular del tálamo
AOB	Bulbo olfativo accesorio
Aq	Acueducto
Au1	Corteza auditiva primaria
AuC	Corteza auditiva
AuD	Corteza auditiva secundaria, área dorsal
AuV	Corteza auditiva secundaria, área ventral
AVTN	Núcleo anteroventral del tálamo
BIC	Núcleo del brazo del colículo inferior
BL	Núcleo amigdalino basolateral
BLP	Núcleo amigdalino basolateral, porción posterior
BLV	Núcleo amigdalino basolateral, porción ventral
BM	Núcleo amigdalino basomedial
BMA	Núcleo amigdalino basomedial, porción anterior
BMP	Núcleo amigdalino basomedial, porción posterior
CA1	Campo amónico CA1 del hipocampo
CA2	Campo amónico CA2 del hipocampo
CA3	Campo amónico CA3 del hipocampo
Ce	Núcleo amigdalino cental
CeC	Núcleo amigdalino central, porción capsular
CeM	Núcleo amigdalino central, división media
CEnt	Corteza entorrinal caudomedial
Cg	Corteza cingular
Cg1	Corteza cingular, área 1
Cg2	Corteza cingular, área 2
CIC	Núcleo central del colículo inferior
CL	Núcleo centrolateral del tálamo
CoP	Capa de células de Purkinje del cerebelo
cp	Pedúculo cerebral
CPu	Caudado putamen (estriado)
D3V	Tercer ventrículo dorsal
DC	Núcleo coclear dorsal
df	Fórnix dorsal

ABREVIATURAS

DG	Giro dentado
DI	Corteza insular disgranular
DLEnt	Corteza entorrinal dorsolateral
DLG	Núcleo geniculado dorsal lateral
DLL	Núcleo dorsal del lemnisco lateral
DLPAG	Sustancia gris periacueductal dorsolateral
DMPAG	Sustancia gris periacueductal dorsomedial
DpG	Capa gris profunda del colículo superior
DS	Subículo dorsal
DTg	Núcleo tegmental dorsal
DTT	Tenia tecta dorsal
EC	Corteza entorrinal
ECIC	Corteza externa del colículo inferior
EP	Núcleo entopeduncular
Epl	Capa plexiforme externa del bulbo olfativo
f	Fórnix
fmj	Cuerpo caloso, brazo mayor
fr	Fascículo retroflejo
FrA	Corteza frontal asociativa
GI	Corteza insular granular
Gl	Capa glomerular del bulbo olfatorio
gl	Estrato granuloso
GP	Globo pálido
GrO	Capa de células de gránulos del bulbo olfativo
Hip	Hipocampo
IC	Corteza insular
ILL	Núcleo intermedio del lemnisco lateral
IMD	Núcleo intermediodorsal del tálamo
InG	Capa gris intermedia del colículo superior
InWH	Capa blanca intermedia del colículo superior
IP	Núcleo interpeduncular
Ipl	Núcleo interpeduncular, subnúcleo intermedio
IRt	Núcleo reticular intermedio

La	Núcleo amigdalino lateral
LAcSh	Corteza lateral del núcleo accumbens
LaDL	Núcleo amigdalino lateral, porción dorsolateral
LaVL	Núcleo amigdalino lateral, porción ventrolateral
LaVM	Núcleo amigdalino lateral, porción ventromedial
LD	Núcleo laterodorsal del tálamo
LDDM	Núcleo anterodorsal del tálamo, porción dorsomedial
LDVL	Núcleo laterodorsal del tálamo, porción ventrolateral
LHb	Núcleo lateral de la habénula
ll	Lemnisco lateral
LO	Lateral orbital cortex
LPAG	Sustancia gris periacueductal lateral
LPLC	Núcleo lateral posterior del tálamo, porción laterocaudal
LPLR	Núcleo lateral posterior del tálamo, porción laterocaudal
LPMC	Núcleo lateral posterior del tálamo, porción laterocaudal
LPMR	Núcleo lateral posterior del tálamo, porción mediorrostral
LPT	Núcleo posterolateral del tálamo
LR4V	Receso lateral del cuarto ventrículo
LSD	Núcleo septal lateral, porción dorsal
LSN	Núcleo septal lateral
LSV	Núcleo septal lateral, porción ventral
LV	Ventrículo lateral
LVe	Núcleo vestibular lateral
M1	Corteza motora primaria
M2	Corteza motora secundaria
m5	Raíz motora del nervio trigémino
MC	Corteza motora
MDC	Núcleo mediodorsal del tálamo, porción central
MDL	Núcleo mediodorsal del tálamo, porción lateral
MDM	Núcleo mediodorsal del tálamo, porción medial
Me5	Núcleo trigémino del mesencéfalo
MEnt	Corteza entorrinal medial
mf	Fibras musgosas

ABREVIATURAS

MHb	Núcleo medial de la habénula
Mi	Capa de células mitrales del bulbo olfativo
ml	Estrato molecular
MoDG	Capa molecular del giro dentado
MPA	Área preóptica medial
MPO	Núcleo preóptico medial
MVeMC	Núcleo vestibular medio, porción magnocelular
MVePC	Núcleo vestibular medio, porción parvicelular
MVPO	Núcleo periolival medioventral
ns	Tracto nigroestriatal
OB	Bulbo olfatorio
OC	Corteza orbital
P7	Zona perifacial
Pa4	Núcleo paratroclear
PAG	Sustancia gris periacueductal
PaS	Parasubículo
PC	Núcleo paracentral del tálamo
PCRtA	Núcleo parvicelular reticular, parte alfa
PG	Núcleo pregeniculado
PGMC	Núcleo pregeniculado, porción magnocelular
PGPC	Núcleo pregeniculado, porción parvicelular
Pir	Corteza piriforme
pl	Capa polimórfica
PMCo	Área amigdalina cortical porteriomedial
Pn	Núcleo pontino
PnC	Núcleo reticular pontino, porción caudal
PnO	Núcleo reticular pontino, parte oral
Po	Grupo nuclear posterior del tálamo
PoRh	Corteza postrinal
Post	Postsubículo
PrCnF	Área precuneiforme
PrL	Corteza prelímbica
PrS	Presubículo

PV	Núcleo paraventricular
py	Tracto piramidal
pyr	Estrato piramidal
R	Núcleo rojo
RMC	Núcleo rojo, porción magnocelular
RPC	Núcleo rojo, porción parvicelular
RSC	Corteza retrosplenial
RSDC	Corteza disgranular retrosplenial
RSGa	Corteza retrosplenial granular, región a
RSGb	Corteza retrosplenial granular, región b
RSGc	Corteza retrosplenial granular, región c
Rt	Núcleo reticular (pretálamo)
RtTg	Núcleo reticulotegmental del puente
RtTgP	Núcleo reticulotegmental del puente, porción pericentral
S1	Corteza somatosensorial primaria
S1BF	Corteza somatosensorial primaria, barrel fields
S1FL	Corteza somatosensorial primaria, región de las extremidades superiores
S1HL	Corteza somatosensorial primaria, región de las extremidades posteriores
S1J	Corteza somatosensorial primaria, región de la mandíbula
S1Sh	Corteza somatosensorial primaria, región del hombro
S1Tr	Corteza somatosensorial primaria, región del tronco
S1ULp	Corteza somatosensorial primaria, región del labio superior
Sag	Núcleo sagulum
SC	Corteza somatosensorial
sl	Estrato lúcido
slm	Estrato lacunoso-molecular
SN	Sustancia negra
SNCc	Sustancia negra, porción compacta
SNCd	Sustancia negra, porción compacta, nivel dorsal
SNL	Sustancia negra, porción lateral
SNR	Sustancia negra, porción reticular

ABREVIATURAS

so	Estrato oriens
Sp	Núcleo espinal del trigémino
sp5	Tracto espinal del trigémino
Sp5C	Núcleo espinal del trigémino, porción caudal
Sp5I	Núcleo espinal del trigémino, porción interpolar
Sp5O	Núcleo espinal del trigémino, parte oral
SPO	Núcleo paraolivar superior
SpVe	Núcleo vestibular espinal
sr	Estrato radiado
st	Estría terminal
StHy	Núcleo estriohipotalámico
STLD	Núcleo de la base de la estría terminal, división lateral, porción dorsal
tfp	Fibras transversales de la protuberancia
Tu	Tuberculo olfatorio
Tz	Núcleo del cuerpo trapezoide
tz	Cuerpo trapezoide
Tz	Núcleo del cuerpo trapezoide
V1	Corteza visual primaria
V1B	Corteza visual primaria, área binocular
V1M	Corteza visual primaria, área monocular
V2L	Corteza visual secundaria, área lateral
V2ML	Corteza visual secundaria, área mediolateral
V2MM	Corteza visual secundaria, área mediomedial
VC	Corteza visual
Ve	Núcleo vestibular
VIEnt	Corteza entorrinal intermedia ventral
VL	Núcleo ventrolateral del tálamo
VLL	Núcleo ventral de lemnisco lateral
VL PAG	Sustancia gris periacueductal ventrolateral
VLPO	Núcleo preóptico ventrolateral
VO	Corteza orbital ventral
VP	Pálido ventral
VPM	Núcleo ventral posteromedial del tálamo

VS	Subículo ventral
VTT	Tenia tecta ventral
ZI	Zona incierta
ZIC	Zona incierta, porción caudal
ZID	Zona incierta, porción dorsal
ZIV	Zona incierta, porción ventral

INTRODUCCIÓN

1. Envejecimiento

El envejecimiento normal se podría definir como un proceso en el que tiene lugar la pérdida gradual de las funciones fisiológicas como consecuencia de la acumulación, con el paso del tiempo, de alteraciones o cambios a nivel morfológico y metabólico, lo que implica una disminución de la capacidad de respuesta frente a dichos cambios (Carmona & Michan, 2016; Sen *et al.*, 2016; Cardelli, 2018).

En los últimos años, la población mundial ha experimentado un aumento considerable de la esperanza de vida, lo que ha llevado al envejecimiento de la población y al aumento de la incidencia de enfermedades crónicas en el grupo de edad avanzada (Christensen *et al.*, 2009). Además, se ha observado un aumento de la multimorbilidad con la edad (coexistencia de dos o más enfermedades crónicas) en un mismo individuo (Marengoni *et al.*, 2011; Prados-Torres *et al.*, 2017). Por ello, el gasto en asistencia médica y los problemas económicos asociados al envejecimiento de la población (como el retraso en la edad de jubilación y el número de pensionistas) se ha incrementado (Balasubramanian *et al.*, 2017; McCormick & Promislow, 2018).

En España, según un informe sobre el perfil de las personas mayores, aunque entre 1900 y 1960 había cierta tendencia de ascenso, a partir de 1970 el incremento en el número de personas mayores de 65 años se hizo mucho más patente (Figura 1) (Pérez Díaz *et al.*, 2020). Estos datos evidencian una situación que se está produciendo de forma generalizada en la mayoría de los países desarrollados.

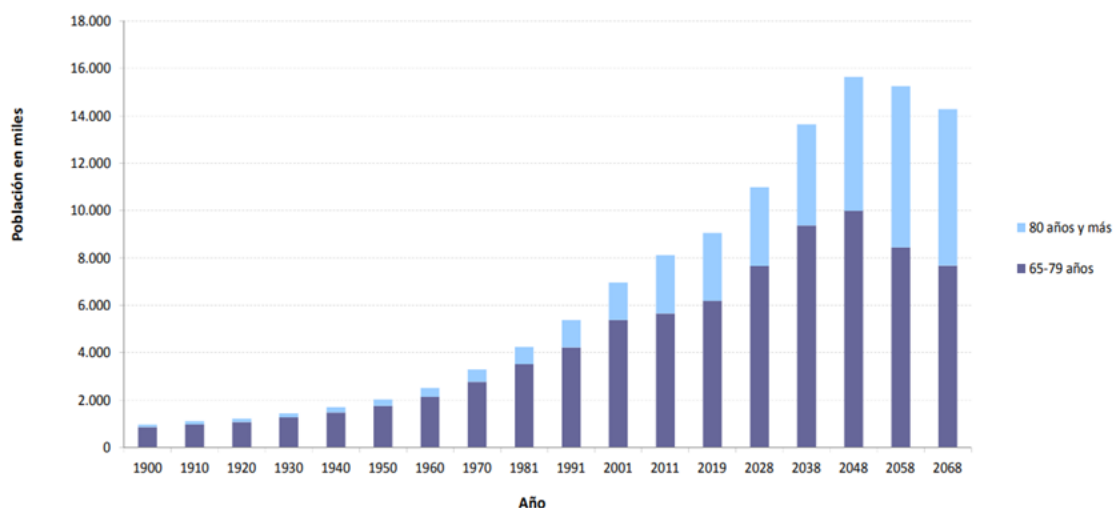


Figura 1. Población mayor de 65 años en España entre 1900-2068. Los datos entre 1900-2018 son reales, mientras que el resto son proyecciones. El gráfico fue tomado de (Pérez Díaz *et al.*, 2020) y los datos se obtuvieron del Instituto Nacional de Estadística.

El gran impacto que está generando el envejecimiento en la población, lo ha convertido en el foco de muchos estudios, no sólo para conocer las bases fisiológicas en las que se asienta, sino también para tratar de mejorar la calidad de vida de las personas que se ven afectadas por múltiples enfermedades asociadas a la edad. Este ha sido el objetivo de muchas terapias encaminadas a retrasar o paliar los efectos del envejecimiento en la salud, y ponen de relieve la importancia de conocer los cambios que se producen durante el mismo.

1.1. Teorías del envejecimiento

Para dar respuesta a cuáles son las causas del envejecimiento se han llegado a formular más de 300 teorías, sin que ello suponga un impedimento para seguir desarrollando más (Medvedev, 1990). Se han propuesto diversas formas de clasificar y agrupar las teorías del envejecimiento, la más generalizada es la división entre las teorías estocásticas y las no estocásticas o programadas, que, a su vez, agrupan numerosas teorías (Trevisan *et al.*, 2019) de las cuales sólo se comentarán las más relevantes.

Según las **teorías estocásticas**, el envejecimiento se produce como consecuencia de la acumulación de alteraciones o cambios aleatorios del funcionamiento normal del organismo a lo largo del tiempo y el fracaso de los sistemas de reparación para corregir el daño producido por estos cambios (Lipsky & King, 2015). Entre las teorías estocásticas se encuentran:

- **Teoría de la mutación somática:** se basa principalmente en que la radiación provoca daños semejantes a los que se observan en el envejecimiento, y dado que se sabe que produce mutaciones, se propuso que el envejecimiento se produce por una exposición a radiaciones ambientales de fondo que provocan daños en el ADN (Failla, 1958; Szilard, 1959; Vijg, 2000).
- **Teoría de la reparación del ADN:** muy relacionada con la teoría anterior, apunta que la reparación ineficaz del ADN, a consecuencia de una alteración errónea, provoca el envejecimiento, aunque aparentemente no existe una relación clara entre la edad y la capacidad de reparación del ADN (Hart & Setlow, 1974; Troen, 2003).

- **Teoría del error-catástrofe:** propuesta por Orgel, L. E. en 1963, plantea que los errores aleatorios en las proteínas que participan en la síntesis del ADN, generan en última instancia moléculas aberrantes que provocarían una catástrofe de errores incompatible con la vida (Orgel, 1963).
- **Teoría de la modificación de proteínas:** apunta que las modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, la ruptura de enlaces o los enlaces cruzados, pueden provocar daños en la función celular (Trevisan *et al.*, 2019).
- **Teoría del envejecimiento basada en los radicales libres y la radiación química:** postulada por Harman, D. en 1956, argumenta que el daño infligido por los radicales libres en las células es la causa del envejecimiento (Harman, 1956). Los radicales libres son especies en las que uno o más electrones se encuentran desapareados, lo que confiere una alta reactividad a la molécula (Burton & Jauniaux, 2011). En los sistemas biológicos los más habituales son las especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), producidas durante el metabolismo aeróbico. Estos provocan daños en el organismo cuando las defensas antioxidantes (sistemas enzimáticos y no enzimáticos que neutralizan estas especies) son ineficaces, este proceso es lo que se conoce como estrés o daño oxidativo (Burton & Jauniaux, 2011). En el organismo encontramos sistemas enzimáticos de defensa frente a los radicales libres, de los cuales los más conocidos son la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión transferasa, entre otras. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen moléculas de bajo peso molecular como las vitaminas, el β -caroteno o el ácido úrico, entre otros (Birben *et al.*, 2012).
- **Teoría del ADN mitocondrial:** las alteraciones del ADN mitocondrial conducen a un daño y muerte celular debido a errores durante la fosforilación oxidativa y a un aumento de la producción de radicales libres (Johnson *et al.*, 1999).

En cambio, las **teorías no estocásticas o programadas** exponen que el envejecimiento tiene lugar debido a que genéticamente los seres vivos están

programados para alcanzar la vejez como consecuencia última del desarrollo del organismo (Lipsky & King, 2015). Algunas de las teorías más destacadas son:

- **Teoría del envejecimiento celular o la senescencia programada:** introducida por primera vez por Hayflick, L. en 1965, se basa en que la capacidad de proliferación de las células está limitada a un número finito de divisiones, que se conoce como límite de Hayflick, y está relacionada con la teoría de los telómeros (Hayflick, 1965; Groten *et al.*, 2018; Herranz & Gil, 2018).
- **Teoría de los telómeros:** los telómeros son secuencias de ADN repetidas que se localizan en los extremos de los cromosomas y dan protección al ADN frente a la degradación. Sin embargo, durante la replicación del ADN, en cada división celular, se pierde una parte de la secuencia final que resulta en el acortamiento de los telómeros que únicamente se pueden alargar por acción de la telomerasa (Sergiev *et al.*, 2015). Por ello, el acortamiento de los telómeros se asoció como una causa del envejecimiento celular (Harley *et al.*, 1990).
- **Teoría de la mutagénesis intrínseca:** propuesta por Burnet, M. en 1974, en ella se mezclan conceptos de las teorías estocásticas y no estocásticas, y mantiene que cada especie posee un código genético que regula la fidelidad de su material genético y su replicación, es decir, la generación de mutaciones, y, en consecuencia, el tiempo de vida, dependen del grado de fidelidad (Cristofalo *et al.*, 1994).
- **Epigenética:** se define como la alteración en la expresión de genes, sin que se produzca ningún cambio en la secuencia del ADN, mediante mecanismos de modulación génica (como es el caso de la metilación o la modificación de histonas), debido a factores internos y externos que pueden estar relacionados, o no, con el envejecimiento (Goto, 2015).
- **Teoría neuroendocrina:** se basa en que el eje hipotalámico-pituitaria-suprarrenal ejerce el papel de regulador del envejecimiento en el organismo, y, por tanto, los daños en la señalización de este eje afectan a las neuronas y a las hormonas implicadas (Weinert & Timiras, 2003; da Costa *et al.*, 2016).

- **Teoría inmunológica:** postulada por Waldorf, R. en 1969 planteaba el hecho de que el envejecimiento estaría relacionado con una pérdida de la capacidad de respuesta del sistema inmune que se produce a lo largo de la edad, acompañado, además, por un mayor número de procesos autoinmunes (Effros, 2005).

El elevado número de teorías que tratan de dar una explicación al envejecimiento demuestran el fuerte carácter multifactorial del proceso. Es por ello por lo que se ha abandonado la búsqueda de una única explicación en favor de la integración de varias teorías, ya que muchas de ellas se encuentran relacionadas y pueden llegar a ser complementarias.

1.2. Aspectos generales sobre el envejecimiento

Uno de los conceptos a tener en cuenta cuando se habla de envejecimiento es la diferencia entre envejecimiento normal y patológico. Mientras que, el envejecimiento patológico implica la aparición de enfermedades como producto de la herencia o del estilo de vida, en el envejecimiento normal la aparición de enfermedades es consecuencia directa de la edad avanzada, es el caso por ejemplo de las cataratas (Anton *et al.*, 2005). Durante el envejecimiento normal se producen cambios que no necesariamente suponen un daño para el organismo (como las arrugas o las canas), por ello, se ha utilizado el término senescencia como expresión más precisa para describir el declive progresivo de las funciones fisiológicas que se producen en el envejecimiento normal (da Costa *et al.*, 2016). Aun así, establecer la línea a partir de la cual el envejecimiento normal se comienza a considerar patológico puede ser realmente complicado.

En los mamíferos se han observado una serie de características comunes del envejecimiento: aumento de la mortalidad, alteración de la composición bioquímica de los tejidos (aumento del tejido adiposo, alteración postraducional de proteínas, entre otras), disminución de las funciones fisiológicas (como la filtración glomerular y la frecuencia cardíaca), disminución en la capacidad para mantener la homeostasis y mayor vulnerabilidad a las enfermedades (Cristofalo *et al.*, 1994; Troen, 2003).

El cerebro es un órgano sumamente sensible a todos los procesos que tienen lugar como consecuencia del envejecimiento, y experimenta alteraciones estructurales y funcionales importantes debido al paso del tiempo (Liu *et al.*, 2017).

Es uno de los órganos con mayores requerimientos energéticos, y en su metabolismo se necesitan cantidades de oxígeno inspirado elevadas, que pueden dar lugar a la formación de radicales libres (ROS). Esto, junto con el deterioro de los sistemas de defensa naturales, provoca que como consecuencia del envejecimiento, y a pesar de su plasticidad, se produzcan daños en diferentes regiones y componentes celulares (daño oxidativo) (Erickson, 2003; Magistretti, 2006).

Una de las principales alteraciones que se producen en el envejecimiento, tanto normal como patológico, es el deterioro cognitivo. Aunque existe cierta controversia a la hora de clasificar las variables cognitivas, una de las más comunes es la distinción entre *habilidades/capacidades cristalizadas*: destreza, hábito y conocimientos establecidos desde hace mucho tiempo, que aparentemente se mantienen; y *fluidas*: resolución de problemas, razonamiento, capacidad de aprender y procesar información, memoria y capacidad psicomotora, que parecen disminuir con la edad (Salthouse, 2010; Brown, 2016). Con el paso del tiempo, la velocidad de procesamiento a la hora de realizar tareas cognitivas, desempeñar una respuesta motora o reaccionar frente a un estímulo, se ve claramente deteriorada (Eckert, 2011). Aunque el lenguaje se mantiene aparentemente estable, al estar íntimamente relacionado con otras habilidades (como las motoras y la velocidad de procesamiento), con el tiempo, se observa cierta disminución en la fluidez verbal (Schonknecht *et al.*, 2005). De igual forma, el procesamiento visual (reconocimiento de rostros y objetos familiares) y del espacio también puede verse deteriorado como consecuencia del envejecimiento cerebral, lo cual implica la activación de otras redes corticales para compensar las áreas deficientes (Grady *et al.*, 1994).

La memoria, proceso por el que el conocimiento es codificado, almacenado y posteriormente recuperado, es una de las grandes afectadas por el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Existen dos tipos principales de memoria: la declarativa, “*capacidad para el recuerdo consciente de hechos y eventos*”, y la no declarativa, “*conjunto heterogéneo de capacidades no conscientes de aprendizaje y memoria que se expresan a través de la ejecución y no permite acceso a ningún contenido de la memoria consciente*” (Squire & Zola, 1996). La primera incluye la memoria semántica (lenguaje y conocimiento práctico) y la episódica (eventos experimentados), mientras que la no declarativa engloba por ejemplo la memoria

de procedimiento (habilidades motoras y cognitivas). La más afectada por la edad es la memoria declarativa, la no declarativa se mantiene relativamente estable en individuos sanos (Harada *et al.*, 2013).

Entre los cambios estructurales que se producen en el sistema nervioso central (SNC) se ha observado una disminución del volumen de sustancia gris, debido no sólo a la posible muerte neuronal, sino en gran medida a la disminución de las conexiones neuronales y la densidad sináptica, que afecta en gran medida al lóbulo frontal y temporal (lo que implica también una disminución en el hipocampo) (Cefalu, 2011; Harada *et al.*, 2013). En cuanto a la sustancia blanca, la pérdida de volumen es más acusada que en la sustancia gris, particularmente en las áreas frontales, y se ha asociado con una disminución de la integridad de los tractos nerviosos, lo que disminuye la eficacia de la transmisión de información (Park & Reuter-Lorenz, 2009). Estas alteraciones, cuando afectan a las conexiones que conectan la corteza prefrontal con estructuras como el hipocampo y el cuerpo estriado, se traduce en un deterioro en tareas en las que están implicadas la velocidad de procesamiento y la memoria (Camandola & Mattson, 2017).

Una de las enfermedades neurodegenerativas más conocidas y asociadas al envejecimiento humano es la enfermedad de Alzheimer. En la que se observa principalmente un declive en la memoria, debido a la neurodegeneración de determinadas áreas cerebrales, que implica la pérdida sináptica y neuronal, así como la formación de placas β -amiloides y ovillos neurofibrilares en el tejido cerebral (Lane *et al.*, 2018). Se ha relacionado con la disfunción mitocondrial y con el estrés oxidativo (Fransen *et al.*, 2013; Cheon *et al.*, 2019), así como con la mutación en los genes de algunas proteínas y de las vías inflamatorias (Lane *et al.*, 2018).

La enfermedad de Parkinson es otra de las grandes enfermedades neurológicas relacionadas con el envejecimiento. Está caracterizada fundamentalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y por la presencia de los cuerpos de Lewy (que contienen α -sinucleína). Aunque la clínica del Parkinson es muy amplia, su característica más conocida es el trastorno del movimiento que la caracterizó inicialmente (temblor, rigidez y una ralentización del movimiento) (Tysnes & Storstein, 2017). De forma similar al

Alzheimer, el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción mitocondrial podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Fransen *et al.*, 2013). También se ha relacionado con las mutaciones genéticas y el deterioro en los sistemas de reparación del ADN (Cheon *et al.*, 2019).

1.3. Modelos animales utilizados en el estudio del envejecimiento

Los modelos animales de envejecimiento se han utilizado ampliamente para comprender los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en el proceso del envejecimiento y poder desarrollar, a partir de ello, estrategias o tratamientos encaminados a paliar el daño asociado a la edad.

Uno de los requisitos que debemos tener en cuenta a la hora de seleccionar el modelo animal para realizar los estudios deseados, es el grado de similitud entre los mecanismos evaluados en el animal con respecto a los que se producen en el ser humano. Debido al carácter multifactorial del envejecimiento, los procesos implicados son de muy distinta índole, lo que complica la elección de un único modelo animal, es decir, no existe ningún modelo animal que sea capaz de mimetizar todos los factores relacionados con el envejecimiento. Además, la esperanza de vida difiere enormemente entre las diferentes especies empleadas en este tipo de estudios, y aunque, aparentemente, por similitud, se podrían escoger especies con esperanza de vida larga, en la práctica el uso de especies cuya vida es relativamente corta permite desarrollar los estudios en períodos de tiempo relativamente cortos.

A pesar de la contribución de los estudios realizados en animales no vertebrados, como la levadura, la mosca o los gusanos, los roedores siguen siendo la especie de elección en la mayoría de los estudios sobre envejecimiento o sobre las enfermedades relacionadas con este (Singh *et al.*, 2019). Más allá de razones económicas o de manejo de esta especie, estos animales poseen genomas definidos, con estudios y bases de datos publicadas, así como fenotipos estables (Koks *et al.*, 2016).

1.3.1. Neuroanatomía del cerebro de roedores

El uso de animales de experimentación en la ciencia para poder llevar a cabo estudios que nos proporcionen información acerca de determinados aspectos de la biología, supone conocer las diferencias macroscópicas y microscópicas del tema de

interés. En este sentido, dado el modelo animal empleado en la presente Tesis Doctoral, y la relevancia del envejecimiento en el cerebro, es necesario conocer las principales regiones neuroanatómicas en roedores.

El encéfalo se encuentra formado por el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo (Figura 2). Macroscópicamente, una de las principales diferencias entre el cerebro humano y el de roedor, es la ausencia de circunvoluciones y el gran tamaño del bulbo olfatorio en los roedores.

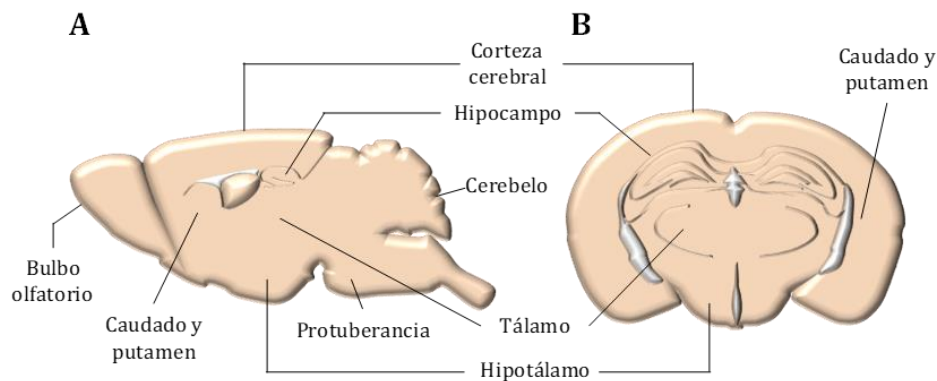


Figura 2. Regiones anatómicas del cerebro de ratón. (A) Visión sagital y (B) visión coronal.

En la superficie de los hemisferios cerebrales (conectados por el cuerpo calloso), se encuentra la *corteza o córtex cerebral* formada por una capa externa de sustancia gris (integrada principalmente por cuerpos neuronales) y cuyo interior lo conforma la sustancia blanca (formada por la agrupación de axones y algunos elementos de la glía). El *diencéfalo* se encuentra en la porción central, debajo de la corteza cerebral e incluye el tálamo y el hipotálamo. En el lóbulo temporal encontramos estructuras que forman parte del sistema límbico, como la amígdala o el hipocampo, relacionado con las emociones, la socialización, supervivencia y memoria. Los *núcleos o ganglios basales* reciben, procesan y envían información (en gran medida con la corteza cerebral) relacionada con las funciones motoras. El núcleo o cuerpo estriado (integrado por el caudado y el putamen), el globo pálido, el núcleo subtalámico y la sustancia negra son regiones que forman parte de los ganglios basales. La *formación del hipocampo* se localiza en el lóbulo temporal y está formada por las astas de Amón o campo amónico (CA, del latín *cornus ammonis*), el giro dentado y el subículo.

El *cerebelo* también posee dos hemisferios cerebelosos, y, pese a ser relativamente más pequeño y menos definido que el humano, las funciones básicas

(equilibrio y coordinación del movimiento, entre otras) en ambas especies son muy similares.

El *tronco encefálico* consta de tres partes: mesencéfalo, protuberancia o puente y bulbo raquídeo, y, de forma semejante a lo que ocurre con el cerebelo, sus funciones (modulación de otros centros cerebrales y coordinación de vías autónomas, entre otras) son muy parecidas en ambas especies.

El líquido cefalorraquídeo (LCR) circula por el espacio que delimita el *sistema ventricular*, conformado por los ventrículos laterales (que se ubican en los hemisferios cerebrales bajo la corteza cerebral), el tercer ventrículo (que conecta los ventrículos laterales y está localizado en el diencefalo), el cuarto ventrículo (que se halla entre el cerebelo y la protuberancia) y el canal central (dentro de la médula espinal).

A nivel celular, el tejido nervioso está formado por dos tipos de células: las *neuronas*, encargadas del procesamiento de la información, y la *neuroglía* (o células gliales), consideradas habitualmente como células de soporte y nutrición de las neuronas, a pesar de que se ha visto que pueden desempeñar funciones más amplias (Figura 3) (Stipursky *et al.*, 2011). La identificación de neuronas y glía mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), utiliza los marcadores de la proteína nuclear neuronal específica (NeuN, del inglés *neuronal nuclei*), como marcador de neuronas, y la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, de inglés *glial fibrillary acidic protein*), presente en células gliales como los astrocitos.

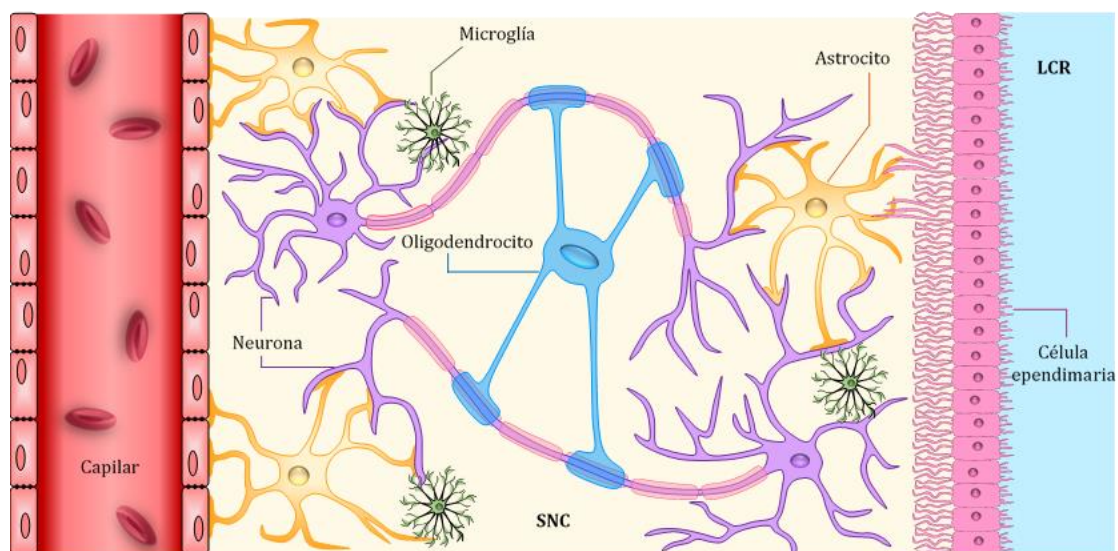


Figura 3. Células del SNC. LCR: líquido cefalorraquídeo.

Las neuronas pueden clasificarse en base a diferentes criterios, pero los principales son los que atienden a su apariencia morfológica (como las células piramidales o las granulares) y según el neurotransmisor que liberen (como las glutamatérgicas o las GABAérgicas). Dentro de la neuroglía se pueden distinguir varios tipos celulares de los que se pueden destacar: la microglía (células pequeñas cuya función es principalmente de defensa o inmunitaria), los astrocitos (células grandes que desempeñan un papel importante en la barrera hematoencefálica (BHE), y en la regulación del microambiente de las neuronas), los oligodendrocitos (células que se disponen a lo largo del trayecto de los axones formando un aislamiento que permite que la transmisión del impulso nervioso se produzca a saltos) y las células ependimarias (células epiteliales que producen LCR).

Para una revisión más detallada ver (Franklin & Paxinos, 2008; Sunkin *et al.*, 2012; Watson *et al.*, 2012; Bolon *et al.*, 2013; Erö *et al.*, 2018; Snyder *et al.*, 2018).

Existen una gran variedad de cepas aplicadas al estudio del envejecimiento y enfermedades relacionadas. En la presente Tesis Doctoral se han utilizado tres cepas de ratón, la cepa endogámica de ratones C57BL/6J, un modelo murino de envejecimiento retardado (ratones deficientes de la polimerasa μ , Pol μ -/-) y otro de senescencia acelerada (SAM, del inglés *senescence accelerted mouse*).

1.3.2. Modelo murino C57BL/6J

Una de las cepas de ratones endogámicos más empleadas en los estudios de laboratorio es la cepa C57BL, establecida por Little, C. C. en 1921, no sólo para el desarrollo de diferentes estudios, sino también como fondo genético en la generación de ratones mutantes (Song & Hwang, 2017). Derivada de la anterior, en 1948, se estableció la cepa C57BL/6 en el Laboratorio Jackson. A su vez, esta dio lugar a otras dos cepas obtenidas y criadas en laboratorios diferentes, y separadas por unas 220 generaciones, la cepa C57BL/6J y C57BL76N (Simon *et al.*, 2013). Las diferentes subcepas son muy parecidas a la original, lo que denota la fuerte estabilidad genética del fondo C57BL (Festing, 1979).

La generación de una cepa endogámica se completa tras la obtención de al menos 20 generaciones consecutivas del apareamiento de una pareja reproductora

entre hermano-hermana, lo que permite que la variabilidad genética dentro de la colonia se reduzca drásticamente, y la que tiene lugar suele deberse a factores ambientales (Festing, 1979). La cepa C57BL/6J es uno de los modelos murinos más empleados en la actualidad en los estudios de envejecimiento. Su perfil neuroanatómico y de comportamiento es ampliamente conocido por la comunidad científica. Prueba de ello es el estudio de Shoji, H. *y cols.*, en el que se evaluaron los cambios de comportamiento en ratones C57BL/6J de diferentes edades (2-12 meses) mediante una amplia gama de pruebas que iban desde exámenes de salud y neurológicos hasta el laberinto de Barnes o el rotarod (Shoji *et al.*, 2016). Los resultados mostraron que, con la edad, se produjo un aumento del peso corporal, una disminución de la temperatura corporal, disminución de la fuerza muscular y de la función motora, sensibilidad al dolor sin alterar, aumento de la ansiedad, disminución de la interacción social y de la respuesta de sobresalto acústico, deterioro de la memoria y el aprendizaje espacial, entre otros.

También se han estudiado la depresión, la ansiedad, la pérdida de audición, el deterioro cognitivo, los ritmos circadianos, la función del corazón y la alteración de la microbiota intestinal, entre otros, en ratones C57BL/6J de edad avanzada, en los cuales se observaron deterioros y alteraciones de las funciones, frente a los ratones jóvenes (Feridooni *et al.*, 2017; Dong *et al.*, 2018; Logan *et al.*, 2018; van der Lugt *et al.*, 2018; Oizumi *et al.*, 2019).

1.3.3. Modelo murino Pol μ

ADN polimerasas y ADN polimerasa μ

Durante el desarrollo del ciclo celular (Figura 4), el ADN puede sufrir lesiones que representan una gran amenaza para el organismo, siendo una de las más destacadas las roturas de doble cadena de ADN (DSBs, del inglés *double-strand breaks*). Si la lesión no es reparada, habitualmente se produce la muerte celular, y, en el peor de los casos, se puede producir carcinogénesis por la alteración de los genes implicados, por lo que no es de extrañar que existan mecanismos de reparación para estas lesiones (Weterings & van Gent, 2004). Para reparar los daños del ADN se conocen dos mecanismos en eucariotas: la *recombinación homóloga*, que requiere un homólogo del ADN (una cromátida hermana) para repararlo, y que parece estar activa en las fases S y G₂ del ciclo celular; y la *unión final no homóloga*

(NHEJ, del inglés *non-homologous end-joining*), que repara DSBs sin que haya homología de secuencia, y se encuentra activa principalmente en las fases G_0/G_1 y S (Kruger, 2004). A pesar de ello, ambos mecanismos pueden actuar en coordinación (Kim *et al.*, 2005).

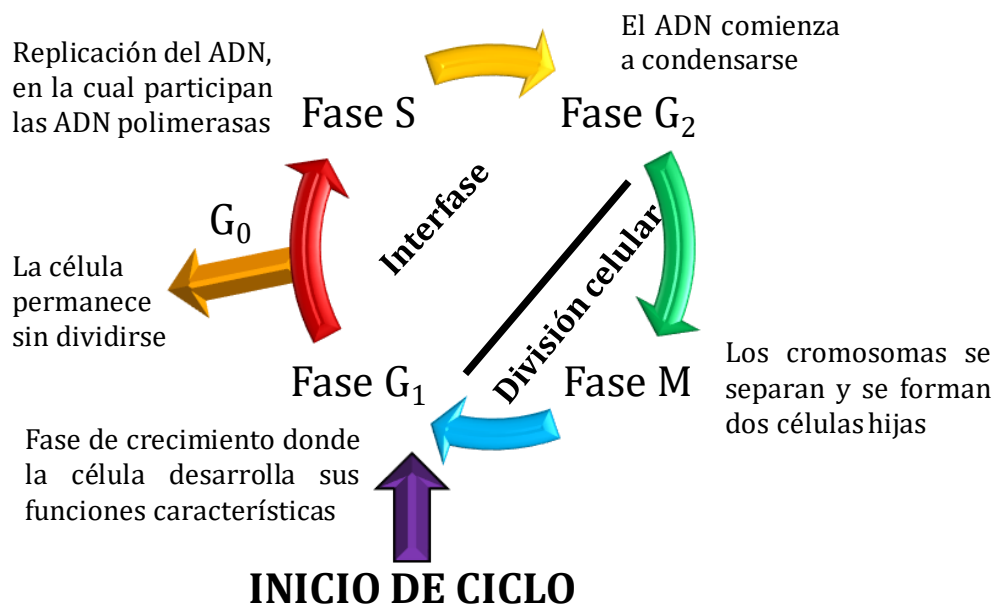


Figura 4. Fases del ciclo celular. El ciclo celular engloba una serie de procesos, que tienen lugar en las células, e integra su crecimiento y su posterior división (Welsch & Sobotta, 2008). Fase S: síntesis; Fase M: mitosis; Fase G: de brecha, del inglés *gap*.

Durante la NHEJ intervienen las ADN polimerasas, enzimas que participan en la replicación del ADN, concretamente las de la familia X: las polimerasas (Pol) λ , μ y la terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT) (Ramsden & Asagoshi, 2012). Pol μ repara las DSBs mediante la síntesis de ADN, propensa a añadir mutaciones en la secuencia, y se usa como apoyo para las otras polimerasas que son menos propensas a introducir mutaciones en el ADN (Dominguez *et al.*, 2000).

A diferencia de TdT, cuya expresión se limita a los órganos linfoides primarios, Pol λ y Pol μ se expresan en varios tejidos (Dominguez *et al.*, 2000; Pryor *et al.*, 2015). En el estudio llevado a cabo por Bertocci, B. y cols. se vio que Pol μ está implicada en la recombinación V(D)J, segmentos del genoma que experimentan una reorganización (recombinación) durante el desarrollo de las células B del sistema inmune (Bertocci *et al.*, 2006). En el estudio realizado por Nijnik, A. y cols. observaron que los daños por DSBs, en los que participa NHEJ, influyen y están relacionados con el envejecimiento en células madre sanguíneas (Nijnik *et al.*, 2007).

Ratón Knock-out para Pol μ

La cepa de ratones *knock-out* (KO) para Pol μ (o Pol μ -/-) fue generada a partir de un fondo genético de ratones C57BL/6J por Bertocci, B. y cols. (Bertocci *et al.*, 2002). Posteriormente, en el laboratorio del Dr. A. Bernad, generaron ratones KO para Pol μ a partir del mismo fondo mediante la interrupción del gen que codificaba la polimerasa por un reemplazo de secuencia (Lucas *et al.*, 2005). En ambos casos, se determinó una disminución de células B, lo que pone de relieve que Pol μ es necesaria para una respuesta inmune adecuada. En un estudio posterior, Lucas, D. y cols. demostraron que Pol μ es requerida para proporcionar estabilidad genética y reparar el ADN en células madre, hematopoyéticas y no hematopoyéticas (Lucas *et al.*, 2009; Chayot *et al.*, 2010). La implicación y relevancia de Pol μ en la recombinación V (D) J ha sido descrita en varios estudios (Bertocci *et al.*, 2003; Nick McElhinny *et al.*, 2005; Bertocci *et al.*, 2006; Lieber, 2006).

Por otro lado, Lucas, D. y cols. observaron que los ratones Pol μ -/- eran más resistentes al deterioro cognitivo y del aprendizaje (hipocampo-dependiente) asociado al envejecimiento. Según estos autores, esto se podría atribuir a que la ausencia de Pol μ da lugar a menos errores en la reparación del ADN, lo que podría implicar una función mitocondrial con menor generación de radicales libres y un retraso en el desarrollo del envejecimiento (Lucas *et al.*, 2013). Poco después, Escudero, B. y cols. observaron que en el hígado de ratones Pol μ -/- de mayor edad, la función hepática se encuentra mantenida, y la apoptosis y el daño oxidativo estaban reducidos, en comparación con ratones wild-type (WT) para Pol μ (o Pol μ +/+) (Escudero *et al.*, 2014). Ambos estudios indican que Pol μ -/- podría tener un perfil de modelo murino de envejecimiento retardado.

1.3.4. Modelo murino SAM

En 1968 Takeda, T. y cols. generaron un modelo murino de senescencia acelerada procedentes de la cepa endogámica AKR/J (Takeda *et al.*, 1981). Durante el mantenimiento habitual de la colonia AKR/J aparecieron camadas en las que los ratones mostraron una pérdida de la actividad habitual, alopecia y pelaje sin brillo, piel áspera, aumento de lordocifosis y una vida útil más corta. Se seleccionaron entonces, algunas de las camadas que presentaban estas características y se las denominó como series propensas a la senescencia (serie P, SAMP), mientras que las

que presentaban un envejecimiento normal se seleccionaron como series resistentes a la senescencia (serie R, SAMR). Tanto de la serie P como de la serie R se obtuvieron varias subseries.

Ratón SAMP8 y SAMR1

Desde su creación, se han desarrollado numerosos estudios enfocados al análisis de las capacidades de estos animales, y su perfil de deterioro asociado al envejecimiento. En 1988, Yagi, H. *y cols.* evaluaron la memoria y el comportamiento del ratón SAMP8 frente a los controles SAMR1 sometiendo a estos animales a la prueba de la evitación pasiva, campo abierto y laberinto en T (Yagi *et al.*, 1988). Sus resultados indicaron que el deterioro del aprendizaje y la memoria en SAMP8 era provocado por déficits en la capacidad de adquisición y no en la capacidad de retención, datos que han sido confirmados por otros autores posteriormente (Wang *et al.*, 2009; Ito, 2013; Li *et al.*, 2013). Además, este deterioro tenía un comienzo temprano con respecto a su control SAMR1 (Flood & Morley, 1992).

En cuanto a las alteraciones neuronales, en ratones SAMP8 se ha observado una disminución de la densidad neuronal, de la densidad de espinas de las dendritas, aparición de depósitos de proteínas semejantes a las presentes en la enfermedad de Alzheimer, distrofia axonal, aumento de la presencia de microglía y astrogliosis severa, así como alteración de la BHE (Akiguchi *et al.*, 2017).

Las alteraciones relacionadas con el contenido neuroquímico, incluyen una disminución de la acetilcolina y noradrenalina, relacionados con déficits del aprendizaje y la memoria (Tomobe & Nomura, 2009). Además, se ha observado una reducción de la expresión de receptores muscarínicos, niveles bajos de calbindina y cambios en la fosforilación de proteínas relacionadas con la plasticidad sináptica y la formación de memoria a largo plazo en el hipocampo (Nomura & Okuma, 1999; Tomobe & Nomura, 2009).

En el estudio llevado a cabo por García-Matas, S. *y cols.* se observó que los astrocitos en SAMP8 poseían una elevada cantidad de radicales libres, asociado a un aumento del estrés oxidativo y, por tanto, capaces de provocar daños en lípidos y proteínas. Además, la capacidad de neuroprotección de los astrocitos era reducida, lo que da lugar a una neurodegeneración asociada al envejecimiento (García-Matas *et al.*, 2008).

SAMP8 muestra niveles elevados de estrés oxidativo en varios tejidos (hígado, cerebro y corazón) respecto a SAMR1, además los sistemas enzimáticos antioxidantes endógenos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) se encuentran reducidos. Por otro lado, la síntesis de ATP es insuficiente en SAMP8, para compensarlo, se ha observado una mayor actividad de la respiración celular en las mitocondrias y, por tanto, un estado redox más elevado (Tomobe & Nomura, 2009).

1.4. Terapias antienvjecimiento

El gran impacto del envejecimiento en la sociedad actual, así como el amplio número de enfermedades relacionadas, ha provocado la búsqueda, por parte de la comunidad científica, de estrategias, tratamientos y terapias orientadas a revertir o retrasar el proceso de envejecimiento.

Una de ella es la **terapia génica**, la cual se basa en la transferencia de fragmentos funcionales de ADN con diferentes objetivos, como corregir mutaciones, reemplazar genes defectuosos o modular la expresión génica (Vaiserman *et al.*, 2019). Íntimamente relacionada con esta terapia encontramos la **reprogramación celular** y la **regulación epigenética**, donde la manipulación *in vivo* puede ser problemática para el individuo, ya que hay un mayor riesgo de teratoma y pérdida de la función celular (Galkin *et al.*, 2019). También se ha propuesto una terapia que permita manipular las células (*ex vivo*) mediante la transducción del gen de la **telomerasa**, evitando así su acortamiento (Hadley *et al.*, 2005). Sin embargo, la división descontrolada, con la consiguiente pérdida de la función normal, puede implicar la aparición y formación de tumores. El uso de las **células madre** como tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento y para el rejuvenecimiento ha sido ampliamente publicitado. Sin embargo, a pesar de los beneficios que pueden ejercer las células madre en determinadas patologías, su aplicación al envejecimiento lo convertiría en un tratamiento crónico con reiteradas intervenciones (Rattan & Singh, 2009; da Costa *et al.*, 2016). Por otro lado, la **restricción calórica**, que consiste en la reducción de la ingesta calórica (30-50 %), produce un aumento de la esperanza de vida y una disminución en la aparición de los cambios que acompañan al envejecimiento (Hadley *et al.*, 2005; Bao *et al.*, 2014). Además, varios estudios han reportado que la práctica de **ejercicio físico**, de forma

regular y adecuada, puede posponer o prevenir los cambios asociados al envejecimiento (Castillo-Garzon *et al.*, 2006).

Después de que Harman propusiera, en 1956, su teoría de radicales libres en el envejecimiento (Harman, 1956), los antioxidantes se presentaron como buenos candidatos para paliar el daño asociado a los radicales libres en lo que se llamaría la **terapia antioxidante** (Polidori, 2003). Aunque las ROS pueden ejercer funciones de regulación de la señalización intracelular y de la homeostasis que resultan beneficiosas para el organismo, cuando sus niveles son elevados puede provocar daño en el ADN y las proteínas (Prasad *et al.*, 2017). Los antioxidantes se definen como “*compuestos endógenos o exógenos que reducen la formación de radicales libres o reaccionan con ellos y los neutralizan*”, de esta forma, protegen al organismo del daño ocasionado por el estrés oxidativo (Delanty & Dichter, 2000). Los antioxidantes pueden ser solubles e insolubles en agua, una característica importante a la hora de atravesar la BHE, y entre ellos encontramos moléculas de pequeño y gran tamaño, sistemas enzimáticos y fármacos sintéticos. Algunos de los antioxidantes más relevantes se comentan a continuación.

Uno de los antioxidantes más usados es la coenzima Q10, un lípido endógeno presente en las células que participa en la respiración celular y que ha sido utilizado en el tratamiento de algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la diabetes, el cáncer o la enfermedad cardiovascular, entre otras (Garrido-Maraver *et al.*, 2014). La curcumina es un polifenol presente en la cúrcuma y su efecto se ha probado en modelos animales de envejecimiento, incluido el SAMP8, en los cuales los niveles de estrés oxidativos se vieron reducidos tras la administración de este compuesto (Abrahams *et al.*, 2019). Otro polifenol muy discutido es el resveratrol, presente en varios vegetales y frutos secos y capaz de atravesar la BHE; además, su ingesta desempeña una función relevante en el tratamiento enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Sawda *et al.*, 2017). La N-acetilcisteína es un medicamento ampliamente utilizado como mucolítico y en el tratamiento de la sobredosis por paracetamol, sin embargo, además de estos usos, también se ha utilizado como adyuvante en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el dolor neuropático y el ictus (Tardiolo *et al.*, 2018).

Los antioxidantes de bajo peso molecular, como las vitaminas, pueden desempeñar un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox evitando el daño causado por el estrés oxidativo; siendo los más importantes el α -tocoferol (α T) y el ácido ascórbico (AA), los cuales no pueden ser sintetizadas por los seres humanos (Podda & Grundmann-Kollmann, 2001). Debido a su gran relevancia y a su papel en la presente Tesis Doctoral, estas vitaminas se comentan en mayor detalle a continuación.

2. Vitamina E

En 1922, Evans y Bishop, durante sus estudios de la influencia de la dieta en la reproducción de las ratas, descubrieron un compuesto al que llamaron “*factor X*” (Evans & Bishop, 1922). Posteriormente, se le denominó vitamina E (VitE), del cual se aisló otra molécula denominada α T, que en griego significa “traer o llevar nacimiento” por su relación con el estudio de reproducción (Evans *et al.*, 1974).

2.1. Aspectos químicos y bioquímicos

La VitE es una molécula liposoluble esencial, ya que solo puede ser sintetizada por eucariotas fotosintéticos. Se encuentra principalmente en alimentos con alto contenido en grasas, como aceites vegetales, nueces, yema de huevo, margarina, queso, soja, germen de trigo, avena, aguacate, aceitunas y vegetales de hoja verde (Medina & Gupta, 2020).

La VitE es un término que engloba diferentes compuestos que, químicamente, poseen un anillo cromanol unido a una cadena lateral hidrofóbica. Estos compuestos se pueden agrupar en dos familias: los tocoferoles, cuya cadena lateral es saturada, y los tocotrienoles, cuya cadena lateral se encuentra insaturada por tres enlaces dobles (en las posiciones 3', 7' y 11'). Para ambos grupos, encontramos cuatro isómeros (α , β , γ y δ) cuya diferencia se debe al número de metilaciones y su localización en el anillo cromanol (Figura 5) (Colombo, 2010). Tanto los tocoferoles como los tocotrienoles tienen un carbono asimétrico que actúa como centro quiral y cuyas dos posibles imágenes especulares (enantiómeros) reciben el nombre de configuración R o S. En el caso de los tocoferoles, la ausencia de dobles enlaces en la cadena lateral les confiere una particularidad: la existencia de dos carbonos asimétricos más. Así, podemos encontrar un total de ocho enantiómeros por cada tocoferol, mientras que los tocotrienoles poseen dos

enantiómeros del carbono asimétrico del anillo cromanol (Figura 5) (Colombo, 2010).

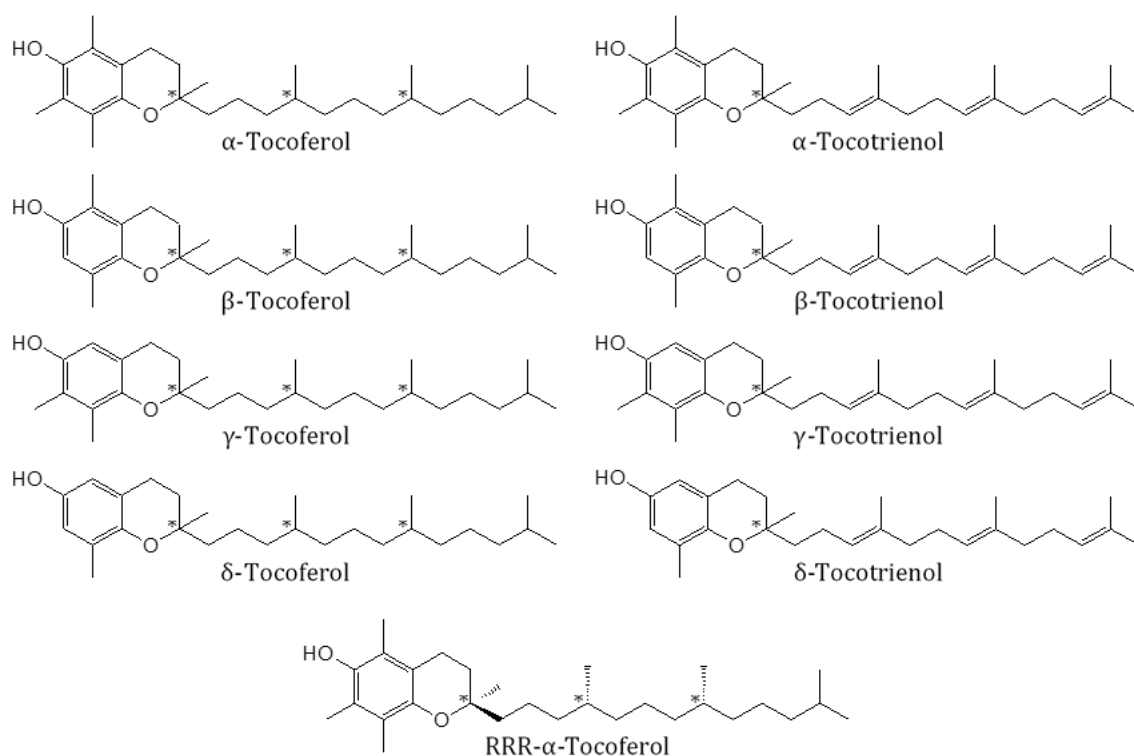


Figura 5. Estructuras que integran la VitE. Tocoferoles y tocotrienoles y sus respectivos isómeros. *Carbono asimétrico.

En la naturaleza, los carbonos asimétricos se encuentran en la configuración R, sin embargo, sintéticamente se obtienen todos los enantiómeros en una mezcla racémica (mezcla de enantiómeros en proporciones equivalentes, *all-rac*) (Lashkari *et al.*, 2019). Recientemente se han descrito otros análogos de la VitE, los tocomonoenoles, que poseen un único doble enlace en la cadena lateral (el cual puede involucrar a los dos últimos carbonos o al antepenúltimo y penúltimo carbono) (Azzi, 2019). La bioactividad y biodisponibilidad relativa entre los tocoferoles, tocotrienoles y las formas sintéticas de VitE, se estableció a partir del estudio de resorción fetal en ratas (Zingg, 2007; Lashkari *et al.*, 2019). El estudio reveló que la actividad biológica de los tocoferoles era mucho mayor para α T que para el resto de tocoferoles y tocotrienoles. De igual forma, la biodisponibilidad de los ocho estereoisómeros del α T fue evaluada con el mismo ensayo, revelando que la configuración 2R (RSS, RRS, RSR y RRR) presentaba mayor retención que la configuración 2S (SRR, SSR, SRS y SSS), siendo la configuración RRR- α T (los tres carbonos asimétricos en configuración R) la que mayor retención presentó de todas

(Lashkari *et al.*, 2019). De esta manera se demostró que el metabolismo de las diferentes formas de VitE es selectivo.

Aunque todos ellos presentan actividad antioxidante, el α T, y más en concreto su forma RRR, no solo es el más abundante, sino que además es el que mayor actividad presenta *in vivo* (Schneider, 2005). Además, esta es la razón por la que muchas veces se utilizan los términos VitE y α T como sinónimos, aunque químicamente están muy alejados de ser análogos. A pesar de ello, el γ T es el más abundante en la dieta, sin embargo, aunque se absorbe igual que el α T, en el hígado tiene lugar su discriminación y finalmente es metabolizado y excretado (Jin *et al.*, 2008).

2.2. Funciones biológicas de la VitE

Las funciones biológicas de la VitE, y de todos sus componentes, son numerosas y van mucho más allá de su poder antioxidante, aunque es con diferencia la más conocida. La VitE está relacionada con numerosos procesos como la reparación de algunas alteraciones del sistema inmune asociadas al envejecimiento, con factores de la reproducción, con la regulación de la transcripción génica, con propiedades antiinflamatorias, participa en la mejora de la función neuromuscular, interviene en la inhibición de la proliferación de células en el cáncer, disminuye la peroxidación lipídica debido al estrés oxidativo e inhibe la proteína quinasa C, entre otros (Brigelius-Flohe, 2006; Traber & Atkinson, 2007; Finno & Valberg, 2012; Azzi, 2018; Khadangi & Azzi, 2019).

Algunos estudios realizados en roedores han mostrado un aumento de la esperanza de vida tras la suplementación con α T, mientras que en otros estudios similares no se ha observado dicho efecto (para revisión ver (Banks *et al.*, 2010)). Entre las razones de la falta de consenso en este tema se barajan la edad de inicio de la suplementación (ya que a una edad avanzada los cambios asociados a la edad podrían no ser reversibles), las dosis empleadas, la forma administrada (en algunos casos se administran análogos más estables externamente), características y género de los animales y la composición del pienso, entre otras (Banks *et al.*, 2010). En el estudio de Marko, M. G. *y cols.* se observó que el tratamiento con RRR- α T revertía los efectos asociados a la edad en las células T envejecidas (Marko *et al.*, 2007). Por otro lado, Hayek, M. G. *y cols.* evaluaron el efecto de la suplementación con α T en la

infección por el virus influenza A en ratones jóvenes y adultos, donde se observó que los niveles virales eran menores en ratones envejecidos que los que no habían recibido el suplemento, lo cual está relacionado con un sistema inmunitario más deficiente en adultos (Hayek *et al.*, 1997). En el trabajo de Shichiri, M. y cols. la administración crónica de α T (desde antes del nacimiento) fue realizada en un modelo de ratón con síndrome de Down (que presenta elevado estrés oxidativo) donde se observó que los ratones tratados presentaban menos ansiedad y una mejora en el aprendizaje (Shichiri *et al.*, 2011). A pesar de todo ello, se ha de tener en cuenta que existe un número elevado de trabajos en los que el α T no produjo efectos beneficiosos para la salud (Mocchegiani *et al.*, 2014). Esta controversia se observa principalmente cuando los estudios son realizados en humanos, quizás debido a la alta variabilidad entre individuos y la influencia de factores externos, como la dieta y el estilo de vida.

Por otro lado, el β T, a diferencia del α T ha sido menos estudiado y habitualmente se suele emplear para compararlo con él. Aunque sus funciones son similares, β T es menos activo, no inhibe la proliferación celular ni la expresión génica y no tiene efecto en la liberación de interleucina 1β en monocitos, pero sí inhibe la tirosinasa intracelular en el melanoma de ratón junto con γ T, a diferencia del α T (Azzi, 2019). En el caso del γ T, sus funciones difieren del α T, pues se ha observado que presenta propiedades antiinflamatorias, antitumorales, antiangiogénicas, reduce la acumulación de lípidos y promueve la diferenciación neuronal (Azzi, 2019). Sin embargo, muchas de estas funciones se detectan en estudios *in vitro*, ya que *in vivo*, las concentraciones plasmáticas son inferiores respecto al α T (Azzi, 2019). El δ T también difiere del α T en sus funciones, interviene en la respuesta inflamatoria promovida por las ROS, previene la progresión del cáncer de mama, colon, pulmón y próstata, y al igual que γ T, reduce la acumulación de lípidos y promueve la diferenciación neuronal (Azzi, 2018).

Las funciones de los tocotrienoles, además del poder antioxidante, también han sido estudiadas, aunque el número de estudios es considerablemente inferior respecto a los tocoferoles y la mayoría han sido realizados en cultivos celulares y modelos animales (Georgousopoulou *et al.*, 2017). El α -tocotrienol protege contra el accidente cerebrovascular, previene la neurodegeneración, reduce la síntesis de

colesterol y presenta propiedades antiinflamatorias (Sen *et al.*, 2007). El β -tocotrienol es el menos estudiado, aunque de forma general se le atribuyen las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Georgousopoulou *et al.*, 2017). El γ -tocotrienol reduce la presión arterial y la peroxidación lipídica, presenta propiedades anticancerígenas en células epiteliales mamarias y se ha observado una pequeña prolongación del tiempo de vida en ratones con fibrosarcoma, mientras que el δ -tocotrienol posee propiedades anticancerígenas principalmente (Sen *et al.*, 2007).

Dado que α T es el compuesto más activo en el organismo frente a sus isómeros en los estudios *in vivo*, la comprensión de los mecanismos por los cuales se produce esta preferencia biológica en el organismo (absorción, distribución, metabolismo y excreción), proporciona algunas respuestas que justifican su mayor biodisponibilidad y bioactividad.

2.3. VitE y α T: absorción, distribución, metabolismo y eliminación

Absorción intestinal

Como compuesto liposoluble, la absorción de la VitE está asociada a la de otros compuestos lipofílicos, por lo que la presencia de compuestos ricos en grasas durante la ingesta es relevante y necesaria (Jeanes *et al.*, 2004).

Previo al paso de los alimentos ingeridos al intestino, en el estómago, tiene lugar una digestión parcial de las grasas por acción de la lipasa gástrica, aunque su papel en la digestión de la VitE es limitado (Borel *et al.*, 2001). Una vez en el intestino la secreción de sales biliares y enzimas pancreáticas provoca la emulsión de las grasas y se forman micelas ricas en compuestos lipídicos (Figura 6) (Tucker & Townsend, 2005).

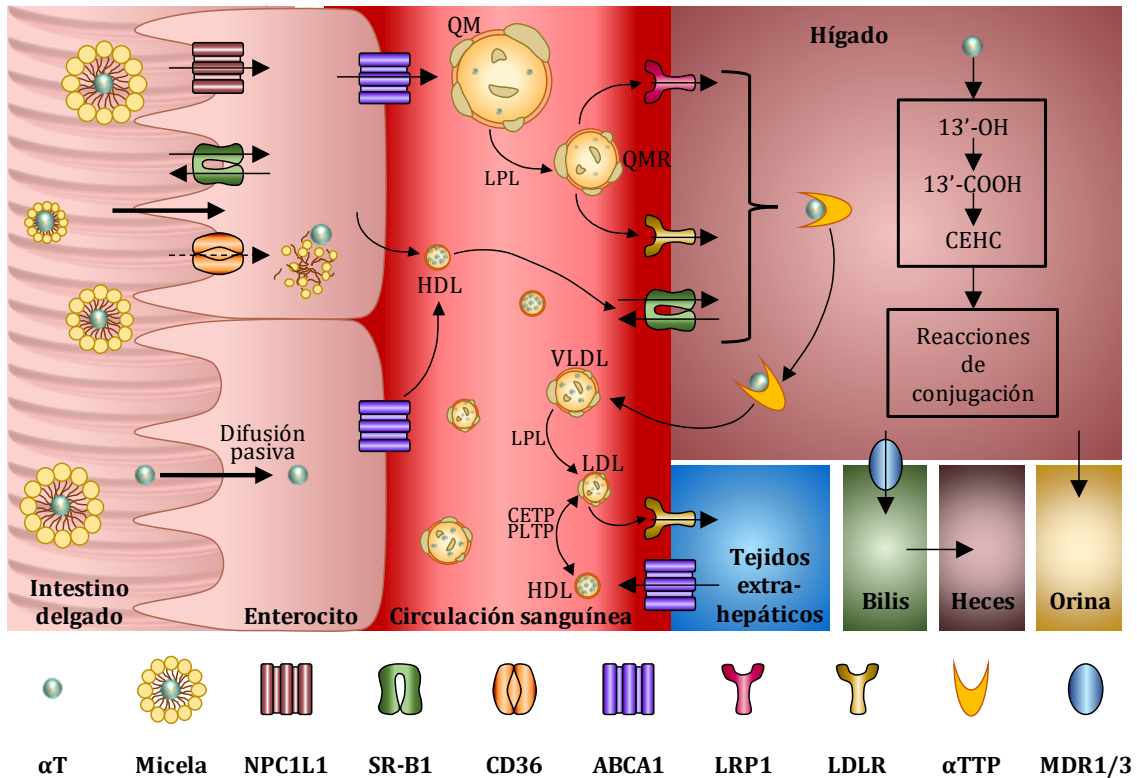


Figura 6. Absorción, distribución, metabolismo y excreción del α T. Tras la emulsión de las grasas, el α T, en forma de micelas, pasa al enterocito por medio de diferentes transportadores, NPC1L1, SR-B1 o CD36, y, en menor medida, por difusión pasiva. La salida del enterocito se hace a través de ABCA1 en forma de quilomicroción (QM), el cual reduce su tamaño a quilomicroción remanente (QMR) en la circulación sanguínea por acción de la lipoproteína lipasa (LPL), o asociado a lipoproteínas de alta densidad (HDL). Una vez en el torrente sanguíneo, el α T llega al hígado por medio de LRP1, LDLR o SR-B1. En el tejido hepático, el α T puede ser captado por la proteína de transferencia de α -tocoferol (α TTP) y devuelto a la circulación sanguínea; o ser metabolizado y eliminado en las heces, tras el paso a la bilis mediado por MDR1/3, o por la orina. El α T que retorna al torrente sanguíneo es transportado por las diferentes lipoproteínas de la sangre (VLDL, LDL y HDL) gracias a la acción de CETP y PLTP. La llegada de α T, asociado a las lipoproteínas, a los tejidos se hace por medio de LDLR, mientras que ABCA1 media la salida de los tejidos. 13'-OH: 13'-hidroxicromanol; 13'-COOH: 13'-carboxicromanol; ABCA1: transportador de cassette de unión a ATP A1; CEHC: carboxietilhidroxicromanoles; CETP: proteína de transferencia de colesterol éster; CD36: glicoproteína determinante de grupo 36; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad; LRP1: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; MDR1/3: proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 y 3; NPC1L1: proteína 1 similar a C1 de Niemann-Pick; PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos plasmáticos; SR-B1: receptor de barrido clase B tipo 1; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

El paso del α T (y del resto de moléculas de la VitE) al enterocito puede producirse tanto por difusión pasiva como mediado por receptores (Reboul, 2019). Entre los receptores involucrados en su transporte se encuentran el receptor de barrido clase B tipo 1 (SR-B1, del inglés *Scavenger receptor class B type 1*) (Reboul *et al.*, 2006), y la proteína Niemann-Pick-C1-Like 1 (NPC1L1, del inglés *Niemann-Pick C1-like protein-1*), siendo ambos receptores apicales (Brigelius-Flohe, 2009). Además, se ha observado que la glicoproteína determinante de grupo 36 (CD36, del inglés *cluster of differentiation 36*, una proteína de la familia del receptor de barrido clase B (Yamanashi *et al.*, 2017)) podría contribuir al transporte, ya sea directa o indirectamente (Goncalves *et al.*, 2014). La salida del enterocito es mediada por los

transportadores de cassette de unión a ATP A1 (ABCA1, del inglés *ATP-binding cassette transporter A1*) y se hace por medio de los quilomicrones (razón por la cual el aporte de grasas en la ingesta de α T es necesaria (Anwar *et al.*, 2007)) en la linfa o, por otro lado, y en menor medida, al torrente sanguíneo, donde podría ser captado por lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés *high density lipoprotein*) y dirigirse a otros tejidos (Brigelius-Flohe, 2009). Todos estos procesos están relacionados con el transporte del colesterol y los lípidos en general (Goncalves *et al.*, 2014). En este punto, la absorción intestinal de las diferentes formas de VitE y los estereoisómeros es inespecífica, y no se ha descrito una absorción intestinal diferencial y selectiva de la estructura química (Finno & Valberg, 2012).

En roedores, la absorción se produce principalmente en el yeyuno, sin embargo, a lo largo del intestino, la distribución de los receptores que intervienen en la absorción de las micelas no es uniforme, al igual que su localización en la célula (apical o basolateral), por ello se estima que la eficacia de la absorción será mayor donde se expresan en mayor cantidad estos receptores (Borel *et al.*, 2013).

Transporte y distribución sistémica

El transporte y distribución a los tejidos no es selectivo para las diferentes formas de la VitE, y no se conoce una proteína plasmática específica para el α T (Kayden & Traber, 1993). En línea con el transporte que tiene lugar para el colesterol, el α T es transportado por las lipoproteínas (transportadores de compuestos lipófilos como los triglicéridos y el colesterol) por todo el organismo (Kayden & Traber, 1993). Dentro de las lipoproteínas, el transporte puede tener lugar en los quilomicrones, las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, *very low density lipoprotein*), de alta densidad (HDL) y en las de baja densidad (LDL, *low density lipoprotein*). La relación de distribución del α T, entre cada una de ellas es compleja, y los estudios realizados al respecto, tanto en animales como en humanos, no son concluyentes. Esto se debe principalmente a la alta interferencia de factores como las diferencias interindividuales, la dieta, el metabolismo, etc (Rigotti, 2007).

Tras la salida del enterocito, integrado en los quilomicrones, el α T ingresa a la circulación sistémica, donde los quilomicrones reducen su tamaño debido a la acción de la lipoproteína lipasa (LPL) (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010). Estos quilomicrones de menor tamaño (quilomicrones remanentes) llegan al hígado y son

internalizados por medio del receptor de LDL (LDLR) y la proteína relacionada con el LDLR (LRP1, del inglés *low density lipoprotein receptor-related protein 1*, un integrante de la familia de LDLR). Por otro lado, el α T asociado al HDL procedente del enterocito, que salió mediado por ABCA1, sería absorbido por el SR-B1 (Traber *et al.*, 2004; Brigelius-Flohe, 2009).

En el hígado, la VitE puede ser metabolizada o interactuar con las proteínas citosólicas, sin que se produzca el metabolismo de las moléculas, y volver a la circulación sanguínea (ver sección “INTRODUCCIÓN: 2.3. Unión a proteínas intracelulares: relevancia de α TTP”). Tras la interacción con las proteínas citosólicas, el α T (seleccionado y diferenciado del resto de formas de la VitE) se une a las VLDL por mecanismos que aún no están del todo claros y pasa a la circulación sistémica (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010). Las partículas de VLDL sufren la acción de la LPL formando las HDL y LDL, cuya entrada a las células es mediada por los LDLR (Zingg & Azzi, 2004), aunque existen estudios que demuestran que, además de LDLR, podrían participar otros receptores que aún se desconocen (Galli *et al.*, 2017). La salida de los tejidos es mediada por ABCA1, el cual enriquece partículas HDL (de forma extracelular) con α T, y una vez en el torrente sanguíneo puede volver al hígado o unirse a VLDL por acción de la proteína de transferencia de fosfolípidos plasmáticos (PLTP, del inglés *phospholipid transfer protein*) (Mardones & Rigotti, 2004; Shichiri *et al.*, 2010; Galli *et al.*, 2017). Así, α T puede transferirse entre las distintas formas de las lipoproteínas, lo que parece desempeñar un papel relevante en el control de la distribución de α T en el organismo (Mardones & Rigotti, 2004). La proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP, del inglés *cholesterol ester transfer protein*) podría desempeñar un papel similar, ya que media el intercambio de α T de lipoproteínas ricas en triacilglicéridos a HDL (Lemaire-Ewing *et al.*, 2010).

También se ha descrito una glucoproteína derivada de la familia de las albúminas presente en los fluidos foliculares capaz de unirse de forma preferencial al α T y γ T, la afamina (Jerkovic *et al.*, 2005). Además, se encuentra presente en el fluido cerebroespinal, aunque su papel aún no está claro, y su contribución es mucho menor que la que realizan las lipoproteínas (Jerkovic *et al.*, 2005). De forma similar, se ha demostrado que el α T se une a la albúmina sérica humana y podría contribuir a su transporte (Fanali *et al.*, 2013).

Unión a proteínas intracelulares: relevancia de α TTP

Además de las proteínas ya mencionadas, α T puede unirse a otras proteínas con diferente afinidad y propósito. A nivel celular, el α T se une específicamente a la proteína de transferencia de α T (α TTP, del inglés *α -tocopherol transfer protein*), una proteína que se ha encontrado en la placenta, bazo, pulmón, riñón, útero y SNC (Traber, 2005; Schmolz *et al.*, 2016). La especificidad de unión de α TTP a α T es elevada, debido a la configuración del anillo cromanol, y esta es una de las razones por las cuales se discriminan las diferentes formas de la VitE en favor del α T (Jensen & Lauridsen, 2007). De manera que, aunque α TTP puede unir cualquiera de las moléculas que forman el término VitE, lo hace con mayor afinidad al α T (Manor & Morley, 2007). Lo mismo sucede con los estereoisómeros, siendo las diferentes formas de la configuración 2R las más afines, debido a su disposición espacial, solo por detrás de la configuración RRR. La principal función de α TTP es mantener los niveles plasmáticos e intracelulares de α T, ya que media su unión a las partículas VLDL cerca de la membrana plasmática, evitando su degradación en el hígado y manteniendo la concentración fisiológica de α T en las células (Duhem *et al.*, 2014; Galli *et al.*, 2017). Los procesos por los cuales se produce la transferencia del α T a las VLDL no están claros, y se ha visto que no es un proceso crítico en el transporte de α T (Traber *et al.*, 2004; Duhem *et al.*, 2014).

La deficiencia o niveles extremadamente bajos de VitE en humanos puede causar lo que se conoce como “ataxia con deficiencia de VitE” (AVED, del inglés *ataxia with vitamin E deficiency*) (Traber & Atkinson, 2007). También se ha demostrado que se debe a una mutación del gen que codifica la α TTP, por lo que se definió como una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva, que provoca una alteración en el transporte de α T (Ouahchi *et al.*, 1995), aunque también se ha relacionado con la mala absorción de grasas (Traber & Atkinson, 2007). Los pacientes presentan un trastorno neurológico progresivo, que produce degeneración de los nervios periféricos, provocando ataxia (Traber, 2014). El tratamiento con VitE evita la progresión de las alteraciones neurológicas, pudiendo revertir los efectos en las etapas tempranas de la enfermedad (Traber, 2014).

Los ratones α TTP (-/-) presentan niveles extremadamente bajos de α T en sangre respecto a los controles, en torno al 5 %; de igual forma que las

concentraciones tisulares son relativamente bajas, entre el 5-20 %; y las concentraciones en hígado entre el 30-40 % respecto a los controles (Traber, 2004). Esto refleja que, aunque α T llega al hígado por el metabolismo de las grasas, como ya se ha descrito, la secreción al plasma (función que desempeña α TTP), se ve claramente interrumpida, mientras que, en los tejidos, aparentemente podrían participar otras proteínas. En otro estudio de ratones mutantes para el α TTP se observó un aumento del estrés oxidativo, que produjo una degeneración neuronal de inicio tardío y de lenta progresión que mejoró cuando se suplementó con α T (Yokota *et al.*, 2001). Esta aparición tardía podría deberse a que la expresión del ARN mensajero (ARNm) de un factor de transcripción relacionado con la ataxia (el receptor huérfano alfa relacionado con el receptor del ácido retinoico, ROR- α) está parcialmente reprimido por las concentraciones bajas de α T en la corteza cerebral (Gohil *et al.*, 2004). Por lo tanto, a nivel cerebral α TTP es fisiológicamente necesario, y este tipo de ratones podrían ser empleados como modelo de AVED (ya que los síntomas son parecidos) o en el estudio del mecanismo de neurodegeneración de enfermedades relacionadas con la edad como la enfermedad de Alzheimer (Yokota *et al.*, 2001). Además, cuando se compararon los niveles de α T en plasma y tejidos, se observó que, a diferencia de los ratones KO, los heterocigotos (+/-) y WT presentan concentraciones de α T relativamente similares (Leonard *et al.*, 2002).

Aunque de menor importancia, existen otras proteínas de unión intracelular con α T. La proteína asociada a tocoferol (TAP), de la que se conocen tres tipos en humanos, que podría estar implicada en la regulación del crecimiento descontrolado en el cáncer (Azzi, 2018), y la proteína de unión a tocoferol (TBP), implicada en el transporte del α T a las mitocondrias (Zingg, 2007). La unión de α T a estas proteínas es menor en comparación con α TTP, y su relevancia fisiológica sigue en estudio (Traber, 2005; Schmolz *et al.*, 2016). También se ha observado que la proteína citosólica saposina B puede unirse a α T, aunque, *in vitro*, presenta mayor afinidad por γ T; sin embargo, *in vivo*, los niveles de α T son mayores, lo que difiere de las condiciones *in vitro* y afecta a los resultados (Jin *et al.*, 2008).

Transportadores a nivel cerebral

Varios estudios describen la importancia de la administración de α T a nivel cerebral, pues su deficiencia, la mala absorción asociada al metabolismo de los

lípidos y las mutaciones asociadas a sus transportadores o proteínas de unión se traduce en trastornos neurológicos graves (Muller, 2010).

Para llegar al SNC, el α T, transportado en sangre principalmente por LDL y HDL, tiene que atravesar la BHE. Esto lo consigue mediante los receptores LDLR y el receptor SR-B1, relacionado con la unión a HDL, que se expresan en la BHE y en el cerebro (Figura 7) (Goti *et al.*, 2001). En el estudio de Goti, D. y cols. llevado a cabo en cultivos primarios de células del endotelio capilar del cerebro del cerdo, se observó que el HDL es mejor donante de α T que el LDL, y el α T asociado a HDL se absorbe más que el que se encuentra asociado a LDL (Goti *et al.*, 2000). Al tratarse de un transporte tan regulado, es poco probable que la difusión pasiva del α T a través de la BHE tenga relevancia fisiológica. También se observó que el paso a nivel de la BHE no era selectivo para las diferentes formas de la VitE, lo cual tiene sentido, ya que se realiza por medio de las lipoproteínas. La selección de la forma RRR- α T tendría lugar a nivel de las células cerebrales debido a la presencia de α TTP en el tejido nervioso (Marcos *et al.*, 2018).

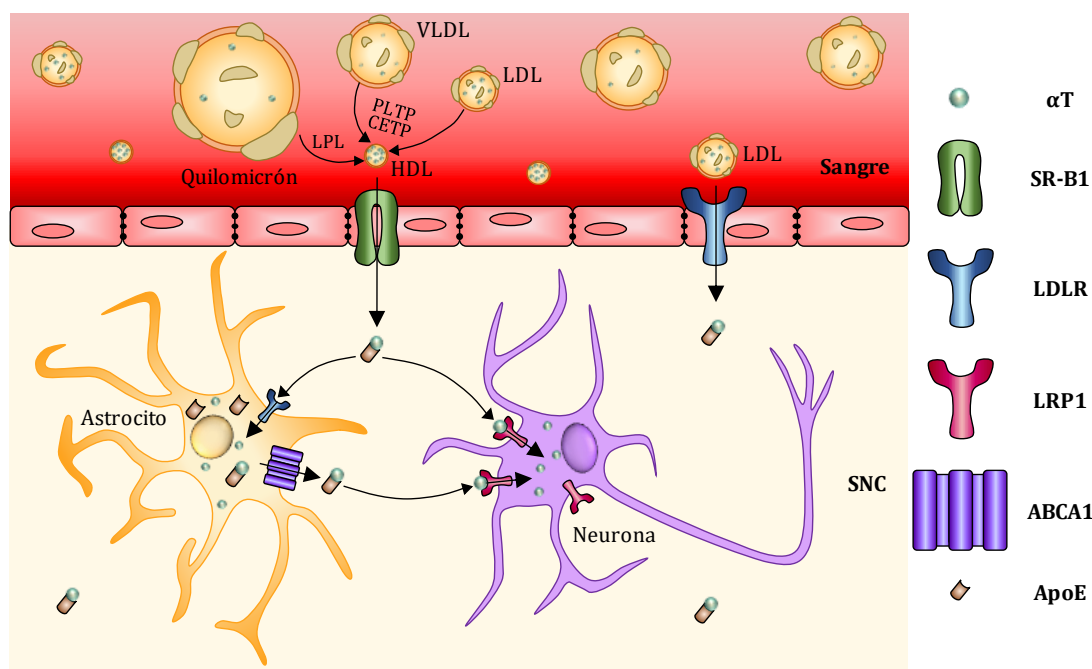


Figura 7. Transporte cerebral del α T. El α T puede llegar al SNC por dos vías: por SR-B1, principalmente, o por LDLR, en menor medida. Una vez en el SNC, el α T se une a la ApoE, mediante la cual puede entrar en los astrocitos y en las neuronas por medio de LDLR y LRP1, respectivamente. ABCA1 se encuentra en los astrocitos y media la salida de α T unido a ApoE al medio extracelular. ABCA1: transportador de cassette de unión a ATP A1; ApoE: apolipoproteína E; CETP: proteína de transferencia de colesterol éster; HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LDLR: receptor de lipoproteínas de baja densidad; LPL: lipoproteína lipasa; LRP1: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad; PLTP: proteína de transferencia de fosfolípidos plasmáticos; SR-B1: receptor de barrido clase B tipo 1; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

Posteriormente, Goti, D. *y cols.* estudiaron la expresión de SR-B1 en el mismo modelo, ya que este transportador media la captación selectiva de HDL en roedores (Goti *et al.*, 2001). Sus resultados muestran que este receptor se encontraba presente en las células y que la sobreexpresión de éste (por manipulación génica) conducía a un claro aumento de la cantidad de α T, lo que denota su gran relevancia en el transporte de α T mediado por HDL. Además, utilizando el mismo modelo *in vitro* de BHE, se ha demostrado que la afamina también interviene en el transporte de α T, la cual se encuentra presente en cerebro porcino, humano y ratón (C57BL/6J), aunque el mecanismo aún se desconoce (Kratzer *et al.*, 2009).

Por otro lado, en ratones KO para el transportador SR-B1 se produce un aumento de la cantidad de α T en sangre, como consecuencia del aumento de α T asociado a HDL que no es absorbido por las células, y una considerable disminución en determinados tejidos, como en el cerebro (67 % menos) (Mardones *et al.*, 2002). Esto indica que existen otros mecanismos alternativos (con menor relevancia fisiológica) que contribuyen al transporte de α T, como es el caso del LDLR, que se encuentra presente en la BHE (Mardones *et al.*, 2002; Kratzer *et al.*, 2009). Todo ello no hace más que poner de relieve que, en condiciones normales, el transporte tiene lugar principalmente por medio de SR-B1.

En el SNC murino se cree que la apolipoproteína E (ApoE), que tiene afinidad para unirse al LDLR, puede realizar un papel relevante en el tráfico de α T a nivel celular, una vez superado el paso de la BHE (Kratzer *et al.*, 2009; Ulatowski & Manor, 2013). En este sentido, la ApoE, que se une a las lipoproteínas, es secretada principalmente por los astrocitos a través del receptor ABCA1 y puede unirse al LDLR, que se encuentra principalmente en células gliales, y al LRP1, que se expresa en neuronas mucho más que en células gliales (Vance & Hayashi, 2010; Lee & Ulatowski, 2019).

Además, la presencia de α TTP en la glía de Bergmann (Marcos *et al.*, 2018) ha llevado a plantear la hipótesis de que el α T que atraviesa la BHE llega a estos astrocitos, que dan soporte a las células (o neuronas) de Purkinje, y median su transporte (Lee & Ulatowski, 2019).

A pesar de ello, no se conocen todos los mecanismos por los que tiene lugar el transporte de α T a través de la BHE, el transporte intracelular e intercelular,

debido a que el proceso es altamente complejo e involucra la interacción con numerosos receptores asociados al transporte de los lípidos.

Metabolismo hepático y excreción

Los quilomicrones entran en los hepatocitos por endocitosis mediada por LDLR y LRP1, además de otros receptores involucrados en el metabolismo de los lípidos (Hacquebard & Carpentier, 2005). Una vez internalizado, la unión de α TTP y α T impide que éste sea metabolizado y es secretado de nuevo al plasma. La secreción de α T al torrente sanguíneo tiene lugar a través de ABCA1 y asociado a la VLDL, aunque los mecanismos moleculares no están claros (Hacquebard & Carpentier, 2005). Sin embargo, puesto que el hígado no acumula cantidades de VitE que puedan resultar tóxicas, el resto de moléculas que forman la VitE así como el exceso de α T son metabolizados y/o excretadas (Kaempf-Rotzoll *et al.*, 2003).

En el metabolismo de xenobióticos, las reacciones que tienen lugar se dividen en dos fases, en la *fase I* se suelen producir reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, mientras que en la de fase II se dan reacciones de conjugación, todas ellas encaminadas a facilitar la eliminación de los compuestos. En el caso de la VitE, las reacciones que tienen lugar en la fase I incluyen la ω -hidroxilación y ω -oxidación catalizadas por el citocromo P450 (CYP4F2), tras lo cual tiene lugar la β -oxidación (Traber, 2013). En cualquier caso, las reacciones no afectan al anillo cromanol, por lo que se sigue manteniendo la nomenclatura α , β , γ , y δ (Galli *et al.*, 2007). En la reacción catalizada por el CYP4F2, una vez realizada la ω -hidroxilación se obtiene el metabolito 13'-hidroxicromanol (13'-OH), tras lo cual se produce la ω -oxidación en la que se genera el metabolito 13'-carboxicromanol (13'-COOH), ambas tienen lugar en el retículo endoplasmático (Jiang, 2014). La β -oxidación produce el acortamiento de la cadena lateral formando metabolitos de cadena larga (que tiene lugar en peroxisomas), metabolitos de cadena larga-intermedia y los productos finales, los carboxietilhidroxicromanoles (CEHC), que se producen en las mitocondrias (Jiang, 2014). También se han encontrado dos nuevos metabolitos en heces, el 11' y 12'-hidroxicromanol (Bardowell *et al.*, 2012). En las reacciones de la *fase II*, aunque no está del todo claro, se han observado conjugados de glucuronidación, sulfatación, glucosidación y sulfatación, que pueden tener lugar en paralelo a la β -oxidación (Traber, 2013).

Algunos de estos metabolitos presentan actividad biológica *in vitro* e *in vivo*, ya que pueden inhibir la proliferación células cancerosas, intervenir en funciones antiinflamatorias, regulación génica, propiedades natriuréticas, prevención en la esterilidad, entre otras, y requieren mayor estudio (Moore & Ingold, 1997; Hensley *et al.*, 2004; Birringer & Lorkowski, 2019; Jiang, 2019).

Otros metabolitos de la VitE son las tocoferil quinonas, las cuales se forman por oxidación de α T en los tejidos y el plasma (metabolismo extrahepático), lo que proporciona información acerca del nivel de estrés oxidativo y el comportamiento de α T como antioxidante, ya que se han localizado en presencia de estrés oxidativo (Wu & Croft, 2007). Por otro lado, los metabolitos Simon (el ácido α -tocoferónico y su derivado de lactona, la α -tocoferolactona), se hallaron en la orina de conejos y humanos, y, aunque se pensó que se generaron debido a la manipulación durante su tratamiento en el laboratorio, se cree que podrían encontrarse en niveles muy bajos en orina y considerarse marcadores de estrés oxidativo (Clarke *et al.*, 2008). Lo cual pone de relieve la necesidad del uso de técnicas analíticas instrumentales que proporcionen determinaciones altamente sensibles y selectivas.

Tras su metabolismo en el hígado, los metabolitos de la VitE son expulsados del organismo. Los metabolitos de cadena larga se encuentran principalmente en las heces sin conjugar, mientras que los metabolitos de cadena larga-intermedia y CEHC se suelen encontrar conjugados y, por tanto, debido a su polaridad, se excretan principalmente por la orina, aunque también se pueden encontrar pequeñas cantidades en las heces (Schmolz *et al.*, 2016). Además, se ha estimado que un 30-70 % del α T no vuelve a la circulación sanguínea tras su paso por el hígado y puede ser excretado en la bilis (en condiciones de exceso de suplementación también se produce), pudiendo entrar en el ciclo enterohepático (en ratas se estima que es el 60 % del α T) y expulsándose el resto en las heces (Kayden & Traber, 1993; Galli *et al.*, 2007; Wu & Croft, 2007). Este paso a la bilis es mediado por dos proteínas de la familia de los transportadores de casete de unión a ATP, la proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 y 3 (MDR1 y MDR3) (Duhem *et al.*, 2014).

Otra vía de excreción del α T, aunque minoritaria, es a través de la piel, ya que es secretado por las glándulas sebáceas y puede ejercer su papel protector en la piel frente a la radiación solar ultravioleta (Thiele *et al.*, 1998; Thiele *et al.*, 1999).

Factores que afectan a la cinética y la biodisponibilidad

El α T no se encuentra libre en la naturaleza, sino que forma parte de la matriz de algunos alimentos. La composición de estos alimentos influye en la biodisponibilidad del α T, es decir, las propiedades físico-químicas de las sustancias que forman parte de los alimentos puede interferir en la absorción del α T (Reboul, 2017). Un ejemplo claro es el contenido en grasas de los alimentos, que estimula la secreción biliar, imprescindible para formar las micelas, y facilita su extracción y la posterior formación de los quilomicrones en el enterocito (Jeanes *et al.*, 2004).

Durante la digestión, aunque se ha demostrado que no afecta al α T, la acción de las enzimas gástricas sobre la matriz alimentaria en la que se encuentra puede ayudar a que el α T se libere y sea más accesible, lo cual se relaciona, a su vez, con la distribución del α T en las micelas que se forman en el intestino (Borel *et al.*, 2013). Los derivados del α T, como el acetato de α T, que son más resistentes a los factores externos, requieren la hidrólisis previa por parte de las lipasas, ya que se han de absorber en forma de α T libre (Rigotti, 2007).

La distribución de sustancias liposolubles que se administran en el organismo se realiza en función del grado de perfusión de los tejidos, su composición fisiológica y el tipo de transporte a través de las membranas, de manera que el equilibrio no se alcanza a la misma velocidad en órganos altamente irrigados (corazón, pulmones o hígado) que en los menos irrigados (tejido adiposo). En el caso del α T, del cual se estima que el 90 % se almacena en el tejido adiposo, alcanza rápidamente niveles altos en los tejidos más irrigados, mientras que en el tejido adiposo los niveles aumentan más lentamente (Blatt *et al.*, 2001). Esta afinidad por el tejido graso hace que el exceso de grasa en los hepatocitos puede ejercer la función de sumidero no intencionado del α T, y atenuar su acceso al torrente sanguíneo, disminuyendo, por tanto, su biodisponibilidad (Violet *et al.*, 2020).

Además, después de una administración, la concentración en sangre de α T alcanza un máximo, independientemente de la dosis y el período de administración (Lodge, 2005). Se ha sugerido que esto se puede deber a la saturación del α TTP o a la regulación negativa del α T sobre la expresión del α TTP, aunque no hay evidencias concretas al respecto (Lodge, 2005).

Al compartir la vía de absorción y distribución con algunos lípidos, las patologías asociadas a problemas lipídicos (como las dislipemias) pueden afectar a la biodistribución del α T, del mismo modo que las mutaciones o factores génicos de cualquiera de los elementos involucrados (SR-B1, ABCA1, ApoE, entre otros), lo que puede ser la causa de la gran variabilidad interindividual en su distribución (Lodge, 2005). En el caso del metabolismo y la excreción, al ser similar al de los xenobióticos o fármacos, puede interferir en sus funciones, disminuyendo su biodisponibilidad o aumentando los efectos adversos (Finno & Valberg, 2012). Así mismo, compite con otros micronutrientes lipídicos, como los carotenoides, el colesterol y otras vitaminas liposolubles, la A, D y K (aunque se cree que el α T protege a la vitamina A de la oxidación, lo cual disminuye su absorción) (Reboul, 2017) (Reboul, 2019).

La suma de todos estos factores se evidencia en la gran fluctuación a la hora de estimar la cantidad de α T absorbido, entre el 30-90 % en humanos (Bruno *et al.*, 2006; Novotny *et al.*, 2012).

Inocuidad y toxicidad

Los estudios llevados a cabo por Kappus, H. y Diplock, A. T. en animales de experimentación y en humanos, consideran que los efectos que aparecen en el intervalo 1-3 g/día (problemas gastrointestinales, creatinuria y alteración de la coagulación sanguínea) no son graves y desaparecen con la suspensión de la ingesta. En algunos casos se ha observado debilidad muscular, fatiga, visión doble, trastornos emocionales, dolor en los senos, diarreas, flatulencias y náuseas (Eitenmiller & Lee, 2004). De forma general, y tras evaluar sus efectos en diferentes mamíferos, el límite máximo de ingesta de α T se ha establecido en 1 g/día para adultos (Bowman *et al.*, 2001), y la aparición de efectos adversos graves se daría a partir de los 3 g/día (Kappus, 1992). Aun así, los datos de numerosos metaanálisis siguen sin alcanzar un consenso debido a la alta heterogeneidad en los ensayos, pero muchos coinciden en que el límite está por encima de las recomendaciones diarias de α T (Hathcock *et al.*, 2005).

2.4. Nuevas formas farmacéuticas de administración de α T

Habitualmente, las propiedades de las moléculas activas se evalúan inicialmente en estudios *in vitro*. Sin embargo, cuando se realizan estudios *in vivo*, con frecuencia, aparecen problemas de estabilidad, toxicidad y baja

biodisponibilidad que provocan una disminución en la eficacia de los tratamientos (Stylos *et al.*, 2017).

La biodisponibilidad de un compuesto se define como la fracción de la dosis administrada que llega a circulación sistémica y la velocidad a la que lo hace, es decir, la cantidad del compuesto disponible en sangre, sin embargo, este parámetro no nos da información acerca de la bioactividad (o actividad biológica), que mide los efectos biológicos sobre el punto final estudiado (dosis *versus* efecto), siendo para ello indispensable conocer la biodisponibilidad del compuesto (Blatt *et al.*, 2004; Jensen & Lauridsen, 2007). Además, en los estudios *in vivo* hay que tener en cuenta que la influencia de la absorción y retención diferencial de estereoisómeros afecta a la disponibilidad de cada compuesto, junto con el tiempo transcurrido (Blatt *et al.*, 2004).

El α T, como se comentó anteriormente, es una sustancia altamente lipófila y muy insoluble en agua, lo que repercute negativamente en su biodisponibilidad. A ello se le añaden otros factores externos como la luz, el calor o el oxígeno, así como factores relacionados con la absorción, como la cantidad de grasa presente en la dieta y la competencia por el transporte con otras vitaminas liposolubles (Bowman *et al.*, 2001). Todo ello da lugar a una alta variabilidad en cuanto a la cantidad de α T que finalmente llega a sangre (Hsu *et al.*, 2019) y a la necesidad de tener en cuenta estas variables a la hora de elegir la vía de administración.

La vía oral es la vía de elección a la hora de realizar la administración de la mayoría de los compuestos, ya que es segura, cómoda, sencilla, barata, reduce la transmisión de enfermedades y no requiere asistencia médica (Lambkin & Pinilla, 2002; Nguyen *et al.*, 2016). Sin embargo, esta vía se ve ampliamente afectada por las barreras biológicas que componen el tracto gastrointestinal y que pueden repercutir negativamente en la biodisponibilidad de las sustancias que se ingieren. Entre los factores que afectan a la biodisponibilidad de los compuestos administrados vía oral encontramos los factores fisiológicos (como el efecto del primer paso, la ingesta conjunta con alimentos o la degradación enzimática) y los factores físico-químicos (como la influencia del pH, la solubilidad acuosa o la lipofilia) (Gibaldi *et al.*, 2007; Gabor *et al.*, 2010; Shahbazi & A. Santos, 2012; Pathak & Raghuvanshi, 2015).

Así pues, con el objetivo de superar las barreras biológicas que plantea la vía oral, se han desarrollado nuevos sistemas de administración de fármacos (o sustancias activas) que se definen como “una formulación o dispositivo que permite la introducción de una sustancia terapéutica en el organismo y mejora su eficacia y seguridad controlando la tasa, el tiempo y el lugar de liberación” (Jain, 2008). Entre sus ventajas, los sistemas de administración de fármacos pueden mejorar la solubilidad y la permeabilidad, además de evitar la degradación hidrolítica o enzimática del compuesto que se quiere administrar (Ganta *et al.*, 2010), es decir, ayuda a solventar los problemas farmacocinéticos y farmacodinámicos de las sustancias que se administran (Ghosh *et al.*, 2019).

En los últimos años, la nanotecnología ha ayudado ampliamente al desarrollo de nanoestructuras que mejoran la eficacia de los tratamientos orales, dirigiendo la liberación y aumentando la biodisponibilidad de sustancias liposolubles (Plapied *et al.*, 2011). Estas nanoestructuras proporcionan protección frente a las condiciones fisiológicas del estómago y del intestino, mejorando la absorción intestinal. De esta manera se garantiza una absorción homogénea, y, por tanto, la llegada de una mayor cantidad del principio activo al torrente sanguíneo (Reinholz *et al.*, 2018). Una de las opciones para la administración de compuestos hidrofóbicos (que presentan baja biodisponibilidad oral y solubilidad) son los sistemas formulados a base de lípidos, como es el caso de las nanoemulsiones (Kumar *et al.*, 2019). Las nanoemulsiones son un sistema de dispersión coloidal termodinámicamente inestable de dos líquidos inmiscibles cuya estabilidad la determina un tensoactivo adecuado (Singh *et al.*, 2017; Jafari & McClements, 2018; Kumar *et al.*, 2019). Tienen forma de esfera y el tamaño oscila entre 10-1000 nm (Jaiswal *et al.*, 2015). Se ha visto que las nanoemulsiones aumentan la digestión, facilitan la absorción, aumentan la bioaccesibilidad y, por tanto, la biodisponibilidad del compuesto activo (Salvia-Trujillo *et al.*, 2017). Se han realizado varios estudios en los que se emplean nanoemulsiones para la administración de sustancias liposolubles con buenos resultados que evidencian sus propiedades (Yang & McClements, 2013; Sun *et al.*, 2014; Pathak & Raghuvanshi, 2015; Pangen *et al.*, 2018).

En este sentido, en nuestro grupo de investigación, Plaza-Oliver, M. y cols. formularon y caracterizaron nanoemulsiones de aceite de soja cargadas con α T y

evaluaron su bioaccesibilidad *in vitro* (Plaza-Oliver *et al.*, 2015). Los resultados mostraron que la nanoemulsión diseñada tenía gran afinidad por el α T, con una eficacia de encapsulación cercana al 90 % y una bioaccesibilidad cercana al 70 %, lo que la convierte en una candidata prometedora para llevar a cabo estudios *in vivo*.

Todo ello pone de relieve el papel beneficioso que pueden llegar a desempeñar los sistemas de administración de fármacos, como es el caso de las nanoemulsiones, a la hora de obtener mejores resultados, en términos de biodisponibilidad, con sustancias altamente lipófilas, como es el α T.

2.5. Determinación de α T mediante técnicas analíticas

La identificación, separación y cuantificación simultánea de moléculas de pequeño y mediano tamaño habitualmente se lleva a cabo mediante técnicas analíticas de separación instrumental. La determinación de α T mediante diferentes técnicas (ensayos biológicos, métodos físico-químicos y métodos espectroscópicos y cromatográficos) se ha realizado desde prácticamente su descubrimiento hasta la fecha de hoy y ha experimentado una gran evolución.

Centrando nuestro interés en la cromatografía, ésta tuvo su origen en el año 1903 de la mano de Tswett, M., cuando sus estudios le llevaron al diseño de un experimento en el que separó una muestra de pigmentos de clorofila en sus diferentes componentes mediante el uso de un tubo vertical relleno al que suministraba diferentes tipos de disolventes (Dores-Sousa *et al.*, 2019). Desde sus inicios, a principios del siglo XX, comenzó un fuerte e imparable desarrollo que, junto con los avances tecnológicos, revolucionó los métodos de análisis, convirtiendo a la cromatografía en una de las técnicas analíticas de separación más ampliamente usada en todos los campos de la ciencia, hasta la fecha.

La cromatografía se define, en términos generales, como un método de separación en el que la muestra se distribuye entre una fase estacionaria y una fase móvil que circula/pasa a través de la fase estacionaria. Aunque no es el único criterio de clasificación de modalidades cromatográficas, si se tiene en cuenta la naturaleza de la fase móvil podemos distinguir básicamente los siguientes tipos de cromatografía: cromatografía de gases (fase móvil gaseosa), cromatografía líquida (fase móvil líquida) y más recientemente se está consolidando la cromatografía de fluidos supercríticos (la fase móvil es un fluido supercrítico).

La presente Tesis Doctoral se desarrolló utilizando cromatografía líquida (LC, del inglés *Liquid Chromatography*), por lo que únicamente se profundizará en dicha modalidad cromatográfica. Dado que tanto la terminología como los parámetros cromatográficos están totalmente establecidos desde hace años, esta sección se detallará en profundidad en el ANEXO 1.

2.5.1. Cromatografía Líquida: fundamentos teóricos e instrumentales

Modalidades de la Cromatografía Líquida

La separación que tiene lugar en la cromatografía se debe a los principios físico-químicos que intervienen en el mecanismo de retención por el cual se produce la separación. Cabe destacar que, a pesar de que se describen por separado, durante la separación se pueden dar más de un mecanismo de retención. En la LC se conocen cinco clases principales de estos mecanismos en función de la naturaleza de la fase estacionaria que se quiera emplear:

- **Cromatografía de partición:** consta de una fase estacionaria que consiste en un recubrimiento líquido sobre un soporte sólido, de manera que la separación tiene lugar debido a la diferente solubilidad entre el líquido de la fase móvil y el de la fase estacionaria.
- **Cromatografía de adsorción:** en la cual la fase estacionaria está formada por un sólido con propiedades superficiales que permite interaccionar con los analitos presentes en la mezcla. Estas interacciones pueden deberse a fuerzas intermoleculares como las fuerzas de Van der Waals, fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, entre otras.
- **Cromatografía de cambio iónico:** cuya fase estacionaria es un sólido con sitios cargados (con carga positiva o negativa) y fijados que interaccionan con los iones que se encuentran en la muestra.
- **Cromatografía de afinidad:** en ella la fase estacionaria es un sólido con capacidad para unirse de forma muy específica y reversible a un analito. Este es el caso de los agentes bioquímicos de reconocimiento y sus ligandos, como los anticuerpos.

- ***Cromatografía de exclusión***: la fase estacionaria se encuentra formada por un sólido cuya porosidad permite la separación en función del tamaño de las moléculas.

De ellas, la *cromatografía de partición* es la modalidad que presenta mayor número de aplicaciones en el campo de la biofarmacia, medicina e incluso clínica, y fue la utilizada en la presente Tesis Doctoral. En la *cromatografía de partición* se incluyen otras dos modalidades de cromatografía en función de la polaridad que presentan la fase móvil y la fase estacionaria:

- ***Fase normal***, en la cual la fase móvil es apolar mientras que la fase estacionaria es principalmente polar.
- ***Fase reversa/inversa***, donde la fase móvil es polar y la fase estacionaria es apolar. Esta modalidad es la más empleada en la actualidad.

Preparación de muestras biológicas

Uno de los pasos previos al análisis cromatográfico es el **tratamiento de las muestras biológicas**. Este paso suele ser el más lento y uno de los que provoca mayor número de errores analíticos (Liang & Zhou, 2019), que serán más elevados cuanto mayor sea el número de pasos o etapas que lo compongan. Las etapas previas de tratamiento de las muestras no son obligatorias, pero se hacen prácticamente imprescindibles cuando se utilizan matrices altamente complejas cuya composición puede interferir en la determinación, como los fluidos y tejidos biológicos. Una de las consecuencias que puede aparecer si no se lleva a cabo este paso de forma eficiente, es el denominado *efecto matriz* (EM), que se define como la interferencia que pueden ejercer las sustancias presentes en la muestra (diferentes del analito de interés) en el análisis (Trufelli *et al.*, 2011). Por ello, en muchos casos, este paso es de especial relevancia, ya que ayuda a que la detección de los analitos mejore y, además, se protege la columna y el equipo de sustancias que se pueden acumular o interferir en el correcto funcionamiento del mismo (Zhang *et al.*, 2016). La técnica empleada para el tratamiento de la muestra estará condicionada por el origen y las características de la propia muestra. Entre las técnicas más comunes encontramos: los procesos de extracción (líquido-líquido, en fase sólida y de fluidos supercríticos), la precipitación de proteínas, la ultrafiltración, la microdiálisis, la dilución de la muestra o la reducción del volumen inyectado en el equipo o instrumento (aunque

estas dos últimas suelen ser críticas cuando las concentraciones del analito son muy bajas) (Trufelli *et al.*, 2011; van den Ouweland & Kema, 2012; Zhang *et al.*, 2016; De Nicolo *et al.*, 2017). En la selección del procedimiento a seguir, además de las propiedades físico-químicas de la muestra, pueden influir otros aspectos como el tiempo invertido en el procesamiento, el número de etapas, el uso de disolventes orgánicos altamente contaminantes, el presupuesto disponible o la experiencia del personal que ha de realizarlo. Para minimizar los errores sistemáticos que pueden producirse durante las etapas que componen el proceso analítico, como la toma y preparación de la muestra, los errores inherentes al equipo o las etapas que lo componen, se puede utilizar un **patrón interno** (IS, del inglés *Internal Standard*).

Un IS es un compuesto que se debe comportar de la misma manera que los analitos a determinar, no debe estar presente en la muestra y se tiene que añadir de forma controlada a todas las disoluciones patrones y muestras a determinar. El IS puede ser un análogo marcado con isótopos (deuterio, carbono 13 o nitrógeno 15), un análogo estructural no isotópico o un análogo estructural isotópico, entre otros, del compuesto que se quiere determinar (van den Ouweland & Kema, 2012; Khamis *et al.*, 2019). Debido a la dificultad para encontrar un IS adecuado, actualmente se suelen elegir los compuestos marcados isotópicamente ya que ofrecen la ventaja de que no se encuentran en la naturaleza debido a que son sintéticos. Además, emplear el mismo analito marcado con isótopos como IS garantiza un comportamiento cromatográfico muy similar al analito natural que el uso de un análogo estructural.

Instrumentación de la cromatografía líquida de alto rendimiento

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*) es uno de los avances más modernos de la LC en columna. Su desarrollo y aplicación se hizo entre los años sesenta y setenta (Dores-Sousa *et al.*, 2019), y el posterior avance de la industria y la tecnología la ha convertido en una de las técnicas analíticas de rutina en muchos laboratorios. HPLC permite la separación simultánea de los componentes que hay en una muestra haciéndola pasar junto con la fase móvil (un líquido presurizado) a través de una columna en la que se encuentra la fase estacionaria (que puede ser líquida o sólida) (Esteki *et al.*, 2019; Ahmad Dar *et al.*, 2020). Los componentes que integran un sistema cromatográfico HPLC (Figura 8) y se detallan a continuación.

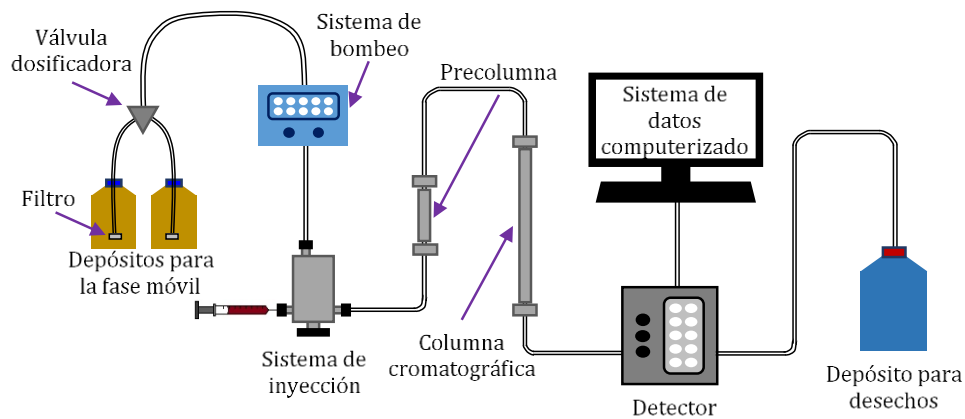


Figura 8. Esquema de los compones de un sistema HPLC.

Los **depósitos para la fase móvil** son los recipientes que contienen el disolvente o las disoluciones que van a integrar la composición de esta fase. Estos recipientes pueden ser de vidrio o de acero inoxidable y su número equivale al número de componentes de la fase móvil, que dependerá a su vez del número de bombas con las que cuente el equipo. Cuenta con filtros para eliminar las partículas que puedan encontrarse suspendidas en los disolventes (como polvo) y un sistema de desgasificación, basado en ultrasonidos integrados en la parte superior del sistema.

En cuanto al **sistema de bombeo**, su principal función es la de lograr que los componentes de la fase móvil pasen a través de la fase estacionaria pues, debido al empaquetamiento y el pequeño tamaño de partícula de las columnas, se debe aplicar una presión que facilite la circulación. Esta función ha de hacerla garantizando que las velocidades del flujo sean reproducibles, libres de las pulsaciones que se puedan generar y dentro de un intervalo de presiones controlado. Se conocen tres tipos de bombas en HPLC: bombas recíprocas o de vaivén (las más empleadas), bombas neumáticas o de presión constante y bombas de desplazamiento o tipo jeringa; permitiendo el número de bombas que compongan el sistema, trabajar en modo isocrático o gradiente de elución.

La principal función del **sistema de inyección** es la de suministrar la muestra a analizar en el equipo junto con la fase móvil para que llegue a la columna, sin que ello altere el flujo o la presión del sistema. Puede ser manual o automático, y el más utilizado por excelencia es el inyector de válvulas o de bucle. Una de las

grandes ventajas de los autoinyectores es la precisión y reproducibilidad de la inyección, la cual se realiza por medio de una aguja controlada por ordenador.

La **columna cromatográfica** es el lugar donde se aloja la fase estacionaria y, por tanto, donde realmente se lleva a cabo la separación cromatográfica. Las **precolumnas**, o también llamadas guardacolumnas, son columnas auxiliares que se disponen antes de la columna, y su función es la de filtrar (físicoquímicamente) la muestra antes de que llegue a la columna; de esta forma, se protege y alarga la vida útil de la columna.

El **detector**, es el encargado de recoger la información acerca de la composición/concentración presente en el flujo que pasa a través de él. La clasificación de los detectores es variada, aunque, de forma general, podemos encontrar *detectores ópticos*, en los que la radiación interacciona con los analitos (detectores UV-Vis, *diode array* (DAD), fluorímetros, refractométricos, polarimétricos y de *light-scattering*), *detectores eléctricos*, que miden propiedades eléctricas (electroquímicos y conductimétricos), *otros detectores específicos* (radiométricos y viscosimétricos) y *detectores híbridos*, en los cuales la muestra pasa a un segundo instrumento analítico (infrarrojos, resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas, entre otros).

El **registrador o sistema de datos computarizado** es indispensable hoy día para obtener la información deseada del análisis. Las estaciones de trabajo digitalizan la información proporcionada por el detector para su posterior tratamiento de datos a partir de los cromatogramas obtenidos. El avance tecnológico ha permitido el desarrollo de softwares que permiten controlar el equipo con todas las variables establecidas para el análisis, incluso en ausencia de un operador.

Cabe destacar la importancia del resto de elementos (como cables y tubos) que forman parte del equipo, así como del material con el que están hechos, y que contribuyen a un mayor rendimiento y una mayor vida útil del sistema.

Acoplamiento LC-MS

Durante mucho tiempo, HPLC ha permitido la separación y cuantificación de los analitos presentes en muestras de diferentes orígenes. Sin embargo, la

identificación de estos analitos se hace únicamente en base a su tiempo de retención (t_R), el cual depende de la naturaleza de la fase móvil, la fase estacionaria, la instrumentación empleada, etc. Esto supone que pueda existir la posibilidad de que existan moléculas similares (ya sea en estructura o en comportamiento cromatográfico) que induzcan a determinaciones erróneas.

El acoplamiento entre instrumentos de separación y equipos altamente cualificados para la identificación de analitos ha resultado en la obtención de potentes técnicas de identificación y cuantificación de moléculas de bajo-medio peso molecular que se hallan en muestras complejas.

La detección basada en la espectrometría de masas (MS) es una técnica de determinación muy poderosa que permite la identificación y cuantificación de una o varias moléculas en función de su relación masa/carga (m/z), previo proceso de ionización (negativa o positiva) y posterior separación por la acción de un campo magnético o eléctrico (Li *et al.*, 2019). La MS ha experimentado grandes avances con el paso de los años, pues inicialmente, el acoplamiento entre LC-MS presentaba el inconveniente de que la fase móvil al ser líquida afectaba al vacío del MS, lo que fue solucionado con el desarrollo de nuevas técnicas de ionización (van den Ouweland & Kema, 2012).

El uso de LC-MS se ha ido estableciendo poco a poco en los laboratorios hasta convertirse en una técnica de rutina que proporciona gran especificidad y sensibilidad en la determinación de analitos (Adaway & Keevil, 2012). Entre sus ventajas, además de su alta sensibilidad y especificidad (puede medir exactamente la masa molecular de los analitos), encontramos una gran aplicabilidad y versatilidad, ya que puede aplicarse en diferentes campos de estudio y con muestras altamente complejas, así como su elevada flexibilidad para adaptarse a las necesidades particulares de cada laboratorio (Vogeser & Seger, 2008). Todo ello permite que el análisis se produzca en tiempos relativamente cortos y proporciona una gran cantidad de información cualitativa y cuantitativa. Sin embargo, a pesar de las bondades del acoplamiento, también se pueden dar algunos efectos no deseados en las determinaciones dependiendo del tipo de analitos y muestras a analizar. Entre ellos, el EM de una muestra compleja puede interferir en la ionización del analito provocando que ésta se produzca en menor medida en comparación con la

ionización que se produce cuando el analito está disuelto en un disolvente puro, en lo que se conoce como supresión de iones (Matuszewski, 2006). Para corregir este EM se ha extendido el uso de IS marcados isotópicamente, sin embargo, en general suelen ser altamente costosos y no siempre se encuentran disponibles para todas las moléculas de interés analítico (Wang *et al.*, 2007). Además, se requiere, al igual que en otras técnicas analíticas, la estandarización y armonización de los procedimientos, previamente optimizados, que permitan comparar la información obtenida por diferentes laboratorios (Leung & Fong, 2014). Aun así, cada vez está más extendido el uso de esta técnica, tal y como indica el elevado número de artículos publicados en los últimos años sobre LC-MS.

De forma general, el análisis por MS se puede dividir en varias etapas principales. Tal y como se muestra en la Figura 9, la detección comienza con la introducción de la muestra en el primer componente del espectrómetro de masas, la fuente de ionización (o interfase). En la interfase la muestra es ionizada en un estado óptimo (en fase gaseosa, lo que implica que en la LC la fase móvil se tiene que vaporizar) (Matthiesen & Bunkenborg, 2013). El segundo componente, el analizador de masas, se encarga de separar y ordenar los iones en función de la relación m/z y el tercer, y último, componente, el detector, que genera una señal eléctrica (que puede ser amplificada) y proporcionará toda la información obtenida para su procesamiento y generación del espectro de masas (de Hoffmann, 2005). En el interior del equipo de MS se opera a un elevado vacío (10^{-6} - 10^{-8} torr) para evitar que haya partículas que puedan interferir en la medida de las moléculas ionizadas, así como garantizar el correcto funcionamiento del resto de elementos del equipo. El espectro de masas que se obtiene es un gráfico que indica la abundancia de los iones respecto a su relación m/z en forma de picos (Glish & Vachet, 2003).

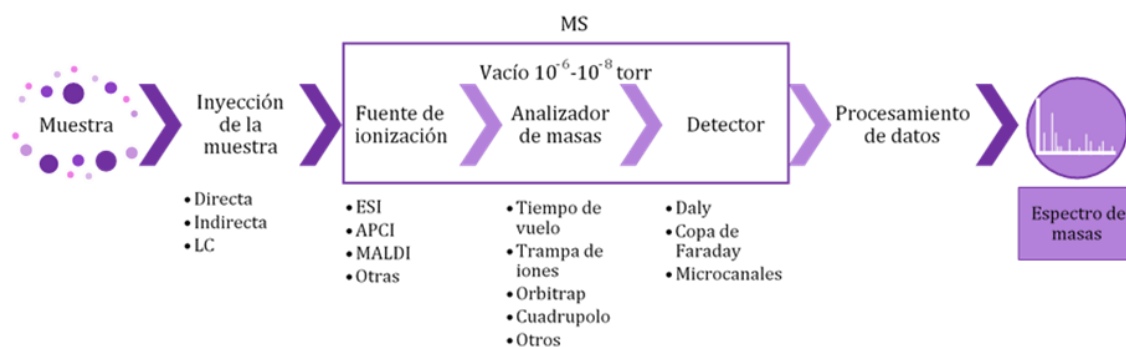


Figura 9. Etapas y componentes del análisis con MS. APCI: ionización química a presión atmosférica; ESI: ionización por electrospray; MALDI: desorción/ionización por láser asistida por una matriz.

A continuación, se detalla cada una de las etapas y componentes que conforman el detector de MS haciendo más hincapié en aquellas que están relacionadas con el tipo de detección y con las características del equipo que se utilizó en la presente Tesis Doctoral.

La **introducción de la muestra** en el sistema se puede llevar a cabo mediante sistemas indirectos (es el más simple, en el que la muestra es volatilizada externamente e introducida en la fuente de ionización), por sonda directa (introducción directa de pequeñas cantidades de sólidos y líquidos no volátiles en la fuente de ionización) y por sistemas de entrada cromatográficos (resultante del acoplamiento con técnicas cromatográficas como LC o la cromatografía de gases).

La **fente de ionización** constituye el primer paso en el análisis por MS, donde se forman los iones de la muestra en estado gaseoso. La fuente que se utilice dependerá del tipo de interfase cromatográfica y de la naturaleza de la muestra. Existen varios tipos de fuentes de ionización con diferente fundamento. Una clasificación es por *fuentes de ionización en fase gaseosa* y *fuentes de desorción*. En la primera, la muestra es volatilizada y luego se ioniza (muestras térmicamente estables). Mientras que, en la segunda, la muestra se transforma directamente en iones gaseosos (muestras líquidas o sólidas que son térmicamente inestables y no volátiles). Otra clasificación las divide en *fuentes agresivas*, aquellas que comunican suficiente energía a la molécula como para que además de la ionización se produzca una fragmentación de la estructura química, o *fuentes débiles*, donde se produce únicamente la ionización o bien muy poca fragmentación. Así, podemos encontrar la ionización por impacto de electrones, ionización química, fotoionización, bombardeo con átomos acelerados, ionización por campo, desorción por campo, fuentes MALDI (desorción/ionización por láser asistida por una matriz), ionización por termonebulización y desorción por plasma. En LC-MS la fuente de ionización más empleada es la ionización por electrospray (ESI), pues proporciona ionizaciones suaves, reproducibles y muy eficientes en un gran número de moléculas de pequeño-mediano tamaño; y la ionización química por presión atmosférica (APCI) (Himmelsbach, 2012). La ESI fue el modo de ionización empleado para el método analítico desarrollado en esta Memoria y, por ello, se describe a continuación.

La ESI se lleva a cabo a presión y temperatura atmosféricas. La muestra, disuelta en la fase móvil procedente del cromatógrafo, pasa por un capilar que se encuentra rodeado por un tubo capilar metálico, dispuesto coaxialmente, al que se le aplica un potencial eléctrico de 3-4 KV. Para facilitar la nebulización de la fase móvil cuando sale la muestra del tubo capilar, el gas desecante (nitrógeno comprimido) se introduce coaxialmente a alta velocidad. Esto da lugar a que la muestra salga del capilar con una forma cónica, llamada cono de Taylor (Figura 10), en cuya punta se forma una línea (o hilo fino) inestable. Este hilo se rompe y se forman gotas que se van haciendo más pequeñas a medida que la fase móvil se va evaporando. Esto genera que aumente la densidad de cargas en la superficie de las gotículas hasta que las fuerzas de repulsión igualan a la fuerza de la tensión superficial (se alcanza el límite de estabilidad o límite Rayleigh) y se produce una explosión coulombiana en la que se produce la fisión de las gotas haciéndolas aún más pequeñas (y cargadas) y provocando su dispersión en forma de niebla o aerosol (Kebarle & Verkerk, 2009). Este proceso se repite varias veces hasta que se obtienen los precursores de los iones en fase gaseosa.

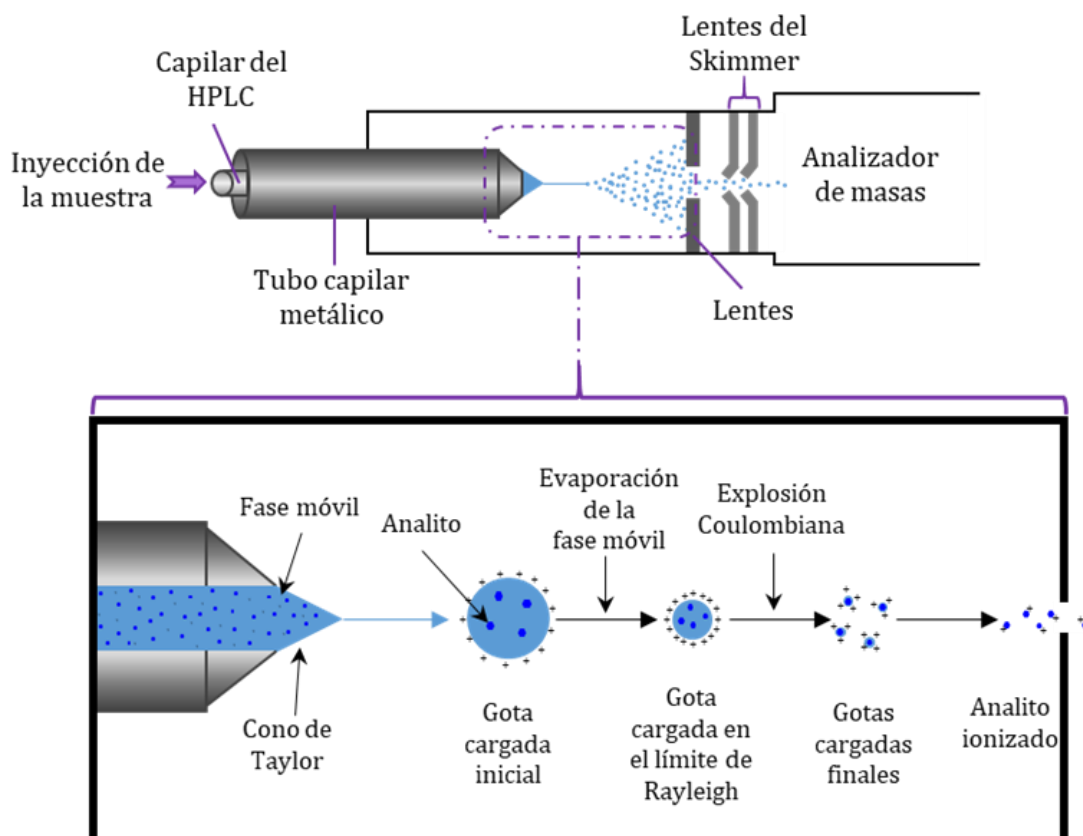


Figura 10. Fuente de ionización por ESI. La formación de los iones en estado gaseoso lleva una serie de pasos intermedios desde la formación del cono de Taylor hasta obtener los analitos ionizados.

La formación de los iones en estado gaseoso no está del todo clara, y se han propuesto dos mecanismos que intentan darle una explicación físico-química: el modelo de evaporación de iones (Iribarne, 1976; Thomson & Iribarne, 1979) y el modelo de residuos cargados (Dole *et al.*, 1968). La entrada al analizador se realiza por el skimmer, que posee un gradiente de potencial eléctrico que conduce y arrastra los iones por el campo eléctrico hacia el analizador. La ionización se puede realizar tanto en positivo como en negativo. Esta polaridad la determinará el voltaje aplicado en el capilar.

Tras la ionización, los iones llegan al **analizador de masas**. Aquí, los iones son separados en función de su relación m/z y conducidos en una dirección en concreto. Este punto es el más importante dentro del proceso de detección, ya que se pueden encontrar diferentes tipos de analizadores, entre los que encontramos: analizador de sector magnético, de tiempo de vuelo, de trampa de iones, trampa de iones lineal, de resonancia iónica en ciclotrón, orbitrap y cuadrupolo. La elección del tipo de analizador va a depender de las diferentes propiedades medidas durante la separación de los iones y del objetivo del análisis en términos de exactitud, sensibilidad y eficacia. El analizador cuadrupolo (Figura 11) es uno de los más empleados y consiste en cuatro barras cilíndricas que se disponen formando un ortoedro (o prisma rectangular). Un par de las barras opuestas reciben un voltaje positivo de corriente continua y otro voltaje de corriente alterna de radiofrecuencia, mientras que el otro par reciben los mismos voltajes, pero opuestos (corriente continua negativa y el de radiofrecuencia desfasado 180°). De esta manera se crea un campo eléctrico bidimensional. Así, los iones cuya relación m/z es seleccionada, pasan por el cuadrupolo trazando un movimiento helicoidal estable sin tocar en ningún momento las barras, hasta llegar al detector. Mientras que los iones que no son estables en el campo acaban colisionando con las barras, su carga se neutraliza y son arrastrados y eliminados por las bombas de vacío del MS (he aquí una de las razones por las que el vacío es tan importante). Por este motivo, el cuadrupolo también es conocido como “filtro de masas”. Este tipo de analizador es altamente reproducible, relativamente económico, fácil de manejar, compacto y fácil de acoplar a otros analizadores. A pesar de ello, puede tener una resolución limitada.

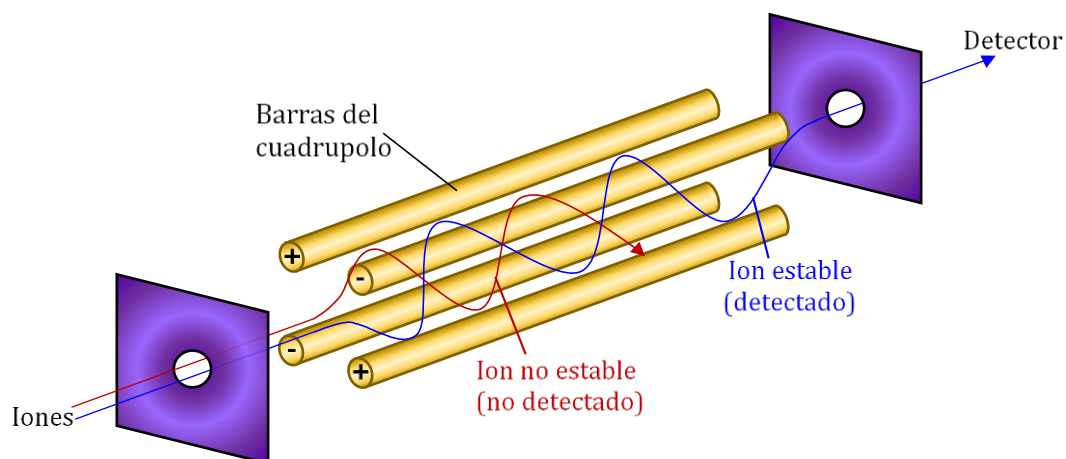


Figura 11. Esquema de un analizador de masas de cuadrupolo. Los iones estables pasan a través del cuadrupolo describiendo un movimiento helicoidal hasta llegar al detector. En cambio, los iones inestables son atraídos por las barras del cuadrupolo, colisionan con ellas y se neutralizan, tras lo cual son eliminados por el vacío existente en el sistema.

Por último, los iones llegan a los **detectores**, los cuales han de generar una corriente eléctrica proporcional al número de iones que llegan a éste que, posteriormente, puede ser amplificada. La información que proporcionan está relacionada con la relación m/z y la abundancia. Entre los detectores que se utilizan están la Copa de Faraday, del tipo fotomultiplicadores, de microcanales y Daly. Debido a la abundante información que proporcionan, así como el gran número de parámetros que pueden alterarse para obtener el análisis deseado, se requiere un **sistema informatizado** que permita controlar, registrar, almacenar y procesar los datos obtenidos en cada análisis para su posterior interpretación.

El desarrollo tecnológico ha permitido que el análisis mediante técnicas analíticas evolucione de tal forma que se adapte a las necesidades de cada laboratorio. A pesar de que el acoplamiento LC-MS proporciona buenos resultados en los análisis, la combinación de varios analizadores de masas ha contribuido a la caracterización, verificación y cuantificación de compuestos con gran selectividad en muestras complejas. En este sentido, la MS en tándem (MS/MS) une dos MS los cuales, a su vez, se unen de forma general por una cámara (celda de colisión) que provoca la fragmentación de las moléculas o compuestos. Así pues, el primer MS selecciona un ion con una m/z determinada, conocido como el ion molecular o ion precursor (que representa la molécula íntegra y cargada). En la celda de colisión se procede a la fragmentación del ion seleccionado, a partir del cual se obtienen los iones productos que son analizados por el segundo MS. El paso del ion precursor para obtener un ion producto se conoce también como transición (Adaway *et al.*,

2015). A este respecto, se puede llevar a cabo la monitorización o control de una única transición (SRM, del inglés *selected reaction monitoring*), o de múltiples transiciones, como ocurre cuando se utiliza el IS (MRM, del inglés *multiplex reaction monitoring*). La transición más abundante suele ser la usada para el análisis cuantitativo, mientras que el resto, al menos dos más, se emplean como parámetros cualitativos.

La unión de diferentes analizadores de masas da lugar a una gran variedad de combinaciones posibles en las cuales influirá el objetivo o aplicación que se quiere llevar a cabo. Una combinación muy empleada es la del triple cuadrupolo (QqQ), que consiste en utilizar tres cuadrupolos de forma secuencial. El primer cuadrupolo (MS1, Q₁) y el tercer cuadrupolo (MS2, Q₃) actúan como analizadores de masas normales, sin embargo, el segundo cuadrupolo (q₂) actúa como una celda de colisión (Figura 12). El QqQ se utiliza ampliamente como técnica de rutina en laboratorios industriales y en investigación básica debido a su alta selectividad.

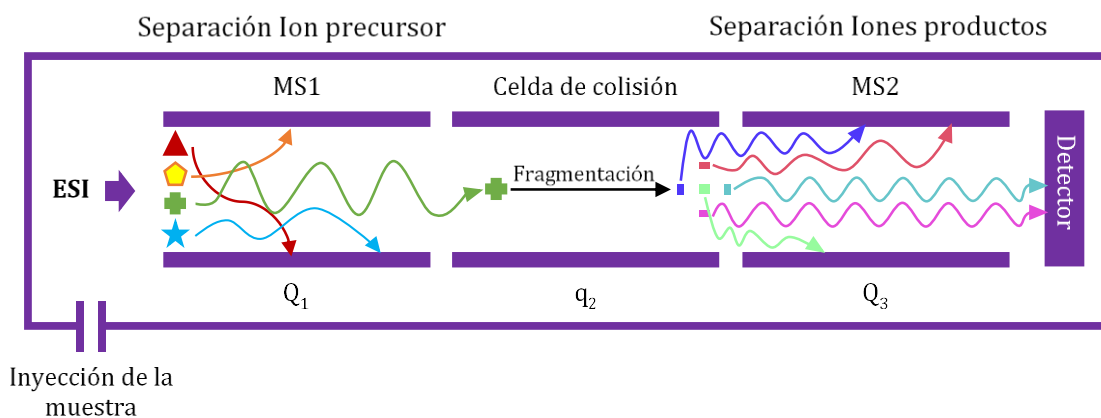


Figura 12. Estructura de un MS de QqQ. ESI: ionización por electrospray; MS1, Q₁: primer cuadrupolo; MS2, Q₃: tercer cuadrupolo; q₂: segundo cuadrupolo.

La bibliografía referente a esta sección (2.5.1. *Cromatografía líquida: fundamentos teóricos e instrumentales*) fue obtenida principalmente de libros especializados en análisis instrumental y otros recursos accesibles (Skoog *et al.*, 1997; Skoog *et al.*, 2000; Eitenmiller & Lee, 2004; Robledo, 2005; Luqu *et al.*, 2006; Alonso *et al.*, 2009; Gómez, 2010; Martín Gómez & Ballesteros González, 2010; Mikkelsen & Cortón, 2011; Robards *et al.*, 2012; de Hoffmann & Stroobant, 2013; de Marina Bayo *et al.*, 2016; Gross, 2017; Reuhs, 2017; Smith & Thakur, 2017; Harris, 2018).

2.5.2. *Evolución y estado del arte*

La determinación de la VitE ha evolucionado rápidamente a la par que el desarrollo tecnológico desde que ésta fue descubierta en 1922. En un artículo de revisión de 1980, Parrish, D. B. *y cols.* clasificaron los métodos para la determinación de VitE en tres grupos: ensayos biológicos, métodos físico-químicos y métodos cromatográficos (Parrish, 1980). Al principio, aunque la preferencia era utilizar métodos físico-químicos debido a que eran más específicos y, en general, mejores para llevar a cabo la determinación, no siempre fue posible emplear estos métodos. Por ello, las primeras determinaciones se realizaron mediante los ensayos biológicos. Posteriormente, la cromatografía de gases fue el método más popular, sobre todo a nivel industrial, ya que permitía cierta automatización, y también se puso de manifiesto la necesidad de preparar las muestras para eliminar las sustancias que pudieran interferir en las medidas. A pesar de ello, y de contar con tan sólo una veintena de artículos de HPLC en aquella fecha, Parrish, D. B. *y cols.* valoraron positivamente el uso de técnicas de HPLC en fase reversa para la determinación de vitaminas, y, en especial, de la VitE. Esto se debió a que la cromatografía de gases implicaba una mayor limpieza de las muestras, temperaturas elevadas (que producía la pérdida de analitos termolábiles) y la especificidad y sensibilidad eran menores.

La primera determinación de α T mediante HPLC se realizó entre 1971 y 1972 de la mano de Schmit, J. A. *y cols.*, y fue publicada en dos trabajos complementarios en los que se usaron la fase reversa, un IS de α T y la detección se hizo mediante UV a 254 nm (Schmit *et al.*, 1971; Williams *et al.*, 1972). Poco después, en 1973 y 1974, Van Niekerk, P. J. *y cols.* (Van Niekerk, 1973) y Calvins, J. F. (Cavins & Inglett, 1974) utilizaron la fase normal para la detección de todos los tocoferoles mediante fluorescencia. A partir de entonces, el HPLC y la detección por fluorescencia fue la técnica de elección para llevar a cabo las medidas de α T y el número de publicaciones creció considerablemente.

En 1989, Tan, B. y Brzuskiwicz, L. (Tan & Brzuskiwicz, 1989) publicaron un trabajo comparando los resultados del análisis de tocoferoles y tocotrienoles en fase normal y fase reversa. Aunque las separaciones eran buenas, la fase normal consiguió separar los isómeros β T y γ T, junto con el resto de tocoferoles en tiempos

relativamente cortos, unos veinte minutos (Tangney *et al.*, 1979; Micali *et al.*, 1993; Dionisi *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 1997), mientras que la fase reversa no lo logró (Rogers *et al.*, 1993; Sarzanini *et al.*, 1993; Schüep & Rettenmaier, 1994). Por este motivo, el uso de la fase reversa se limitó a aquellos casos en los que dicha separación no era estrictamente necesaria. Sin embargo, con el cambio de fase estacionaria y mediante varios ensayos, se consiguió separar dichos isómeros (Wahyuni & Jinno, 1988; Satomura *et al.*, 1992; Epler *et al.*, 1993; Richheimer *et al.*, 1994). Muchos de los métodos que se empleaban utilizaban fases móviles no acuosas en modo isocrático (Abidi, 2000; Heudi *et al.*, 2004; Vaule *et al.*, 2004) o de gradiente de elución (Hao *et al.*, 2005).

En cuanto a la detección en HPLC, se ha observado que los métodos más sensibles son la detección electroquímica, la fluorescencia, la absorbancia UV y la dispersión de luz por evaporación (de más sensible a menos), siendo la fluorescencia la más empleada por su selectividad, sensibilidad y especificidad en comparación con la UV (Abidi, 2000; Rupérez *et al.*, 2001). Actualmente, hay autores que siguen aplicando la detección de fluorescencia de UV para el análisis de diferentes muestras a pesar de que pueden darse interferencias con la matriz (Mazlan *et al.*, 2006; Semeraro *et al.*, 2009; Bakre *et al.*, 2014; Waniek *et al.*, 2017).

El acoplamiento entre la MS y el HPLC en el análisis de muestras complejas supuso una revolución, ya que no sólo se lleva a cabo la separación y la cuantificación, sino que además proporciona información acerca de la estructura o el peso molecular de los analitos, principal desventaja de los detectores anteriormente referidos. En este sentido, el desarrollo de las fuentes de ionización, entre las que destacan ESI y APCI, también contribuyeron al uso de esta técnica. Sin embargo, la mayor parte de las sustancias apolares no pueden ser ionizadas o el proceso es poco eficiente, ya que carecen de un sitio para la protonación o la desprotonación, y por ello, Rentel, C. y cols. idearon una forma de facilitar esta ionización (Rentel *et al.*, 1998). En su estudio, utilizaron iones de plata para obtener aductos de plata y tocoferoles que facilitarían la posterior ionización llevada a cabo por el equipo. Esta técnica, se conoció como aerosol de iones de coordinación, en la cual se añadía una sal metálica a la fase móvil y fue utilizada con éxito por otros autores (Strohschein *et al.*, 1999; Al-Talla & Tolley, 2005). La fase reversa ha sido

utilizada con buenos resultados en ESI y APCI, tanto en polaridad positiva como negativa (Lanina *et al.*, 2007). De hecho, estos autores observaron y compararon los resultados con ambas fuentes de ionización y ambas polaridades, y dedujeron que con la polaridad negativa se obtenían iones pseudo-moleculares que aportaban más sensibilidad al método que en modo positivo, el cual resultó ser ineficiente. La LC-MS/MS también ha evolucionado y se han validado métodos para la determinación de α T (Van Meulebroek *et al.*, 2012a; Karaźniewicz-Łada *et al.*, 2018). Así pues, el número de publicaciones y de métodos cromatográficos para la determinación del α T siguen aumentando y adaptándose a las necesidades de las investigaciones, teniendo en cuenta fundamentalmente el origen de las muestras y la aplicación final, entre otros aspectos.

3. Vitamina C

La Vitamina C (VitC) o AA fue aislada por primera vez por el científico húngaro Szent-Györgyi, A. en 1928 y la llamó “ácido hexurónico” (Szent-Gyorgyi, 1928). Poco después se descubrió su actividad frente al escorbuto y se denominó AA (Svirbely & Szent-Györgyi, 1932; 1933).

3.1. Aspectos generales

Estructuralmente, el AA es una lactona que se sintetiza a partir de glucosa. Se trata de una molécula altamente hidrosoluble, moderadamente soluble en etanol (EtOH) e insoluble en disolventes orgánicos. Además, es altamente sensible a la acción de agentes externos como la luz, el oxígeno, el calor y los iones metálicos, lo que ha llevado a muchos investigadores a realizar modificaciones de su estructura en un intento de aumentar su estabilidad (Toyoda-Ono *et al.*, 2004). Puede desempeñar el papel de donador de electrones o agente reductor, ya que puede ceder dos electrones evitando la oxidación de otros elementos, como proteínas o compuestos celulares, y que sean dañados debido a la oxidación. En condiciones fisiológicas el AA se encuentra en forma de anión ascorbato. La reacción por la cual se produce el intercambio de electrones implica la donación un electrón por parte del ascorbato formando el radical ascorbilo (cuya vida media es muy corta), éste a su vez puede ceder otro electrón obteniendo así ácido dehidroascórbico (DHA, del inglés *dehydroascorbic acid*) (Granger & Eck, 2018). Este último, se puede

transformar en ascorbato por acción de las enzimas o moléculas presentes en la célula para que pueda ser utilizada de nuevo (Granger & Eck, 2018).

Pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles esenciales, ya que, en algunas especies (como los primates, las cobayas y algunas especies más) el gen que codifica para la enzima encargada de llevar a cabo el último paso en la biosíntesis del AA, ha acumulado mutaciones en su secuencia génica provocando que no sea funcional, y, por tanto, hay que incorporarla en la dieta (Lykkesfeldt *et al.*, 2014). Como se verá más adelante, el déficit de esta vitamina en la dieta puede provocar graves daños en el organismo. En los seres vivos capaces de sintetizar la VitC, las rutas de síntesis están localizadas en el riñón, en el caso de los animales de órdenes taxonómicos más antiguos, o en el hígado, en el caso de mamíferos y aves (Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015).

La VitC se encuentra en una amplia cantidad de alimentos, fundamentalmente frutas y verduras, donde el contenido de VitC varía enormemente dependiendo del tipo y la especie, y también podemos encontrarla en cereales (Pallauf *et al.*, 2013). Son especialmente ricas en VitC las frutas cítricas, brócoli, coliflor, espinacas, patatas, kiwis, fresas, tomates y las verduras de hojas verdes. Las recomendaciones de ingesta diaria de AA son de 75 y 90 mg/día en mujeres y varones, respectivamente (Valdés, 2006).

Hoy día el escorbuto es una enfermedad conocida a nivel mundial por el gran protagonismo que recibió en las batallas navales y marítimas, cuyas fuerzas se vieron mermadas por la deficiencia de VitC (Harrison, 2012). Aunque en principio se demostró que los niveles necesarios para prevenir el escorbuto eran 10 mg/día, los niveles recomendados por las organizaciones de alimentos y salud son mucho mayores (Khalife *et al.*, 2019). Entre los signos y síntomas que caracterizan el escorbuto se encuentran la hipocondría, la depresión, hiperqueratosis perifolicular con pelos enrollados, encías hinchadas y friables, anemia, hemorragia petequiral, eritema y púrpura, artralgia y/o derrames articulares, ruptura de viejas heridas, sangrado en la piel y músculos, fiebre, dificultad para respirar, infecciones y confusión (Padayatty & Levine, 2016).

Tras su ingesta, la VitC se absorbe a nivel intestinal por distintos tipos de transporte. Debido a su carga y solubilidad, el transporte por difusión simple del

ascorbato y el DHA tiene lugar en muy pequeña proporción, llegando a ser en algunos casos insignificante (Wilson, 2005). Existen dos transportadores de VitC dependiente de sodio 1 y 2 (SVCT1 y SVCT2, del inglés *sodium-dependent vitamin C transporter*), que transportan ascorbato (transporte secundario activo dependiente de sodio saturable) con diferente localización tisular; mientras que SVCT1 se localiza en tejidos epiteliales, SVCT2 se encuentra en cerebro, músculo esquelético, placenta y ojo (Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015). Estos transportadores presentan diferentes afinidades por el ascorbato, siendo mucho mayor en SVCT1, lo que podría explicar la distribución diferencial en el organismo, ya que mientras que SVCT2 participaría en la regulación de las demandas locales de ascorbato, SVCT1 controlaría los niveles sistémicos (Wilson, 2005). La importancia de estos transportadores se puso de manifiesto tras la creación de ratones mutantes para ambos. En 2002, Sotiriou, S. y cols. generaron ratones SVCT2 (-/-), sin embargo, estos ratones sólo sobrevivieron unos minutos tras el parto, desarrollaron hemorragia cerebral y dificultad respiratoria, y los niveles de VitC en los órganos eran muy bajos (Sotiriou *et al.*, 2002). Los ratones heterocigotos, aunque sí fueron viables, presentaron niveles de VitC más bajos que el WT, pero mucho mayores en comparación con el KO. Más tarde, en 2010, Corpe, C. P. y cols. generaron ratones SVCT1 (-/-), los cuales, aunque fueron viables, perdieron la capacidad de reabsorber el ascorbato filtrado en los riñones, sus niveles en sangre y orina eran inferiores y aumentó la mortalidad perinatal en hembras deficientes de SVCT1 respecto a su WT (que fue contrarrestada cuando el ascorbato fue suplementado) (Corpe *et al.*, 2010). Sin embargo, los ratones heterocigotos presentaron niveles de ascorbato intermedios entre el KO y el WT, lo que detonaba la actividad parcial de SVCT1. No se observaron diferencias macroscópicas o histológicas en ratones de ambos sexos, KO, WT y heterocigotos de 12 semanas de edad para el análisis de diferentes tejidos como el hígado, riñón, piel, corazón, bazo, cerebro y médula espinal entre otros. Sin embargo, aunque la regulación de la homeostasis de la VitC está mediada fundamentalmente por SVCT1 y SVCT2, otros transportadores, como es el caso de los transportadores de glucosa (GLUT) podrían estar implicados. Estos GLUT pueden transportar DHA (mecanismo de difusión facilitado saturado en competencia con la glucosa) y su presencia puede ayudar a mantener los niveles de

ascorbato puesto que están presentes en las células endoteliales de la BHE y en astrocitos (Kocot *et al.*, 2017).

Una vez en el organismo la VitC presenta una distribución amplia, pudiéndose encontrar en niveles altos en las glándulas suprarrenales, los glóbulos blancos, el músculo esquelético y el cerebro, sobre todo en la glándula pituitaria (Verrax & Calderon, 2008). Debido a su naturaleza hidrofílica, una vez dentro de las células, el ascorbato queda retenido, y puede entonces desempeñar su función neutralizando radicales libres, de manera que el radical ascorbato que se genera se reduce de nuevo a ascorbato por acción de las enzimas presentes (May & Harrison, 2013). A pesar de la acción de los transportadores, su elevada hidrofilia le confiere un bajo tiempo de vida media, lo que evita que el organismo pueda almacenarlo durante tiempos prolongados (Zhang *et al.*, 2011).

Debido a su actividad antioxidante, se ha utilizado ampliamente en la industria farmacéutica y la cosmética, no sólo como principio activo, sino también como conservante (Toyada-Ono *et al.*, 2005). Más allá de su actividad antioxidante y protectora frente al daño oxidativo, la VitC participa en la síntesis de catecolaminas, carnitina, colágeno, mielina, colesterol, aminoácidos y péptidos hormonales, además de modular la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y colinérgica (Nualart *et al.*, 2012; Pallauf *et al.*, 2013). También se ha descrito que la VitC estimula la migración de neutrófilos al lugar de la infección, mejora la fagocitosis, la capacidad antimicrobiana y protege al organismo del daño inducido por antígenos extraños, revelando su papel beneficioso en el sistema inmune (Carr & Maggini, 2017). Otra de sus funciones es la de regulador epigenético, ayudando a las enzimas encargadas de controlar la metilación del ADN y las histonas, aunque no está claro el mecanismo (Gillberg *et al.*, 2018). Se ha asociado niveles bajos de AA en tejidos con procesos relacionados con el envejecimiento, aunque no están claros los mecanismos por los que se produce dicha disminución (Tan *et al.*, 2018). Así, se han encontrado niveles de AA reducidos en leucocitos y en corteza cerebral en individuos de edad avanzada (Tan *et al.*, 2018).

3.2. Transportadores de VitC a nivel cerebral

El contenido de ascorbato en neuronas es mucho mayor que en células gliales, esto podría estar relacionado con que la tasa metabólica en las neuronas es

mucho mayor, lo cual exigiría mayores niveles de antioxidantes como neuroprotección (Rice & Russo-Menna, 1997).

En roedores, el transporte de VitC a nivel cerebral es mediado principalmente por SVCT2, GLUT1 y GLUT3 (Castro *et al.*, 2001). En las neuronas, el transporte de AA es realizado por SVCT2, mientras que en las células gliales no se ha encontrado la presencia de este transportador (Marcos *et al.*, 2018); a pesar de que en las células endoteliales del tercer ventrículo, los tanicitos (células especializadas y localizadas en la zona hipotalámica), las células del plexo coroideo y la microglía sí se ha notificado su presencia (Figura 13) (García Mde *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2006). Además, se especuló que las células endoteliales podrían estar involucradas en el transporte de AA desde el LCR al tejido cerebral (Mun *et al.*, 2006). SVCT2 no se expresa en astrocitos, sin embargo, el ARNm de SVCT2 está presente y se induce su expresión en condiciones de estrés o lesión vascular (Berger *et al.*, 2003; Salazar *et al.*, 2018).

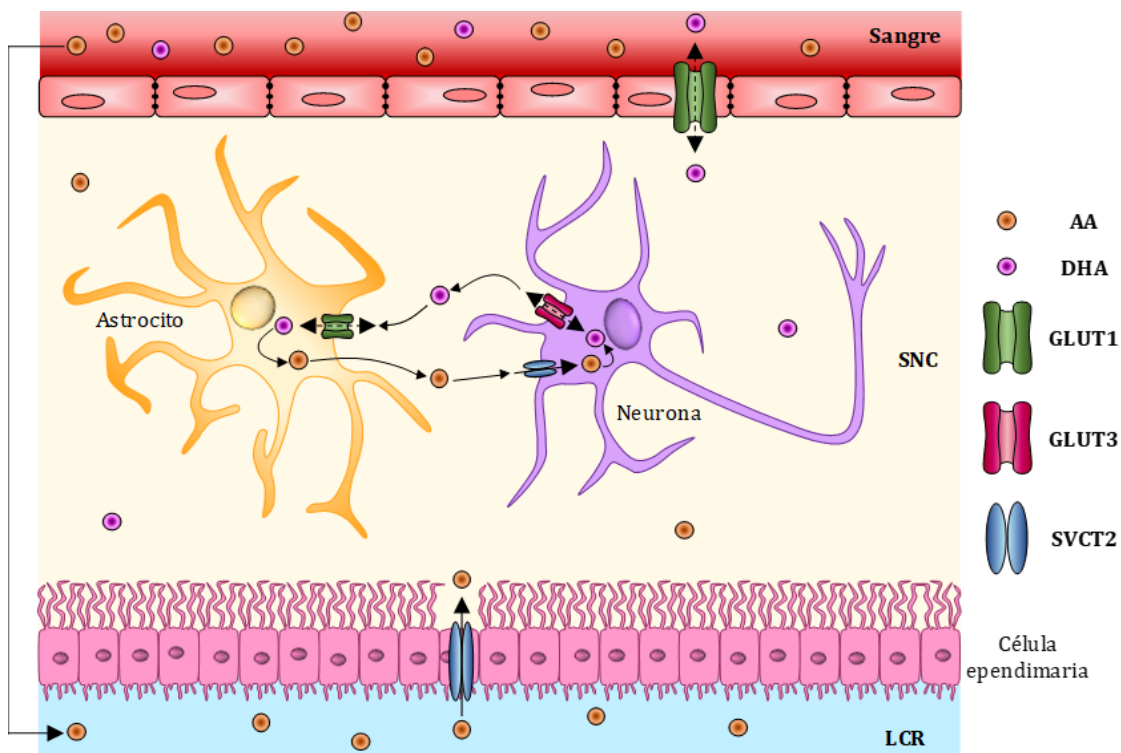


Figura 13. Transportadores y reciclaje de la VitC en cerebro. Mientras que el DHA llega al SNC por medio de GLUT1 desde la sangre, AA ha de llegar al LCR, donde por medio de SVCT2, presente en las células endoteliales, pasa al SNC. Una vez en el SNC, se produce el reciclaje de la VitC. El AA llega a las neuronas por medio de SVCT2, donde se genera DHA que vuelve a salir de la célula a través de GLUT3. El DHA puede ser incorporado entonces a los astrocitos a través de GLUT1, donde pasará de nuevo a AA que, por mecanismos aún por dilucidar puede volver a salir del astrocito. GLUT1/3: transportadores de glucosa 1 y 3; LCR: líquido cefalorraquídeo; SVCT2: transportador de vitamina C dependiente de sodio 2.

La ausencia de SVCT2 en las células endoteliales capilares que están implicadas en la BHE supone que no participa en el transporte de ascorbato al SNC por esta vía, y que dicho transporte se realiza en dos pasos: del plasma al LCR (que presenta mayores niveles de ascorbato que en plasma), a través del epitelio del plexo coroideo, y del LCR a las neuronas a través de las células ependimarias (Qiu *et al.*, 2007).

Por otro lado, GLUT1 y GLUT3, median el transporte de DHA que posteriormente pasa a AA y queda retenido en la célula. GLUT1 está presente en las células endoteliales vasculares que están implicadas en la BHE, sin embargo, este transporte es muy inferior comparado con el del ascorbato (posiblemente porque compite con la glucosa), salvo en condiciones de estrés (Qiu *et al.*, 2007). Mientras que GLUT1 media el paso de DHA a los astrocitos, GLUT3 lo hace en la neurona. Aunque esta afirmación está contrastada por varios estudios y se conoce el mecanismo, algunos autores apuntan que tanto GLUT1 como GLUT3 están en neuronas y astrocitos (Nualart *et al.*, 2014; Garcia-Krauss *et al.*, 2016), no obstante sería necesario más estudios para esclarecerlo.

Los niveles de AA y DHA de las neuronas y los astrocitos interaccionan para reciclar los niveles de VitC en el modelo de efecto espectador: en la neurona el AA se oxidaría a DHA, este sería liberado al medio extracelular y sería absorbido por los astrocitos (célula espectadora), donde se generaría de nuevo AA, que saldría de nuevo al medio extracelular (aunque se desconoce el mecanismo) y podría entrar en las neuronas cerrando el ciclo (Nualart *et al.*, 2014).

4. VitE y VitC: acción sinérgica y controversia

La VitE y la VitC son las representantes más relevantes de las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, respectivamente. Las propiedades físico-químicas opuestas que las caracterizan, podría implicar un papel complementario de ambas.

En este sentido, la combinación de VitE y VitC, en condiciones de estrés, presenta un efecto sinérgico, ya que, en estudios *in vitro* e *in vivo*, el α T, en presencia del ascorbato, se regenera, prolongando y aumentando así su efecto protector antioxidante (Igarashi *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 2001). De esta manera, cuando α T se oxida y forma el radical tocoferoxilo (que puede provocar graves daños en la peroxidación lipídica), el AA lo reduce de nuevo a α T y se forma el DHA, que puede

ser reciclado por los sistemas enzimáticos de la célula, como se ha comentado anteriormente, o puede ser eliminado (Figura 14) (Kocot *et al.*, 2017).

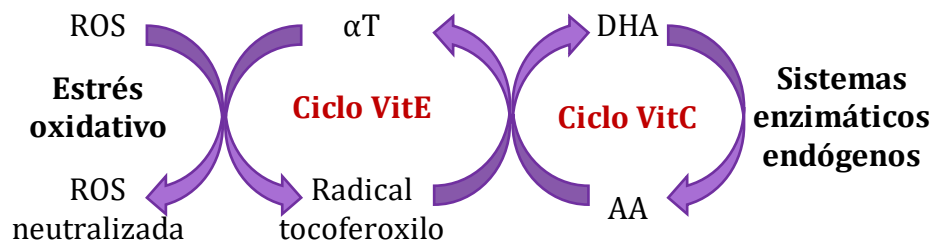


Figura 14. Reciclaje de VitE y VitC en el organismo. α T: α -tocoferol; AA: ácido ascórbico; DHA: ácido dehidroascórbico; ROS: especies reactivas de oxígeno; VitC: vitamina C; VitE: vitamina E.

En el estudio de Li, X. *y cols.* en células neuronales se demostró el papel de regeneración de α T a partir de ascorbato (Li *et al.*, 2003). Para ello, incubaron las células con α T y así aumentar los niveles intracelulares, tras lo cual, el medio extracelular fue retirado (y con ello el α T extracelular) y fueron sometidas a estrés. La incubación con ascorbato sometida a estrés reveló que las concentraciones de α T se mantenían estables frente al control, mientras que en ausencia del ascorbato los niveles de α T se reducían un 50 %. Estos resultados ponen de manifiesto el papel neuroprotector del ascorbato en beneficio del α T. En el estudio de Arzi, A. *y cols.* se administraron de manera crónica ambas vitaminas en ratones jóvenes y de mayor edad (Arzi *et al.*, 2004). Sus resultados mostraron que en el grupo de edad avanzada se produjo una mejora significativa en la memoria, evaluada mediante el test de evitación pasiva. Otros estudios, tanto *in vitro* como en animales de experimentación, han reportado mejoras en los cambios asociados al envejecimiento (para revisión ver (Gonzalez-Fuentes *et al.*, 2018)).

Contrario al efecto beneficioso que podría suponer administrar conjuntamente ambos compuestos, se ha de tener en cuenta el efecto prooxidante descrito en muchos antioxidantes, y en concreto, el de la VitE y VitC. Los prooxidantes, al contrario que los antioxidantes, inducen el estrés oxidativo (Sotler *et al.*, 2019). En condiciones normales, el ascorbato es un potente antioxidante que se oxida para reducir los radicales libres o especies reactivas. Sin embargo, a elevadas dosis o en situaciones de elevado estrés (como la presencia de iones metálicos) su forma oxidada, el DHA, actúa como un prooxidante lesionando las estructuras celulares si no es reducida inmediatamente (Schwartz, 1996). Esto mismo ocurre con el α T, cuya forma oxidada, el radical tocoferoxilo, actúa como un

radical libre induciendo lesiones si no es neutralizado cuando se administra a elevadas dosis y en presencia de elevado estrés o de iones metálicos (Schwartz, 1996). Se cree que en estos casos la dosis-efecto juega un papel relevante, aunque no está del todo claro ya que los mecanismos, dosis e influencia de factores externos no están definidos por completo (Pawlowska *et al.*, 2019). Además, se ha de tener en cuenta que algunos estudios en humanos en los que se administran una de las dos vitaminas o ambas, presentan resultados controvertidos respecto a las enfermedades cardiovasculares, al rendimiento del ejercicio con el envejecimiento, en la enfermedad de Alzheimer, el envejecimiento y las enfermedades asociadas al mismo (Nikolaidis *et al.*, 2012; Mock *et al.*, 2017; Gonzalez-Fuentes *et al.*, 2018) (Boothby & Doering, 2005; Ashor *et al.*, 2015).

Así pues, se requiere un mayor número de estudios que ayuden a dilucidar los roles de estas moléculas a nivel molecular y en estudios *in vivo*, donde la complejidad es mucho mayor y los efectos externos pueden influir notablemente, no sólo en el organismo sano, sino también en determinadas patologías.

OBJETIVOS

Dado el papel relevante que pueden llegar a ejercer ciertas sustancias activas, como son las vitaminas en el organismo, respecto al envejecimiento y a los procesos patológicos que derivan de ello, se plantean los objetivos de la presente Tesis Doctoral:

- Analizar cualitativamente mediante IHQ el patrón de distribución cerebral de α TTP y SVTC2 en el modelo de ratón Pol μ con diferentes genotipos y edades.
- Desarrollar un método analítico, optimizado y validado para la determinación de α T en diferentes formas farmacéuticas y muestras biológicas complejas mediante LC-ESI-MS/MS (doble detección DAD).
- Administrar y obtener la cinética de distribución de α T en sangre y tejidos tras una administración oral puntual de α T libre y α T nanoemulsionado en ratones C57BL/6J.
- Administrar α T nanoemulsionado en el modelo de ratón de senescencia SAMP8 y su control, SAMR1, y cuantificar los niveles de α T en sangre y tejidos.
- Comparar los resultados obtenidos tras la administración de α T nanoemulsionado en los diferentes modelos de roedores utilizados, C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos animales

En el presente trabajo se emplearon un total de 157 ratones de diferentes edades, sexo y cepa, en función del estudio. La distribución detallada de cada grupo de animales se especificará en el diseño planteado para cada experimento.

Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura y humedad (20-24 °C y 45-65 %), aire filtrado HEPA, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y en racks de alojamiento ventilados en el estabulario de la Facultad de Medicina de Albacete (UCLM). Salvo en el estudio cinético, todos ellos tuvieron libre acceso al pienso (Envigo RMS Spain S.L.) y agua (desclorada, filtrada y tratada con luz UV) durante su estancia en el estabulario.

La manipulación y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices aprobadas por el Comité de Ética en Experimentación Animal (CEEA) de la UCLM (PR-2016-05-13; PR-218-05-09; PR-217-05-14). Todos los estudios llevados a cabo cumplen con la normativa estatal (RD 53/2013) y europea (directiva 2010/63/UE).

1.1. Modelo murino C57BL/6J

Los ratones C57BL/6J forman parte de una subcepa de los ratones C57BL/6, que proceden originalmente de los C57BL desarrollados por Little, C.C. en 1920.

Se utilizaron 72 ratones macho C57BL/6J con una edad comprendida entre los 8 y 10 meses. Los ratones utilizados fueron adquiridos con 5 meses de edad (Charles River Laboratories, France), y alojados en las instalaciones del estabulario de la Facultad de Medicina de Albacete (UCLM) hasta alcanzar la edad adecuada para poner en marcha los experimentos.

1.2. Modelo murino de envejecimiento retardado Pol μ

Los primeros reproductores de este modelo fueron cedidos por el Dr. Antonio Bernard, del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) de Madrid. Los reproductores y la colonia se mantuvieron en el estabulario de la Facultad de Medicina de Albacete (UCLM) hasta la finalización de los experimentos. Para el mantenimiento de la colonia, se obtuvieron camadas estables de los tres genotipos posibles (*WT*, *KO* y heterocigoto). Se utilizaron un total de 69 ratones de esta cepa de ambos sexos. Se incluyeron animales de 4, 12, 18 y 24 meses de edad.

1.3. Modelo murino de envejecimiento acelerado SAM

Las cepas SAM procedentes de Takeda Chemical Ltd. fueron adquiridas por Harlan en 2002, que posteriormente se convirtió en Envigo en 2015.

Durante el desarrollo de los experimentos de la presente Tesis Doctoral se seleccionaron las cepas SAMP8, como modelo de envejecimiento acelerado, y SAMR1, como cepa control de envejecimiento normal. Las parejas reproductoras de ambas cepas fueron obtenidas con 4 semanas de edad (Envigo RMS Spain S.L.). La colonia se mantiene en el estabulario de la Facultad de Medicina de Albacete (UCLM). Se utilizaron un total de 16 ratones SAM (8 ratones SAMP8 y 8 ratones SAMR1) de 9 meses de edad.

2. Diseño experimental

2.1. Análisis de la expresión de los transportadores α TTP y SVCT2 en el cerebro del modelo murino Pol μ

Se utilizaron un total de 60 ratones macho Pol μ divididos en 3 grupos por genotipo (+/+; +/- y -/-). Cada genotipo se dividió a su vez en 4 grupos de edad, 4, 12, 18 y 24 meses ($n = 5$).

2.1.1. Genotipado de Pol μ

El genotipado de los ratones se realizó 10 días después del nacimiento de cada camada por medio de la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*). El proceso completo implica cuatro pasos principales: extracción del ADN genómico, cuantificación del ADN obtenido, PCR y electroforesis en gel de agarosa.

Para obtener el ADN se utilizó un kit de extracción E.Z.N.A. Tissue DNA de OMEGA BIO TEK (Norcross, GA), que permite la obtención de ADN genómico a partir de los fibroblastos de la cola del ratón. El ADN obtenido, ya purificado, se almacenó a -20°C hasta su uso.

La cuantificación de ADN se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher scientific, Waltham, MA, USA) que permite la medida de absorbancia (A) a 260 y 280 nm en UV-Vis de microvolúmenes. Para que la cuantificación sea óptima la relación $A_{260/280}$ ha de ser 1.8. Este paso es necesario

debido a que se necesitan 50 ng/ μ L de ADN para poder determinar la presencia o ausencia de Pol μ .

La PCR se realizó con 3 oligonucleótidos que desempeñan la función de cebadores (*primers*) y que poseían la siguiente secuencia:

- *Primer 1* - 2486: 5' GGC CTG TCA CAG TGC AAT AA 3'
- *Primer 2* - 3149: 5' GGC TCA GCT ACC TGC AAA AA 3'
- *Primer 3* - ppNT: 5' GTA GCG CCA AGT GCC AGC 3'

El *primer 1* y *2* amplifican el alelo WT, mientras que para el alelo mutado amplifican el *primer 2* y *3*. Las condiciones para llevar a cabo la PCR fueron las que se muestran en la Figura 15 (Lagartos, 2013):

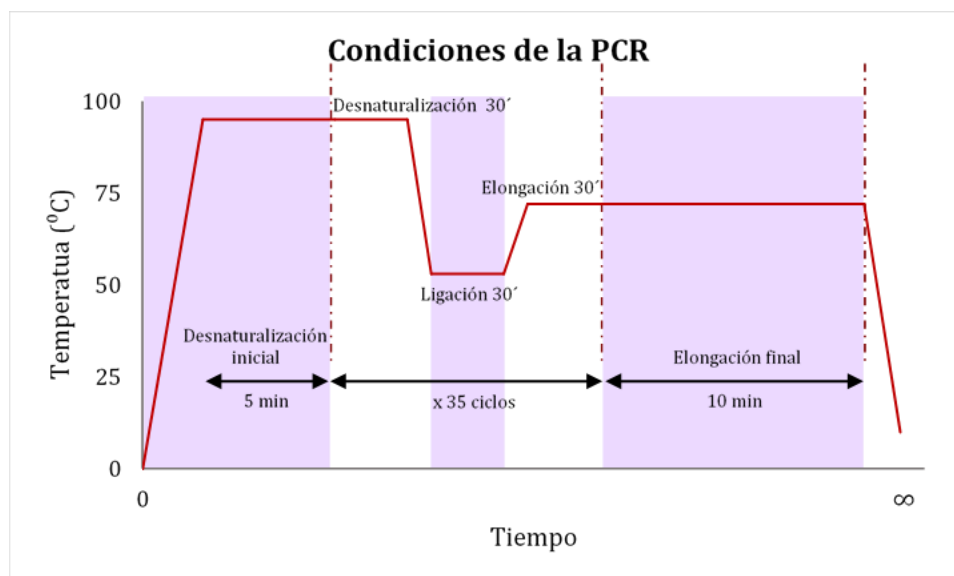


Figura 15. Desarrollo de la PCR para la determinación del genotipo de animales Pol μ . Primero se produce la desnaturalización del ADN, tras lo cual los cebadores se unen a las cadenas del ADN durante la ligación. En la extensión se produce la síntesis de ADN. Estos tres periodos se realizan durante varios ciclos para obtener un mayor número de copias del ADN.

Se utilizó la técnica *Hot Start* PCR que reduce la amplificación no específica, ya que las polimerasas utilizadas con esta técnica no reaccionan a temperatura ambiente. En último lugar, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se examinó bajo luz UV mediante un transiluminador (MultiDoc-It Imaging System by UVP, CA, USA) acoplado a una cámara, por el cual se pudo hacer una fotografía del gel analizado (Figura 16).

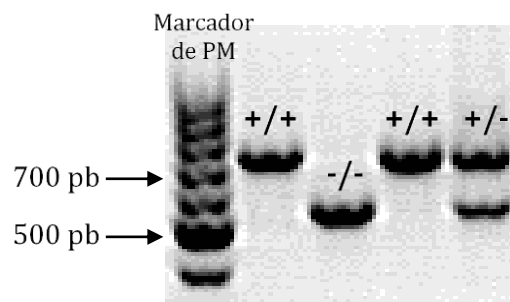


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa. El gen de la polimerasa tiene 670 pares de bases (pb), sin embargo, cuando éste es mutado tiene 460 pb. En la imagen se muestra el resultado del genotipado para diferentes expresiones de la polimerasa μ : WT (+/+), KO (-/-) y heterocigoto (+/-), donde uno de los dos alelos del gen está mutado. PM: peso molecular.

2.1.2. Perfusión intracardíaca

La perfusión se realizó en ratones que previamente habían sido anestesiados con una dosis de ketamina/xilacina (75 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xilacina) por vía intraperitoneal. Para la perfusión se utilizó solución salina al 0.9 % a 20 °C que se hizo circular durante 5 min, seguido de 20 min con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % en tampón fosfato (PB, del inglés *phosphate buffer*), pH 7.4 con ayuda de una bomba peristáltica Gilson (MINIPULS® 3) a una velocidad de 20 r.p.m. (Marcos *et al.*, 2018).

Una vez finalizada la perfusión, el cerebro fue extraído y sumergido en PFA al 4 % durante 24 h a 4 °C para su postfijación. Transcurrido este tiempo, el cerebro es crioprotegido por inmersión en una solución al 30 % de sacarosa en tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*) 0.1 M, pH 7.4 a 4 °C. El cerebro estará listo para ser procesado cuando se hunda en la solución.

2.1.3. Procesamiento del tejido cerebral perfundido

Antes de obtener las secciones del tejido, los hemisferios cerebrales se separan del cerebelo y se seccionan por la línea interhemisférica.

La obtención de secciones a partir de los cerebros que fueron perfundidos se realizó por medio de un micrótopo de deslizamiento acoplado a una unidad de congelación (Microm HM430; Heidelberg, Alemania), donde la temperatura de congelación osciló entre los -18 y -24 °C. Las secciones de ambos hemisferios se realizaron a 50 μ m de espesor. El hemisferio izquierdo fue cortado siguiendo el plano coronal, mientras que el hemisferio derecho fue cortado siguiendo el plano sagital.

El almacenamiento de las secciones realizadas se hizo de tal manera que los cortes fueron divididos en 10 series como se muestra en la Figura 17. Las secciones que corresponden a la serie 5 y 10 se montaron en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar. Estas secciones se utilizaron para realizar la tinción de Nissl, por lo tanto, entre cada sección de cada serie de tionina hay 200 μm . El resto de las series se conservaron en líquido de recogida de cortes (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.2. C. Líquido de recogida de secciones*”) y se utilizaron para hacer IHQ. En este caso, entre las secciones de una misma serie de IHQ hay 500 μm .

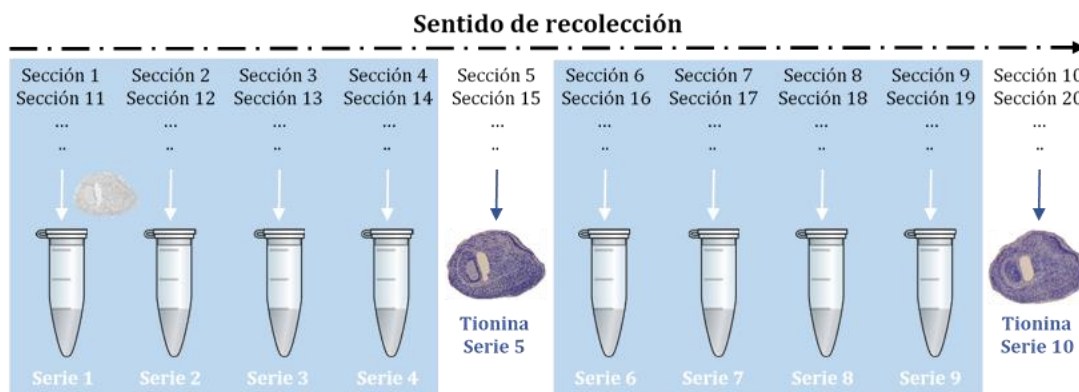


Figura 17. Esquema de la disposición y almacenamiento de las series a partir de las secciones cerebrales obtenidas en el micrótopo de congelación. El tejido fue almacenado en series que serán destinadas a realizar diferentes IHQ. Las secciones que corresponden a la serie 5 y 10 fueron montadas en un mismo portaobjetos para realizar la tinción de Nissl.

2.1.4. Tinción de Nissl

La tinción de Nissl consiste en el uso de un colorante acidófilo (azul de toluidina, azul de metileno, tionina o violeta de cresilo) que interacciona con los ácidos nucleicos. En consecuencia, se tiñe el núcleo y el retículo endoplásmico rugoso de las células. Esta técnica se utiliza principalmente para evaluar la citoarquitectura de las secciones teñidas.

El protocolo comienza con la inmersión de las secciones en dos baños sucesivos de 30 min de duración en una solución de EtOH absoluto y cloroformo (1:1). Posteriormente se procede a la rehidratación progresiva de las secciones por medio de baños en disoluciones de EtOH con una concentración decreciente (100 %, 96 %, 80 %, 50 %). La hidratación terminó con dos baños en agua destilada. Después se sumergieron las secciones en una solución acuosa de tionina, tras lo cual se procedió a dar dos baños de agua destilada, para eliminar el exceso de colorante, y a la deshidratación de las secciones de forma inversa a la hidratación (Figura 17).

Por último, se sumergieron las secciones en xilol y se cubrieron con resina sintética DPX para almacenarlas hasta su posterior uso.

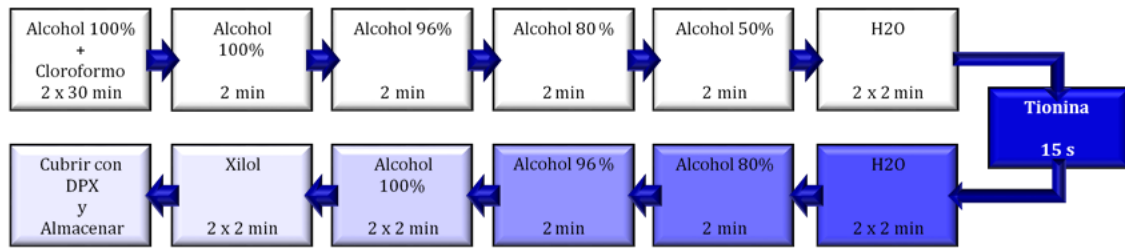


Figura 18. Tinción de Nissl. DPX: resina sintética DPX.

2.1.5. Inmunohistoquímica

La IHQ es una técnica que permite la detección de un antígeno mediante el uso de un anticuerpo específico capaz de reconocerlo en una muestra de tejido. Este método no sólo permite detectar la presencia o no del antígeno, sino que también proporciona información acerca de la localización y distribución precisa del antígeno estudiado. Para que la inmunorreacción sea visible, se utiliza un anticuerpo secundario conjugado con biotina o con un fluorocromo. En el caso de que el anticuerpo secundario se encuentre biotinilado, reacciona con estreptavidina conjugada a HRP (*horseradish peroxidase*) que, a su vez, reacciona con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y agua oxigenada formando un precipitado marrón insoluble en EtOH.

Todos los anticuerpos utilizados en el estudio, así como las disoluciones empleadas para realizar las IHQ se detallan en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.1. Reactivos y disolventes*”.

A. Inmunohistoquímica simple

Se realizaron estudios independientes frente a los transportadores de VitE (α TTP) y VitC (SVCT2) en series completas de secciones coronales y sagitales. Se hicieron también los controles necesarios para evaluar la especificidad de los anticuerpos en los que, siguiendo el mismo protocolo que se especifica a continuación, omitiendo el anticuerpo primario o secundario, en las incubaciones respectivas.

La IHQ se realizó en flotación, siguiendo una técnica similar a la descrita por Marcos, P. y cols. y Cebada-Sánchez, S. y cols. (Marcos *et al.*, 2013; Cebada-Sanchez *et*

al., 2014). Todos los lavados e incubaciones se llevaron a cabo en agitación suave. Inicialmente las muestras fueron lavadas con tampón Tris salino (TBS, *tris buffered saline*) 0.1 M, pH 7.6, que fue el tampón de base en los distintos lavados e incubaciones. A continuación, se realizó la reducción de peroxidasas endógenas, para lo cual se incubaron las secciones con una mezcla de agua oxigenada y metanol (1:2) durante 20 min en oscuridad. Este es un paso clave, ya que la inactivación de las peroxidasas endógenas evita la interacción de estas con las peroxidasas exógenas utilizadas en el proceso catalítico en la fase final de la IHQ. Finalizado este proceso, las muestras se lavaron de nuevo en TBS y se incubaron con el tampón de bloqueo (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.2. A. Tampones*”) durante 5 min a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios fueron diluidos en el tampón de bloqueo, siendo la dilución de 1/100 para α TTP y SVCT2. Este tampón ayuda a evitar que se produzcan uniones inespecíficas de los anticuerpos y facilita su acceso al tejido. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó durante toda la noche a 4 °C y en agitación suave.

Transcurrido este período, las secciones se lavaron con TBS y tampón de bloqueo, para ser de nuevo incubadas durante 90 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, diluido 1/2000 (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.1. Reactivos y disolventes*”). A continuación, el tejido fue lavado de nuevo con TBS y tampón de bloqueo e incubado 90 min a temperatura ambiente con estreptavidina conjugada con peroxidasa, diluida 1/2000. Para el revelado, el tejido se lavó de nuevo con TBS y con TB 0.05 M, pH 7.6, y se incubó con una disolución de DAB añadiendo 1 μ L de peróxido de hidrógeno por cada mL de DAB disuelto en TBS 0.5 M, pH 7.6. La intensidad de la inmunorreacción (IR) se supervisó con un microscopio Nikon Eclipse Ni-E (Nikon Instruments Inc., NY, USA). La reacción se paró con lavados de PB 0.1 M, pH 7.6, tras lo cual, las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas mediante inmersión en concentraciones crecientes de EtOH acabando con una inmersión en xilol. Una vez deshidratadas las secciones se cubrieron con DPX y se almacenaron hasta su análisis.

B. Inmunohistoquímica doble

Se realizaron IHQ dobles de SVCT2/ α TTP, SVCT2/GFAP, SVCT2/NeuN, α TTP/GFAP y α TTP/NeuN. El procedimiento aplicado a todas ellas es prácticamente el mismo, con variaciones puntuales en las concentraciones de los anticuerpos utilizados.

Los anticuerpos primarios que se usaron para SVCT2 y α TTP proceden de la misma especie. Esto plantea el inconveniente de que el anticuerpo secundario marcaría los anticuerpos primarios sin que pudiéramos distinguir el marcaje de cada transportador. Para poder realizar la inmunotinción doble, fue necesario llevar a cabo el procedimiento desarrollado por Marcos, P. y cols. (Marcos *et al.*, 1996; Marcos *et al.*, 2013). Primero se realizó la IHQ para el SVCT2, revelada con DAB. Sobre el mismo tejido, se realizó la IHQ frente a α TTP. Sin embargo, en este caso, el revelado se realizó con 4-cloro-naftol preparado en fresco (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.2. D. Revelado con 4-cloro-naftol*”). El proceso fue controlado con un microscopio Nikon Eclipse Ni-E (Nikon Instruments Inc., NY, USA). Finalizado el procedimiento, las muestras fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y secadas a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se cubrieron con una mezcla de PB y glicerol (1:3) y se guardaron hasta su uso.

Para el análisis de la posible colocalización de SVCT2/GFAP, SVCT2/NeuN, α TTP/GFAP y α TTP/NeuN, se realizó inmunofluorescencia con doble marcaje. El protocolo es similar al anterior, aunque en este caso la incubación con los anticuerpos primarios (cuya dilución fue de 1/200 para GFAP y 1/300 para NeuN) se realizó durante 48 h a 4 °C. Los anticuerpos secundarios en este caso estaban unidos a una molécula fluorescente, y no a peroxidasa. Las secciones se cubrieron con 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO), ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.2. E. DABCO*”, en portaobjetos gelatinizados.

2.1.6. Análisis de las secciones y obtención de resultados

El análisis de la distribución de α TTP y SVCT2 en el tejido se realizó mediante la observación directa y cartografía de las secciones, marcando la presencia (+) o ausencia (-) de dichos transportadores en cada área cerebral. La delimitación citoarquitectónica se realizó con la ayuda de las secciones adyacentes, teñidas con

tionina, siguiendo el atlas de Paxinos y Franklin “The mouse brain in stereotaxic coordinates” (Franklin & Paxinos, 2008).

El examen microscópico de las muestras reveladas con DAB se efectuó en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80-i (Nikon Instruments Inc., NY, USA) acoplado a una cámara digital. Los programas de imagen Adobe® PhotoShop® CS 8.0.1 y Canvas 11 Build 1173 fueron utilizados para modificar únicamente el brillo y el contraste de las imágenes obtenidas, permaneciendo el resto de los parámetros inalterados.

En el caso de las muestras reveladas mediante fluorescencia, el estudio de colocalización se realizó en un Microscopio Láser Confocal LSM Zeiss (Carl Zeiss Micrimageing, Barcelona, España).

2.2. Instrumentación y metodología analítica usando LC-MS/MS

2.2.1. Equipo LC-MS/MS

La determinación se llevó a cabo en un Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, CA, USA) que consta de una bomba binaria y un desgasificador de vacío. La inyección de las muestras se realizó por medio de un autoinyector Agilent y la separación en una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (2.1 μm de diámetro interno, 50 mm de longitud y 1.8 μm de tamaño de partícula) acoplada a una guarda-columna UHPLC 3PK EC-C18 (2.1 μm de diámetro interno, 5 mm de longitud y 2.7 μm de tamaño de partícula) de Agilent Technologies (CA, USA).

La determinación del αT en las muestras se realizó mediante una doble detección (on-line), con DAD en línea y un detector de MS, Agilent Technologies 6460 triple cuadrupolo (QqQ) (Agilent Technologies, CA, USA) con una fuente de ionización por ESI. El registro de masas permitió trabajar en un intervalo de 100 y 500 m/z y modo SCAN (*full scan*: exploración/barrido completo), TIC (*total ion chromatogram*), MRM y SIM (*selective ion monitoring*). El nitrógeno de grado cero fue producido por un generador de nitrógeno (Parker, USA) cedido por Linde.

El control del equipo se hizo por medio del software MassHunter Workstation B.07.00 que permite la adquisición y análisis de los datos obtenidos.

2.2.2. Metodología LC-MS/MS propuesta

En este estudio se desarrolló un método analítico usando LC-ESI-MS/MS para la determinación de α T que fue optimizado y validado. En los estudios con muestras biológicas se utilizaron muestras control (QC, *quality control*) preparadas a partir de plasma y suero bobino comerciales (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 4.1. Reactivos y disolventes*”) a 5 μ g/mL de α T y fenil-5,7-dimetil-d₆- α -Tocoferol (d₆- α T,) y procesadas en las mismas condiciones que las muestras a analizar (ver “*2.2.5.A Muestras de sangre: plasma y suero*”).

Las condiciones cromatográficas propuestas para realizar la determinación del α T en las diferentes matrices estaban compuestas por una fase móvil de acetonitrilo y 2-propanol (IPA) (50/50, v/v), a 40 °C y un flujo de 0.4 mL/min. El volumen de inyección de muestra, tanto de las disoluciones estándar como de los extractos obtenidos a partir de las muestras biológicas, fue de 5 μ L. La detección por medio del DAD se realizó a una longitud de onda de 295 nm.

En cuanto a los parámetros de la fuente de ionización, la temperatura del gas fue de 300 °C con un flujo de 13 L/min. La presión del nebulizador necesaria para llevar a cabo las medidas fue de 35 p.s.i. Para la obtención de los iones se aplicó un voltaje capilar de 4000 V y una corriente de 0.26 μ A en la corona. La ionización por ESI se hizo en modo negativo debido a las propiedades físico/químicas de la molécula y se utilizó el modo MRM para el análisis de las muestras.

El método analítico se desarrolló teniendo en cuenta las diferentes aplicaciones para las que se propuso, tanto para evaluar la eficacia de encapsulación de diferentes nanoemulsiones como para determinar la concentración de α T en las diferentes muestras biológicas: plasma, suero y tejidos.

2.2.3. Eficacia de encapsulación de α T en nanoemulsiones

Se analizó la eficacia de encapsulación de cuatro nanoemulsiones elaboradas con aceite de germen de trigo, coco, palma o soja. Para ello, las nanoemulsiones fueron formuladas mediante la técnica de difusión de solvente. Esta técnica consiste en la adición de una fase orgánica formada por una mezcla de 4.75 mL de acetona, 0.25 mL de EtOH, 20 mg de lecitina (como surfactante) y la cantidad de α T y del aceite seleccionado, en función del estudio, sobre una fase acuosa (10 mL de agua)

que se encuentra en agitación magnética. La evaporación posterior de los disolventes orgánicos (acetona y EtOH) da lugar a la formación de la nanoemulsión. El procedimiento se encuentra detallado por Santander-Ortega, M. J. y cols. (Santander-Ortega *et al.*, 2017). En este caso se añadieron 125.4 mg de α T y 63 μ L de los aceites mencionados.

El cálculo de la eficacia de encapsulación se hizo por un método indirecto a partir de la cuantificación de α T presente en la fase acuosa de las nanoemulsiones. Para ello, las nanoemulsiones se centrifugaron a $13000 \times g$ (10 min, 4 °C), que resultó en la separación de la fase acuosa y la fase del aceite, quedando este último en la superficie. La fase acuosa se recolectó y se adicionó acetonitrilo para disolver el α T presente en forma de nanoemulsión. A continuación, se centrifugó a $4000 \times g$ (20 min a 4 °C). Tras la centrifugación, la fase acuosa de las nanoemulsiones quedó libre del α T, que se disolvió en el acetonitrilo, el cuál fue analizado por medio del método analítico desarrollado.

2.2.4. Determinación de α T administrado en plasma y suero

9 ratones Pol μ +/-, de ambos sexos y con una edad entre 11-13 meses, fueron divididos en 3 grupos ($n = 3$ por grupo). A cada grupo se le administró 100 μ L de: agua (control), α T libre (80 mg/kg) y α T nanoemulsionado (α T-NE, 80 mg/kg). Las muestras de sangre se obtuvieron pasadas 1.5 h después de la administración.

Este experimento se realizó como un ensayo piloto del estudio que se llevó a cabo posteriormente y que se encuentra en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.3. Estudio cinético tras la administración de α T por vía oral*”.

2.2.5. Tratamiento de muestras biológicas para la determinación de α T

Tras seis horas de ayuno en jaulas metabólicas modulares los ratones fueron anestesiados con un equipo de anestesia inhalatorio CA-EAS20 CIBERTEC (Isoflurano al 4-5 % y flujo de oxígeno 0.5-1 L/min) y se obtuvieron las muestras que fueron procesadas como se describe a continuación.

A. Muestras de sangre: plasma y suero

Mediante punción cardíaca se extrajo aproximadamente un mililitro de sangre que fue dividida en dos tipos de tubos, uno para obtener plasma y otro para obtener suero. En el caso del plasma se utilizaron tubos heparinizados (Vacuette,

Kremsmünster, Austria) y para el suero se utilizaron microtubos Z-Gel (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania).

El tubo destinado para la obtención del plasma se centrifugó a $453 \times g$ a una temperatura de 18°C durante 15 min. Esto dio lugar a tres fases: la inferior compuesta principalmente por hematíes, una intermedia rica en leucocitos y el sobrenadante que correspondería al plasma. Éste fue almacenado a -20°C y posteriormente analizado siguiendo el método de Lauridsen, C. y cols. (Lauridsen *et al.*, 2001) con algunas modificaciones (Figura 19). En resumen, se tomaron $100\ \mu\text{L}$ de plasma a los que se les añadió $d_6\text{-}\alpha\text{T}$ como IS, $250\ \mu\text{L}$ de dodecilsulfato sódico (SDS, *sodium docecyl sulfate*) $0.1\ \text{M}$ en agua, $500\ \mu\text{L}$ de EtOH y $1\ \text{mL}$ de butilhidroxitolueno (BHT) $0.5\ \text{g/L}$ en hexano, todo ello mezclado en un agitador tipo vórtex. La muestra se centrifugó a $2500 \times g$ durante 10 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante, que correspondía a la fase orgánica. Tras lo cual, sobre la fase acuosa se repitieron los últimos pasos: adición del BHT, centrifugación y recolección del sobrenadante. Por último, la fase orgánica total recolectada (de las dos repeticiones) se desecó con una corriente de nitrógeno gaseoso y se reconstituyó con $100\ \mu\text{L}$ de IPA que, tras ser filtrado con membranas de politetrafluoroetileno ($13\ \text{mm}$ de diámetro y $0.2\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro, Agilent Technologies, CA, USA), se inyectaron en el cromatógrafo.

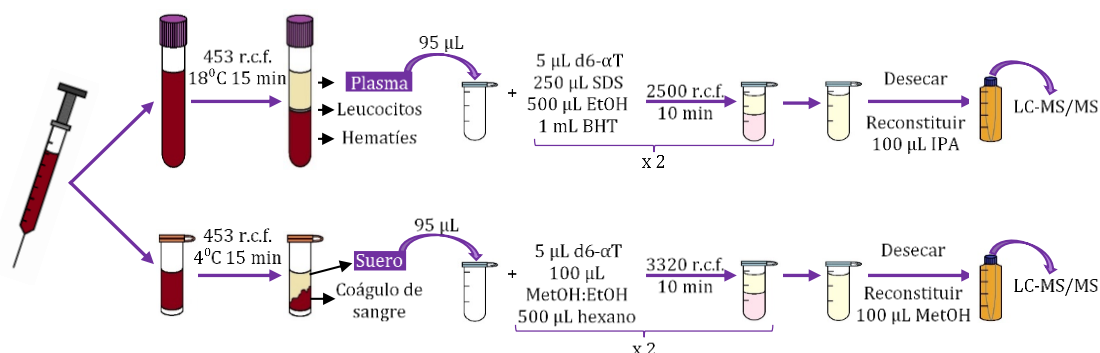


Figura 19. Tratamiento de plasma y suero a partir de una muestra de sangre. En ambos casos, se utilizó una extracción líquido-líquido. BHT: butilhidroxitolueno; $d_6\text{-}\alpha\text{T}$: fenil-5,7-dimetil- $d_6\text{-}\alpha$ -Tocoferol; EtOH: etanol; IPA: 2-propanol; MetOH: metanol; SDS: dodecilsulfato sódico.

El suero se obtuvo tras la centrifugación de la muestra, a $453 \times g$ y a 4°C de temperatura, durante 15 min, provocando la separación de dos fases: un coágulo de sangre, rico en células sanguíneas atrapadas en una red de fibrina en la parte inferior del tubo, y el sobrenadante, que correspondería al suero (Figura 19). Tras la obtención del suero, se mantuvo a -20°C hasta su análisis. El método para procesar

el suero se hizo modificando ligeramente los pasos que describieron Kucêrova, B. y cols. (Kucerova *et al.*, 2013). Brevemente, a 100 μL de suero se le adicionó d6- αT como IS, 100 μL de metanol mezclado con EtOH (5:95, v/v) y 500 μL de hexano, todo ello agitado en el vórtex. La mezcla se centrifugó a $3320 \times g$ durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se extrajo en dos veces, al igual que con el plasma. El sobrenadante total se llevó a desecación y la muestra fue reconstituida con 100 μL de metanol quedando preparadas, tras su filtración, para su inyección en el equipo.

B. Muestras de tejidos: hígado, cerebro y pulmón

Para el procesamiento de las muestras de tejidos, una vez descongelados, se procesaron aproximadamente 0.2 g de cada tejido y se mezclaron con 200 μL de PBS. Con el fin de facilitar la homogeneización de la muestra, ésta fue triturada inicialmente durante 30 s. La muestra fue homogeneizada por medio de un ULTRATURRAX (T18 digital, S 18 N -10 G de IKA Labor Technik, Staufen, Alemania) a 10000 r.p.m. durante 30 s, manteniendo ésta en un baño de agua con hielo para evitar que la temperatura de la muestra se elevara durante la homogeneización (Figura 20).

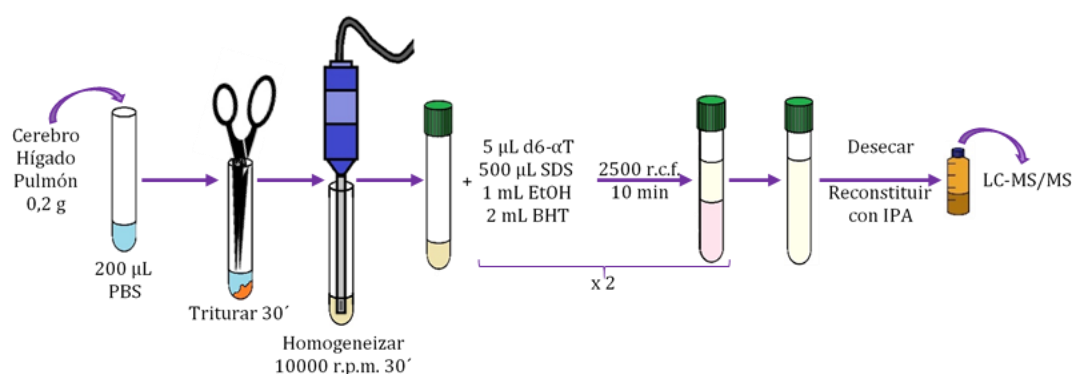


Figura 20. Tratamiento de diferentes tejidos murinos. BHT: butilhidroxitolueno; d6- αT : fenil-5,7-dimetil-d6- α -Tocoferol; EtOH: etanol; IPA: 2-propanol; MetOH: metanol; PBS: tampón fosfato salino; SDS: dodecilsulfato sódico.

Una vez homogeneizadas las muestras, se añadieron 500 μL de SDS 0.1 M en agua, 1 mL de EtOH y 2 mL de BHT 0.5 g/L en hexano. La mezcla fue centrifugada en las mismas condiciones que el procesamiento del plasma, y tras la desecación se utilizaron diferentes volúmenes de reconstitución con IPA para cada tejido (700 μL en el caso del hígado y 350 μL en cerebro y pulmón). Los extractos obtenidos se filtraron, tal y como se ha descrito para las muestras de plasma y suero, y finalmente se inyectaron en el equipo para la obtención de los resultados.

2.3. Estudio cinético tras la administración de α T por vía oral

2.3.1. Formulación de las nanoemulsiones de α T

Las nanoemulsiones fueron formuladas como se describe en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.2.3. Eficacia de encapsulación de α T en nanoemulsiones*” con una cantidad de 38 mg de α T comercial y 63 μ L de aceite de soja. La técnica de dispersión dinámica de la luz fue realizada con un Z-Sizer Nano ZS (Marvern Panalytical, Marvern, UK) para evaluar el diámetro medio hidrodinámico (160 nm) y el ζ -potencial (-60 mV) de la formulación como describen Plaza-Oliver, M. y cols. y cuya eficacia de encapsulación de α T fue del 90 % aproximadamente (Plaza-Oliver *et al.*, 2015).

2.3.2. Administración y obtención de muestras en los modelos murinos C57BL/6J y SAM

En el estudio cinético de la formulación de nanoemulsiones de α T se utilizaron un total de 72 ratones C57BL/6J macho (36 ± 5 g) con edades de entre 8 y 10 meses de edad. Estos fueron divididos en 3 grupos de administración ($n = 24$ ratones por grupo):

- Grupo control (GC): 100 μ L de agua.
- Grupo α T libre o no nanoemulsionado (GnNE): 100 μ L de agua que contenían 80 mg/kg de α T en el aceite de soja sin emulsionar.
- Grupo α T-NE (GNE): 100 μ L de α T-NE que contenían 80 mg/kg de α T en el aceite de soja.

La dosis de α T (80 mg/kg) se estableció por aproximación de los datos encontrados en la bibliografía previamente publicada. Ramis, M. R. y cols. establecieron una dosis de 60 mg/kg en ratas por vía intraperitoneal (Ramis *et al.*, 2016). El incremento a 80 mg/kg se decidió en base a que la vía de administración es diferente, siendo en este caso la vía oral.

Antes de la administración oral, los animales fueron sometidos a 6 h de ayuno (9:30 a.m. hasta las 15:30 p.m.). La formulación fue administrada mediante una micropipeta introducida en la boca del animal. Los animales se anestesiaron y sacrificaron para la obtención de las muestras biológicas en 6 puntos: 0.75; 2.5; 3.5; 6; 12 y 24 h ($n = 4$) (Figura 21). Los ratones fueron anestesiados por inhalación

(Isoflurano al 4-5 % y flujo de oxígeno 0.5-1 L/min) para la obtención, mediante punción cardíaca, de las muestras de sangre (0.8 mL aproximadamente). Finalizada la extracción, el animal fue sacrificado mediante dislocación cervical y se recolectaron los tejidos de interés (hígado, cerebro y pulmones), que fueron congelados y almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

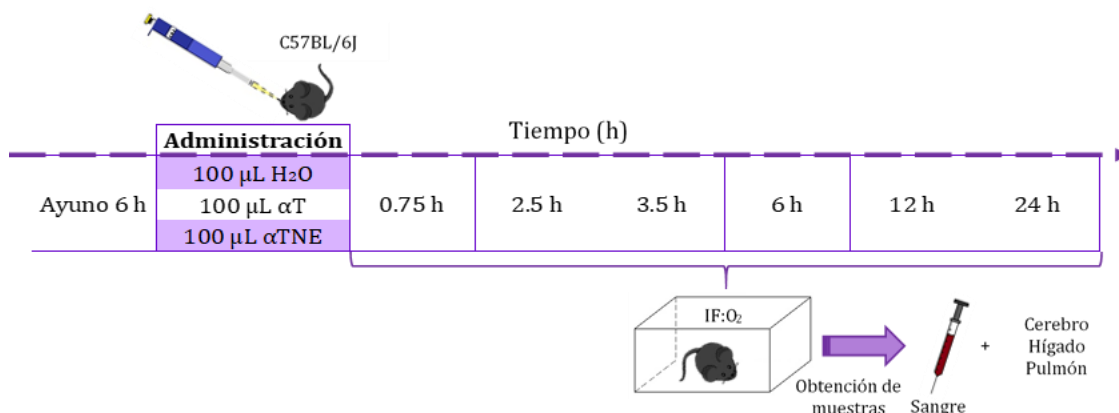


Figura 21. Diseño del estudio. Tras mantener en ayuno a los animales se procedió a la administración de agua, αT libre o αT nanoemulsionado (αT-NE) por vía oral. Los ratones fueron anestesiados y sacrificados en los períodos de tiempo señalados, tras lo cual se obtuvieron las muestras de sangre y tejidos. IF:O₂: mezcla de isoflurano y oxígeno.

Tras el procesamiento del plasma y el suero, se realizó el cálculo del área bajo la curva (ABC), para el cuál se utilizaron dos métodos: por un lado, se utilizó el método de los trapecios mediante la **Ecuación 1**, y por otro, utilizando el software OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., Buckinghamshire, UK).

$$\text{Ecuación 1.} \quad A_{0.75-24\text{ h}} = \sum_{n=1}^{n=6} A_t = \frac{C_n + C_{n+1}}{t_{n+1} - t_n}$$

Posteriormente, se utilizaron 8 animales SAMP8 y 8 SAMR1 (de edades similares a los C57BL/6J), para analizar los niveles de αT en el GC y el GNE a las 3,5 h tras la administración.

3. Análisis estadístico

Se utilizaron diferentes análisis en función del experimento bajo estudio.

Durante el proceso de validación del método analítico desarrollado para realizar la determinación del αT se emplearon dos test estadísticos. Por un lado, para evaluar la precisión del método, se utilizó el test F-Snedecor con un nivel de confianza del 95 % y 7 grados de libertad ($n = 8$). Por otro lado, en la evaluación del rango lineal se aplicó el test de ANOVA de una vía asumiendo varianzas equivalentes

y un nivel de significación de 0.05. Para ello, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics, versión 22.

Por su parte, en el análisis estadístico aplicado en la administración oral del α T los datos fueron expresados como media \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of mean*). Éstos se analizaron mediante el test de ANOVA de una vía con *post-hoc* y prueba de Tukey para comparar la variación de los niveles medios de α T a lo largo del tiempo después de la administración. En el caso del análisis de los valores obtenidos entre diferentes formulaciones y cepas de ratones se utilizó la prueba t de Student. IBM SPSS Statistics, versión 24 fue utilizado para aplicar los test mencionados. Se consideraron diferencias significativas en $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$.

4. Reactivos y disoluciones

4.1. Reactivos y disolventes

A continuación, se detallan los anticuerpos utilizados para realizar las IHQ.

Anticuerpo primario	Casa Comercial	Anticuerpo secundario	Casa Comercial	Estreptavidina conjugada	Casa Comercial
Anticuerpo anti- α TTP de cabra	Biotechnology	Biotinilado de burro anti-cabra	Jackson	Peroxidasa	Jackson
				Alexa 488	Jackson
Anticuerpo anti-SVCT2 de cabra	Biotechnology	Biotinilado de burro anti-cabra	Jackson	Peroxidasa	Jackson
				Alexa 488	Jackson
GFAP	DAKO	Biotinilado de burro anti-conejo	Jackson	Peroxidasa	Jackson
		De burro anti-conejo-Alexa 568	Thermo Fisher	-	-
NeuN	Cell Signalling Technology	Biotinilado de burro anti-conejo	Jackson	Peroxidasa	Jackson
		De burro anti-conejo-Alexa 568	Thermo Fisher	-	-

Tabla 1. Relación de anticuerpos primarios y sus respectivos anticuerpos secundarios utilizados en las IHQ.

Los reactivos y disolventes empleados para llevar a cabo todos los procedimientos mencionados anteriormente se indican en la Tabla 2 y 3.

	Reactivos	Especificaciones	Casa comercial	
PCR	<i>MgCl₂ FREE</i>	10X	Biotoools	
	<i>MgCl₂</i>	50 mM	Biotoools	
	<i>dNTP Mix</i>	10 mM each	Biotoools	
	<i>Oligo1</i>	SY130622023-080	Sigma-Aldrich	
	<i>Oligo2</i>	SY130622023-081	Sigma-Aldrich	
	<i>Oligo3</i>	SY130622023-079	Sigma-Aldrich	
	<i>HotSplit DNA Polymerase</i>	1U/μL	Biotoools	
EF	<i>MB Agarose</i>	-	Biotoools	
	<i>GelRed™</i>	10000X en H ₂ O	Biotium	
	<i>DNA Ladder 100pb</i>	50 μg	Biotoools	
	<i>DNA Gel Loading Dye</i>	-	Thermo Fisher	
Anestésicos	<i>Isoflurano</i>	IsoFlo® (100 % p/p)	ESTEVE	
	<i>Ketamina</i>	Ketolar 50 mg/mL	Pfizer	
	<i>Xilacina</i>	Xilagesic 20mg/mL	Calieer	
NE	<i>Aceite de coco</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Aceite de germen de trigo</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Aceite de palma</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Aceite de soja</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Lecitina</i>	Epikuron 145V®	Cargill	
IHQ	<i>Paraformaldehído</i>	-	Merck KGaA	
	<i>Suero de caballo</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Seroalbúmina bobina</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Tritón™ X-100</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Sodio dihidrogenofosfato monohidrato</i>	Para análisis	Merck KGaA	
	<i>Disodio hidrogenofosfato dihidrato</i>	Para análisis	Merck KGaA	
	<i>NaCl</i>	Grado farmacéutico	Panreac	
	<i>Tris</i>	Grado farmacéutico	Panreac	
	<i>Tris-HCl</i>	Trizma® hidrocloreto	Sigma-Aldrich	
	<i>3,3'diaminobenzidina</i>	10 mg/tableta	Sigma-Aldrich	
	<i>Xilol</i>	Xileno	Guinama	
	<i>Tionina</i>	Acetato de tionina	Thermo Fisher	
	<i>DPX nuevo</i>	-	Merck KGaA	
	<i>Dimetilformamida</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>4-Cloro-naftol</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>Polivinil alcohol</i>	-	Sigma-Aldrich	
	<i>1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano</i>	-	Sigma-Aldrich	
	Análisis	<i>DL-all-rac-α-Tocopherol</i>	-	Sigma-Aldrich
		<i>Fenil-5,7-dimethyl-d6-α-Tocopherol</i>	-	Sigma-Aldrich
		<i>Plasma bobino</i>	-	Sigma-Aldrich
<i>Suero bobino</i>		-	Sigma-Aldrich	

<i>Butilhidroxitolueno</i>	-	Guinama
<i>Dodecilsulfato sódico</i>	C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	Panreac

Tabla 2. Reactivos empleados para la realización de la presente Tesis Doctoral. EF: electroforesis. IHQ: inmunohistoquímica. NE: nanoemulsiones. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

Disolventes	Especificaciones	Casa comercial
<i>2-propanol</i>	Grado HPLC	Panreac
<i>Acenitrilo</i>	Grado LC-MS	Scharlab
<i>Acetona</i>	Para análisis	Panreac
<i>Ác. Acético</i>	99 %	VWR
<i>Cloroformo</i>	-	Guinama
<i>EDTA</i>	Para análisis	Panreac
<i>Etanol absoluto</i>	Grado HPLC	Panreac
<i>Etanol absoluto</i>	Para análisis	Panreac
<i>Etilenglicol</i>	-	VWR
<i>Glicerol</i>	Grado farmacéutico	Panreac
<i>Agua oxigenada</i>	33 % w/v	Panreac
<i>HCl</i>	37 %	Panreac
<i>Hexano</i>	Grado HPLC	Panreac
<i>Metanol</i>	Grado farmacéutico	Panreac
<i>Metanol</i>	Grado LC-MS	Scharlab

Tabla 3. Disolventes empleados.

4.2. Disoluciones

En todas las disoluciones acuosas que se utilizó agua milli-Q, se obtuvo por medio de un purificador de agua Milli-Q® (Merck Life Science S.L.U., Madrid, España).

A. Tampones

Tampón de bloqueo

Para 200 mL de disolución:

Suero de caballo	40 g
Seroalbúmina bovina.....	2 g
Tritón® X-100	600 µL
Tampón Tris saino (PBS) 0.01 M pH 7.4	c.s.p. 200 mL

PB 0.2 M pH 7.4

SOLUCIÓN A

Sodio dihidrogenofosfato monohidrato	13.8 g
H ₂ O	c.s.p. 500 mL

SOLUCIÓN B

Disodio hidrogenofosfato dihidrato	35.6 g
H ₂ O	c.s.p. 1 L

Se añade la solución A sobre B hasta alcanzar pH 7.4.

PBS 0.1 M pH 7.4

Para 1 L de disolución:

PB 0.2 M.....	500 mL
NaCl	9 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

TAE 10X

Para 1 L de disolución:

Tris-base 0.4 M	48.4 g
Ácido acético 11.4 %.....	11.42 mL
EDTA (2 H ₂ O) 10 mM	3.7 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

El pH se ajustó a 7.6 con ácido acético o tris.

Tampón Tris (TB) 0.5 M

Para 1 L de disolución:

Tris hidroximetil aminometano (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	60.57g
H ₂ O	c.s.p. 1L

El pH se ajustó a 7.6 con HCl al 33 %.

TBS 0.1 M y 0.5 M pH 7.6

Para 1 L de disolución de 0.1 M:

TB 0.5 M.....	200 mL
NaCl	9 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

Para 1 L de disolución de 0.5 M:

NaCl.....	9 g
TB 0.5 M.....	c.s.p. 1 L

B. Paraformaldehído (PFA) 4 %, PB 0.2 M pH 7.4

Para 1 L de disolución:

PB 0.2 M pH 7.4	500 mL
PFA	40 g
H ₂ O	c.s.p. 1L

C. Líquido de recogida de secciones

Para 1 L de disolución:

Etilenglicol	300 mL
Glicerol.....	200mL
PB 0.1 M pH 7.4	500 mL

D. Revelado con 4-cloro-naftol

Para 50 mL de disolución:

4-Cloro-naftol.....	20 mg
Dimetilformamida.....	0.25 mL
Agua oxigenada.....	25 µL
TB 0.05 M pH 7.4	c.c.p. 50 mL

E. DABCO

El DABCO se preparó de la siguiente forma: se mezclaron 6 g de glicerol y 2.4 g de polivinil alcohol en un agitador rotativo MX-RD-E (LABBOX Labware, S.L., España) hasta que fue homogéneo. Se añadieron 6 mL de H₂O destilada y se mantuvo en el agitador rotativo toda la noche. Al día siguiente, se añadieron 12 mL de 0.2 M de Tris-HCl, pH 8.5, y se calentó a baño María bajo agitación a 50 °C durante 30 min. Se adicionaron 0.625 g de DABCO, se mezcló y se centrifugó a 5000 × g durante 15 min. Se recolectó el sobrenadante y se guardó a -20 °C.

F. Disoluciones de αT y d6-αT

Se utilizaron dos disoluciones madre de αT y d6-αT de 4020 y 2000 µg/mL en EtOH, que se mantuvieron a -20 °C en oscuridad.

La disolución estándar de trabajo se preparó diariamente y consistió en una mezcla de ambos analitos a 5 µg/mL en EtOH. Esta solución procedía de una disolución intermedia de la mezcla de ambos compuestos a 100 µg/mL en EtOH conservada a 4 °C.

RESULTADOS

1. Distribución de α TTP y SVCT2 en el cerebro de Pol μ

La especificidad de los anticuerpos frente a los transportadores α TTP y SVCT2 fueron comprobados en secciones de cerebro (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.1.5. A. Inmunohistoquímica simple*”). Estas pruebas revelaron que la inmunorreactividad (IR), en ausencia de los anticuerpos primarios empleados, era nula en todos los grupos de edad y los genotipos disponibles. En ningún caso se observó presencia de IR en fibras o en cuerpos neuronales (Figura 22).

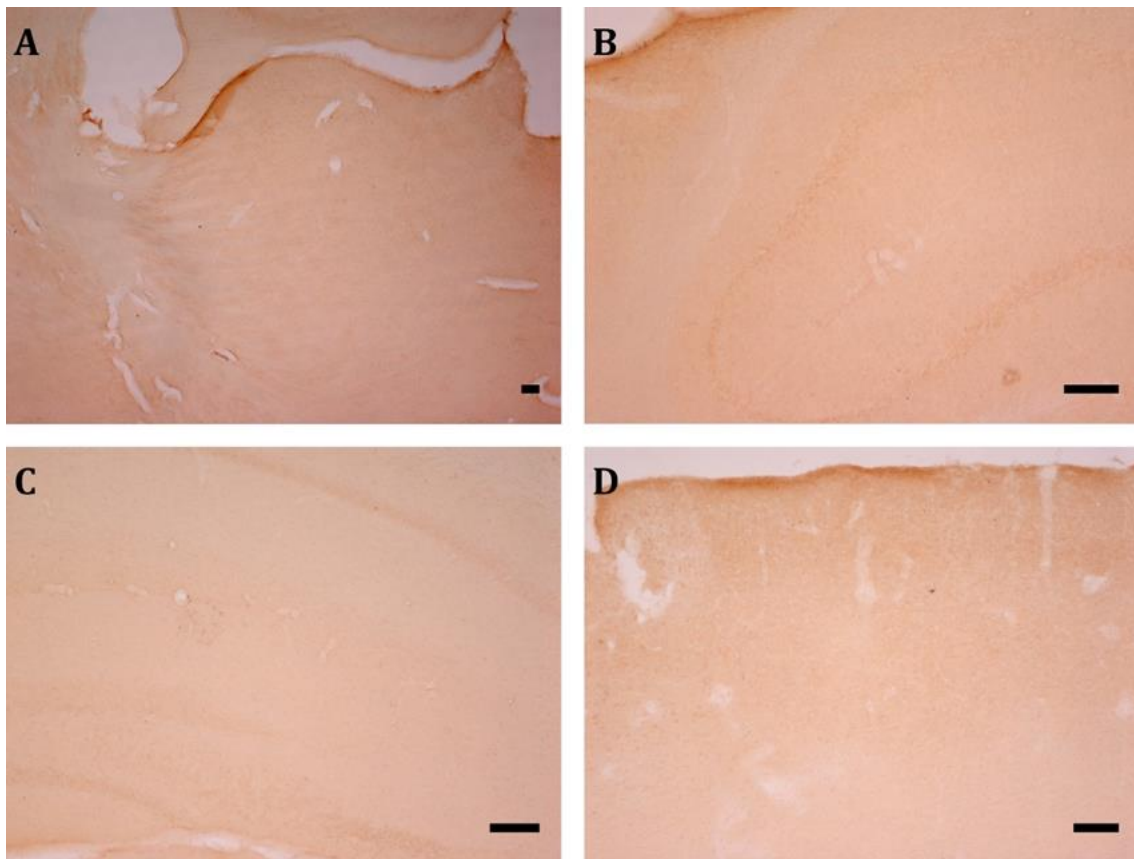


Figura 22. Especificidad de los anticuerpos primarios frente a α TTP y SVCT2. En ninguna de las regiones cerebrales del modelo animal Pol μ se encontró inmunotinción cuando las secciones se incubaron sin el anticuerpo primario (A y B), con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (C), o con el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra (D). Todas las imágenes corresponden a secciones coronales en distintas regiones: tálamo (A), cerebelo (B), hipocampo (C) y corteza somatosensorial (D). Barra de escala: 100 μ m.

Aunque en muchas áreas la distribución de α TTP y SVCT2 fue similar, se observó que α TTP presentaba una distribución más extensa que SVCT2. Mientras que ambos transportadores fueron observados en cuerpos neuronales, solo α TTP mostró marcaje en tractos de fibras. En las regiones corticales, α TTP y SVCT2 presentaban una IR pericelular, en tanto que en otras áreas cerebrales el precipitado se hallaba en el citoplasma de los cuerpos celulares.

1.1. Distribución regional del transportador de la VitE, α TTP

La IR- α TTP se encontró ampliamente distribuida en casi todas las regiones cerebrales del modelo animal Pol μ . No se observaron diferencias en la distribución de la IR a diferentes edades ni entre los diferentes genotipos (+/+, +/- y -/-). Aunque, como se ha comentado anteriormente, la IR- α TTP se presentó fundamentalmente en los cuerpos neuronales y en los tractos de fibras, algunas regiones cerebrales presentaron un marcaje en forma de puntos o agrupados en acúmulos. Este tipo de marcaje es particularmente importante en la región del hipocampo, en concreto en los estratos radiado y lacunoso molecular (Figura 23 A), aunque también se observó en el estrato oriens del campo amónico CA1 del hipocampo, la corteza piriforme y alrededor de las células de Purkinje del cerebelo.

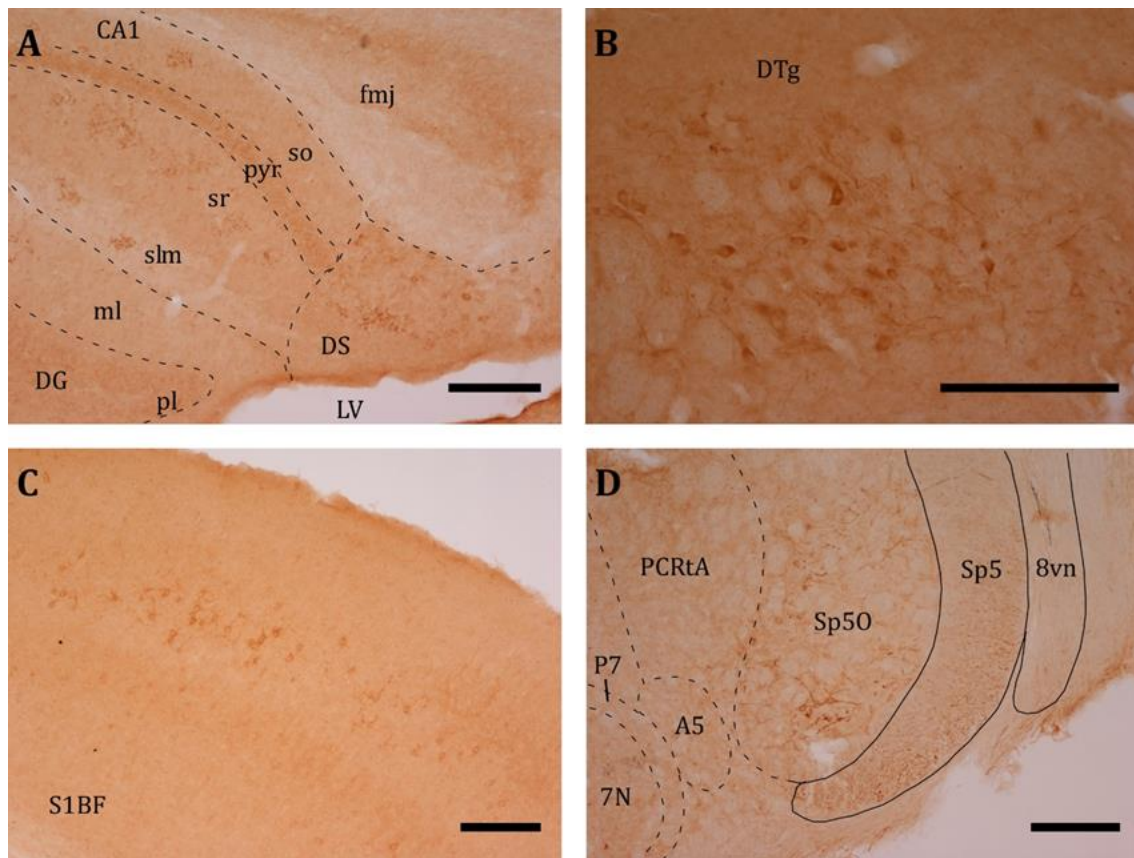


Figura 23. Microfotografías de IHQ frente a α TTP en el modelo Pol μ . A: Sección sagital de la formación del hipocampo en un Pol μ +/+ de 12 meses. B: Sección coronal del núcleo tegmental dorsal (DTg) en un Pol μ -/- de 24 meses. C: Sección coronal en los *barrel fields* (S1BF) de la corteza somatosensorial primaria en un Pol μ +/+ de 24 meses. D: Sección coronal en el tronco del encéfalo de un Pol μ +/- de 24 meses. Barra de escala: 100 μ m. 7N: núcleo del nervio facial; 8vn: nervio vestibular; A5: grupo 5 de células noradrenérgicas; CA1: Campo amónico CA1 del hipocampo; DG: giro dentado; DS: subículo dorsal; fmj: cuerpo calloso, brazo mayor; LV: ventrículo lateral; ml: estrato molecular; P7: zona perifacial; PCRtA: núcleo parvicelular reticular, parte alfa; pl: capa polimórfica; pyr: estrato piramidal; slm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato *oriens*; Sp5: tracto espinal del trigémino; Sp50: núcleo espinal del trigémino, parte oral; sr: estrato radiado.

Los cuerpos neuronales IR- α TTP se encontraron distribuidos en numerosos núcleos como el núcleo de accumbens, el núcleo entopeduncular, el núcleo reticular del tálamo, el núcleo rojo, el núcleo paratroclear, el núcleo tegmental dorsal (Figura 23 B), el núcleo mesencefálico del trigémino, el núcleo reticulotegmental del puente o el núcleo del nervio facial. Otras regiones en las que se pudo observar IR- α TTP corresponden a la corteza piriforme, el fórnix, el pedúnculo cerebral o la sustancia negra, entre otros.

El marcaje pericelular se halló principalmente en las regiones corticales, donde destacaron, por presentar una notable cantidad de IR- α TTP, las capas profundas de la corteza motora, la corteza retrosplenial (granular y agranular) y la corteza somatosensorial primaria en la región de los *barrel* de la corteza cerebral (Figura 23 C). Otras áreas corticales, como la corteza de asociación frontal o la visual secundaria, presentaron menor marcaje pericelular.

Una de las características diferenciales de la IR- α TTP es la presencia de marcaje IR en fibras, incluyendo la estría terminal, el cíngulo, las fibras musgosas del hipocampo, el lemnisco lateral, el tracto espinal del trigémino y el cuerpo trapezoide, así como los nervios motores oculomotor y facial (Figura 23 D).

1.2. Distribución regional del transportador de la VitC, SVCT2

La presencia de células positivas para SVCT2 fue especialmente importante en todos los campos amónicos del hipocampo, en los núcleos del tálamo, la amígdala y el estriado (Figura 24). Se encontró IR-SVCT2 de forma punteada dispuesta en forma de acúmulos presente en las mismas zonas del hipocampo que presentaban IR- α TTP (estratos radiado, lacunoso molecular y oriens, Figura 24 A).

En la región del tálamo, el marcaje se observó principalmente en la porción dorsomedial del núcleo laterodorsal del tálamo, la porción mediodorsal y laterodorsal del núcleo posterior lateral del tálamo y en el núcleo anteroventral del tálamo y anteromedial (Figura 24 B). También se encontró IR rodeando el tracto olfatorio lateral, el área olfatoria anterior y dorsal a la fisura rinal y en la corteza piriforme.

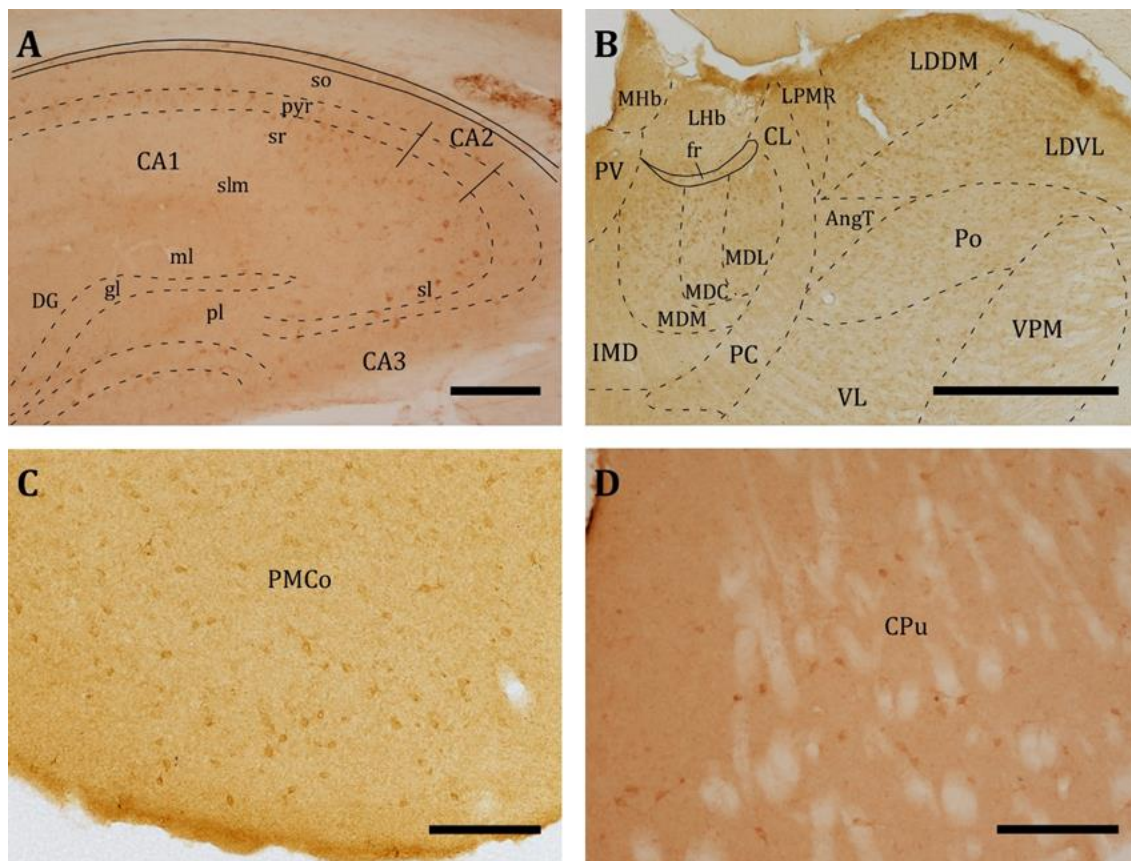


Figura 24. Microfotografía de la IHQ de SVCT2 en el modelo Pol μ . A: Sección coronal de la formación del hipocampo en un Pol μ +/- de 4 meses. B: Sección coronal del núcleo del tálamo en un Pol μ +/- de 4 meses. C: Sección coronal del área amigdalina cortical posteromedial (PMCo) en un Pol μ +/- de 4 meses. D: Sección coronal del núcleo estriado en un Pol μ +/- de 4 meses. Barra de escala: 100 μ m. AngT: núcleo angular del tálamo; CA1: campo amónico CA1 del hipocampo; CA2: campo amónico CA2 del hipocampo; CA3: campo amónico CA3 del hipocampo; CL: núcleo centrolateral del tálamo; CPu: caudado putamen (estriado); DG: giro dentado; fr: fascículo retroflejo; gl: estrato granuloso; IMD: núcleo intermediodorsal del tálamo; LDDM: núcleo anterodorsal del tálamo, porción dorsomedial; LDVL: núcleo laterodorsal del tálamo, porción ventrolateral; Lhb: núcleo lateral de la habénula; LPMR: núcleo lateral posterior del tálamo, porción mediorrostral; MDC: núcleo mediodorsal del tálamo, porción central; MDL: núcleo mediodorsal del tálamo, porción lateral; MDM: núcleo mediodorsal del tálamo, porción medial; MHb: núcleo medial de la habénula; ml: estrato molecular; PC: núcleo paracentral del tálamo; pl: capa polimórfica; Po: grupo nuclear posterior del tálamo; PV: núcleo paraventricular; pyr: estrato piramidal; sl: estrato lúcido; srm: estrato lacunoso-molecular; so: estrato oriens; sr: estrato radiado; VL: núcleo ventrolateral del tálamo; VPM: núcleo ventral posteromedial del tálamo.

El marcaje pericelular fue observado en las cortezas retrosplenial (sobre todo en la capa granular), cingular, motora, orbital y corteza de asociación frontal. En la corteza somatosensorial la presencia de células inmunopositivas para SVCT2 fue más importante en las capas superficiales y profundas que en las capas intermedias, donde el marcaje fue menos notable.

1.3. Colocalización de los transportadores α TTP y SVCT2

Tras el análisis pormenorizado individual de los dos transportadores, se observó que su distribución podría presentar cierto grado de colocalización en

aquellas regiones en las que se detectó IR para ambos transportadores. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Región cortical	αTTP	SVCT2
<i>Corteza auditiva (AuC)</i>	-	+
<i>Corteza cingular (Cg)</i>	+	+
<i>Corteza frontal asociativa (FrA)</i>	+	+
<i>Corteza insular (IC)</i>	-	+
<i>Corteza motora (MC)</i>	+	+
<i>Corteza orbital (OC)</i>	-	+
<i>Corteza piriforme (Pir)</i>	+	+
<i>Corteza postrinal (PoRh)</i>	-	+
<i>Corteza prelímbica (PrL)</i>	-	+
<i>Corteza retrosplenial (RSC)</i>	+	+
<i>Corteza somatosensorial (SC)</i>	+	+
<i>Corteza visual (VC)</i>	+	+

Formación del hipocampo	αTTP	SVCT2
<i>Subículo dorsal (DS)</i>	+	+
<i>Corteza entorrinal (EC)</i>	+	+
<i>Hipocampo (Hip)</i>	+	+
<i>Fibras musgosas (mf)</i>	+	-
<i>Parasubículo (PaS)</i>	+	-
<i>Postsubículo (Post)</i>	+	-
<i>Presubículo (PrS)</i>	+	-
<i>Subículo ventral (VS)</i>	+	+
<i>Fórnix (f)</i>	+	-

Complejo amigdalino	αTTP	SVCT2
<i>Área amigdalina anterior (AAA)</i>	-	+
<i>Área amigdalina cortical anterior (ACo)</i>	-	+
<i>Área amigdalohipocámpica, porción anterolateral (AHiAL)</i>	+	+
<i>Núcleo basolateral (BL)</i>	+	+
<i>Núcleo basomedial (BM)</i>	-	+
<i>Núcleo central (Ce)</i>	+	-
<i>Núcleo lateral (La)</i>	-	+
<i>Área amigdalina cortical porteriomedial (PMCo)</i>	-	+

Ganglios basales	αTTP	SVCT2
<i>Caudado putamen (estriado) (CPu)</i>	-	+
<i>Globo pálido (GP)</i>	+	-
<i>Pálido ventral (VP)</i>	+	-
<i>Núcleo entopeduncular (EP)</i>	+	-

Regiones Telencefálicas	αTTP	SVCT2
Núcleo accumbens (AcN)	+	+
Tenia tecta dorsal (DTT)	-	+
Núcleo septal lateral (LSN)	+	-
Bulbo olfatorio (OB)	+	+
Estría terminal (st)	+	-
Núcleo de la base de la estría terminal, división lateral, porción dorsal (STLD)	+	-
Tubérculo olfativo (Tu)	-	+
Tenia tecta ventral (VTT)	-	+

Diencefalo	αTTP	SVCT2
Tálamo		
Núcleo anteroventral del tálamo (AVTN)	-	+
Núcleo anteromedial del tálamo (AM)	-	+
Núcleo geniculado dorsal lateral (DLG)	-	+
Núcleo laterodorsal del tálamo (LD)	-	+
Núcleo posterolateral del tálamo (LPT)	-	+
Núcleo pregeniculado (PG)	+	-
Grupo nuclear posterior del tálamo (Po)	-	+
Núcleo reticular (pretálamo) (Rt)	+	-
Hipotálamo		
Núcleo estriohipotalámico (StHy)	+	-
Área preóptica medial (MPA)	+	-
Núcleo preóptico medial (MPO)	+	-
Núcleo preóptico ventrolateral (VLPO)	+	-
Subtálamo		
Zona incierta (ZI)	+	+

Mesencéfalo	αTTP	SVCT2
Nervio oculomotor (3n)	+	-
Núcleo del brazo del colículo inferior (BIC)	+	+
Núcleo central del colículo inferior (CIC)	+	+
Pedúnculo cerebral (cp)	+	-
Núcleo dorsal del lemnisco lateral (DLL)	+	-
Capa gris profunda del colículo superior (DpG)	+	+
Corteza externa del colículo inferior (ECIC)	+	+
Capa gris intermedia del colículo superior (InG)	+	-
Capa blanca intermedia del colículo superior (InWH)	-	+
Núcleo interpeduncular (IP)	-	+
Lemnisco lateral (ll)	+	-
Núcleo trigémino del mesencéfalo (Me5)	+	-
Raíz motora del nervio trigémino (m5)	+	-
Tracto nigroestriatal (ns)	+	-

Mesencéfalo	αTTP	SVCT2
<i>Núcleo paratroclear (Pa4)</i>	+	-
<i>Sustancia gris periacueductal (PAG)</i>	-	+
<i>Núcleo rojo (R)</i>	+	-
<i>Núcleo sagulum (Sag)</i>	+	-
<i>Sustancia negra (SN)</i>	+	+

Puente troncoencefálico	αTTP	SVCT2
<i>Núcleo del nervio facial (7N)</i>	+	-
<i>Nervio facial (7n)</i>	+	-
<i>Núcleo coclear dorsal (DC)</i>	+	-
<i>Núcleo del cuerpo trapezoide (Tz)</i>	-	+
<i>Núcleo reticular pontino, porción caudal (PnC)</i>	-	+
<i>Núcleo reticulotegmental del puente (RtTg)</i>	+	-
<i>Cuerpo trapezoide (tz)</i>	+	-
<i>Núcleo ventral de lemnisco lateral (VLL)</i>	+	+

Bulbo raquídeo	αTTP	SVCT2
<i>Núcleo reticular intermedio (IRt)</i>	-	+
<i>Núcleo espinal del trigémino (Sp)</i>	+	-
<i>Tracto espinal del trigémino (sp5)</i>	+	-
<i>Núcleo vestibular (Ve)</i>	+	-

Cerebelo	αTTP	SVCT2
<i>Capa de células de Purkinje del cerebelo (CoP)</i>	+	-

Tabla 4. Distribución de la α TTP y SVCT2 en el cerebro de ratones con y sin expresión de Pol μ entre los 4 y 24 meses. La presencia o ausencia del transportador se indica como + o -, respectivamente.

Al comparar la distribución de ambas proteínas se observó también que, aunque ambas proteínas están presentes en multitud de regiones cerebrales, en determinadas áreas, solo encontramos una u otra, sin una aparente coexistencia. Este fue el caso, por ejemplo, de los ganglios basales en los que la IR-SVCT2 se encuentra restringida al núcleo estriado mientras que en esta región la IR- α TTP no está presente en estriado, pero sí en el globo pálido. En el hipocampo, mientras que SVCT2 se hallaba únicamente en los cuerpos celulares, la IR- α TTP se encontraba principalmente en las fibras musgosas (y en muy pequeña cantidad en cuerpos celulares).

En corteza cerebral el marcaje para SVCT2 es prácticamente ubicuo, mientras que la presencia de α TTP se limita a algunas áreas corticales concretas. En capas profundas de áreas como la corteza retrosplenial, la IR doble por precipitación de cloronaftol y DAB parece mostrar una colocalización de ambas proteínas en las

mismas células (Figura 25 A). Este doble marcaje se observó también en algunas regiones auditivas como el cuerpo trapezoide (Figura 25 B), el colículo inferior (Figura 25 C) o el subículo dorsal (Figura 25 D).

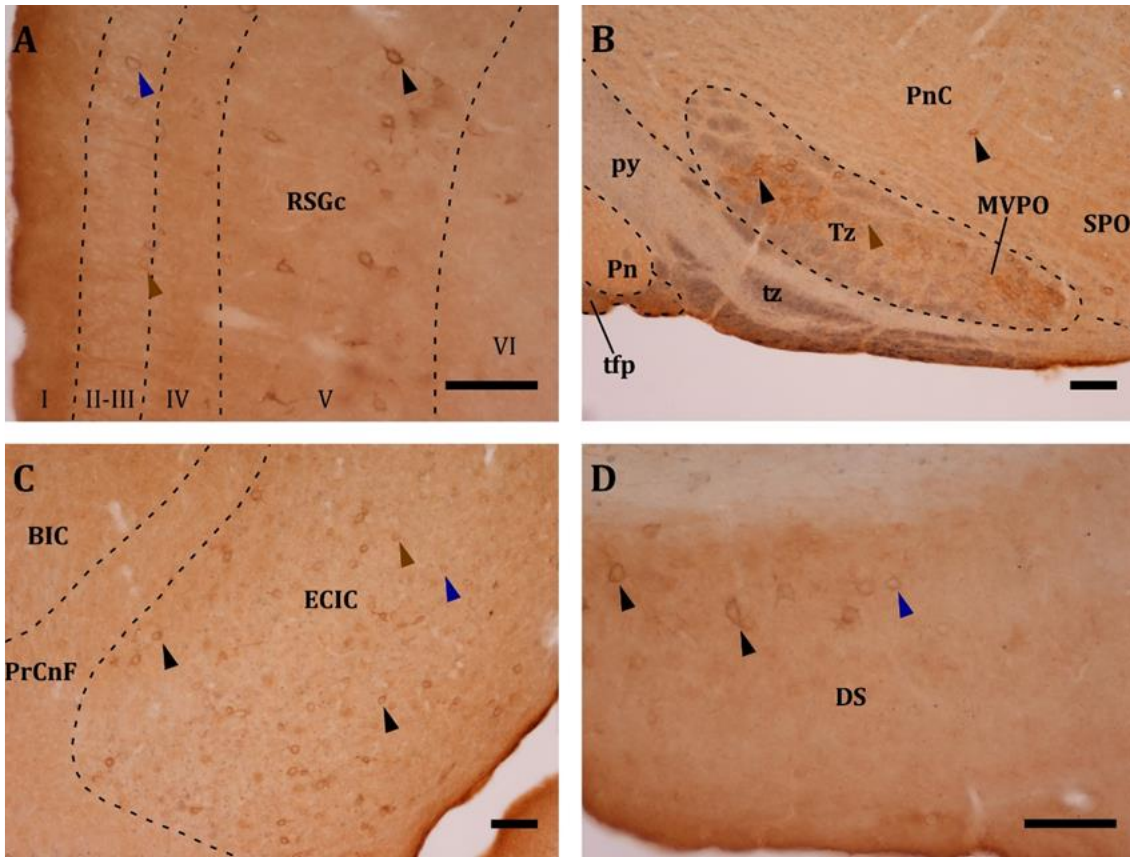


Figura 25. Doble IHQ para α TTP y SVCT2. Las imágenes muestran la IR- α TTP (puntas de flechas azules), SVCT2 (puntas de flechas marrones) y el doble marcaje (puntas de flecha negra). A: Corteza retrosplenial granular, región c (RSGc) en un ratón Pol μ +/+ de 24 meses. B: Núcleo del cuerpo trapezoide (tz) en un Pol μ +/- de 4 meses de edad. C: Corteza externa del colículo inferior (ECIC) en un Pol μ +/+ de 24 meses de edad. D: Subículo dorsal (DS) en un Pol μ +/+ de 24 meses de edad. Barra de escala: 100 μ m. PnC: núcleo reticular pontino, porción cudal; py: tracto piramidal; Pn: núcleo pontino; tfp: fibras transversales de la protuberancia; Tz: núcleo del cuerpo trapezoide; MVPO: núcleo periolival medioventral; SPO: núcleo paraolivar superior; BIC: núcleo del brazo del colículo inferior; PrCnF: área precuneiforme.

A continuación, se muestran esquemas con las áreas que presentaron marcaje para α TTP y SVCT2 en rojo y amarillo, respectivamente, y en verde cuando se observaron ambos transportadores en la misma región (Figuras 26, 27, 28, 29 y 30). Las secciones representadas corresponden a imágenes que fueron modificadas de "The mouse brain in stereotaxic coordinates" (Franklin & Paxinos, 2008) y cuyas abreviaturas se pueden consultar en la lista de abreviaturas de neuroanatomía. Los niveles que se escogieron, tanto para secciones coronales como para las sagitales, abarcaron la mayoría de las regiones que mostraron IR para estos transportadores y se mostraron en la Tabla 4.

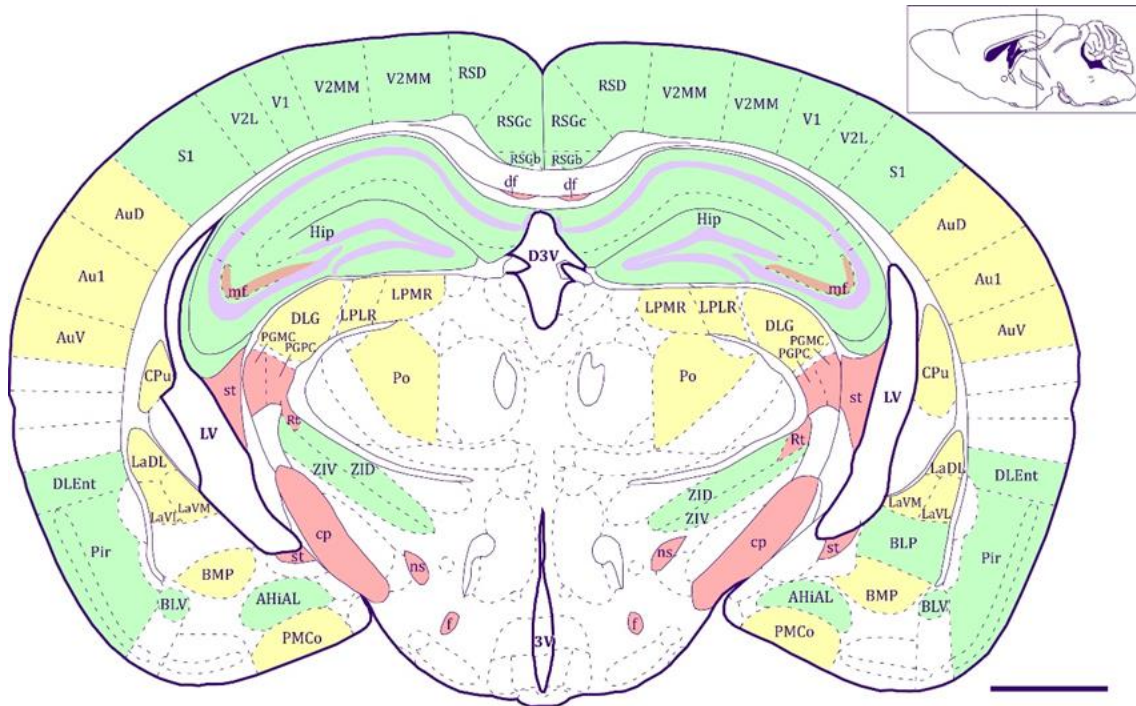


Figura 26. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2. Sección coronal, nivel 49, modificada de "The mouse brain in stereotaxic coordinates". Barra de escala: 1mm.

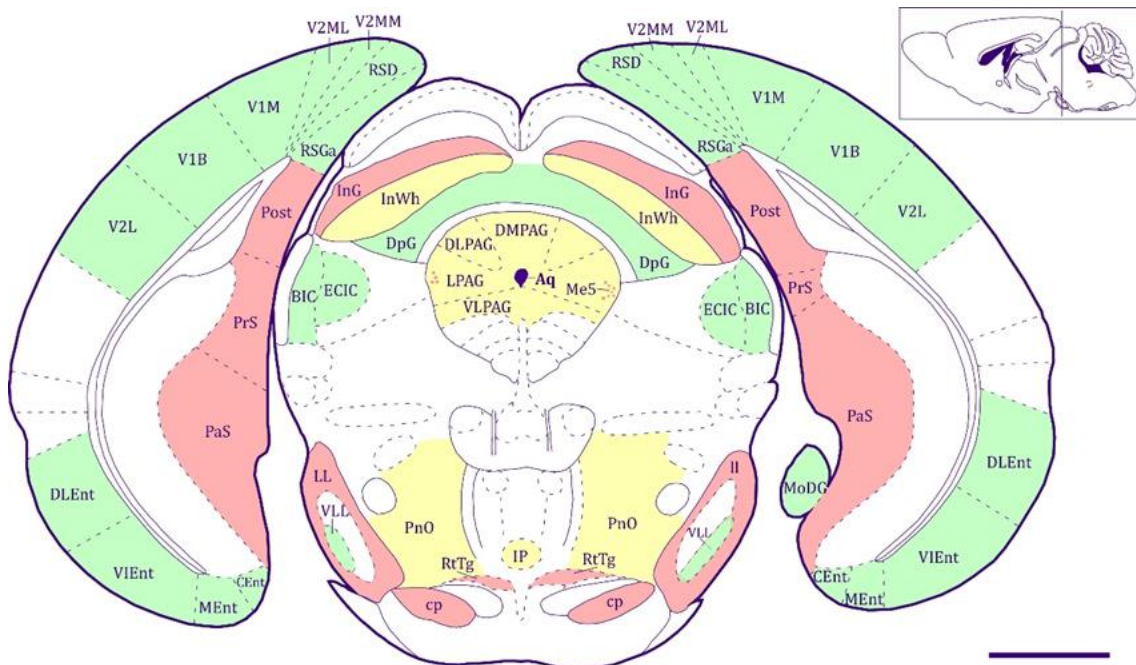


Figura 27. Esquema resumen de las regiones que presentan IR- α TTP y IR-SVCT2. Sección coronal, nivel 65, modificada de "The mouse brain in stereotaxic coordinates". Barra de escala: 1mm.

1.4. Poblaciones celulares que expresan α TTP y/o SVCT2

La IHQ doble para α TTP y NeuN mostró que virtualmente todas las células positivas para α TTP son neuronas, por su colocalización con NeuN (Figura 31).

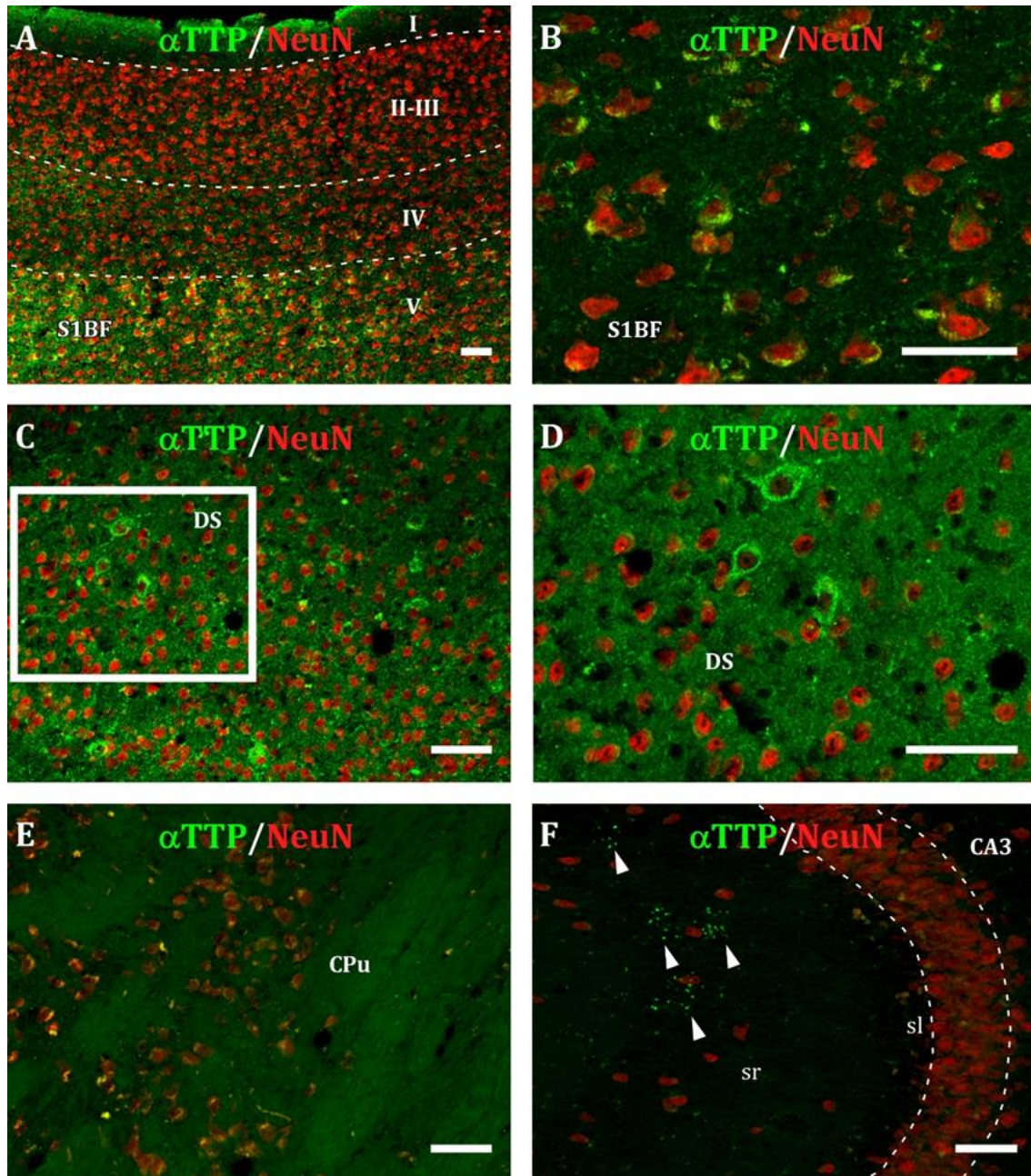


Figura 31. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para α TTP y NeuN. Las fotos muestran en verde la IR- α TTP y en rojo para NeuN en un ratón Pol μ +/- de 24 meses de edad. Todas las imágenes fueron tomadas en secciones sagitales. A: Corteza somatosensorial primaria. B: Detalle de la capa V de la corteza somatosensorial primaria, *barrel fields* (S1BF). C: Subículo dorsal (DS). D: Aumento de la zona recuadrada de la imagen C. E: Núcleo estriado. F: Campo amónico CA3 del hipocampo. Las puntas de flechas indican el marcaje en forma de puntos que también fue observado en la IHQ simple de α TTP. Barra de escala: 50 μ m. CPu: caudate putamen (estriado); sl: estrato lúcido; sr: estrato radiado del hipocampo

Al igual que con α TTP, SVCT2 también se localizó en neuronas, puestas de manifiesto por la IR-NeuN (Figura 32).

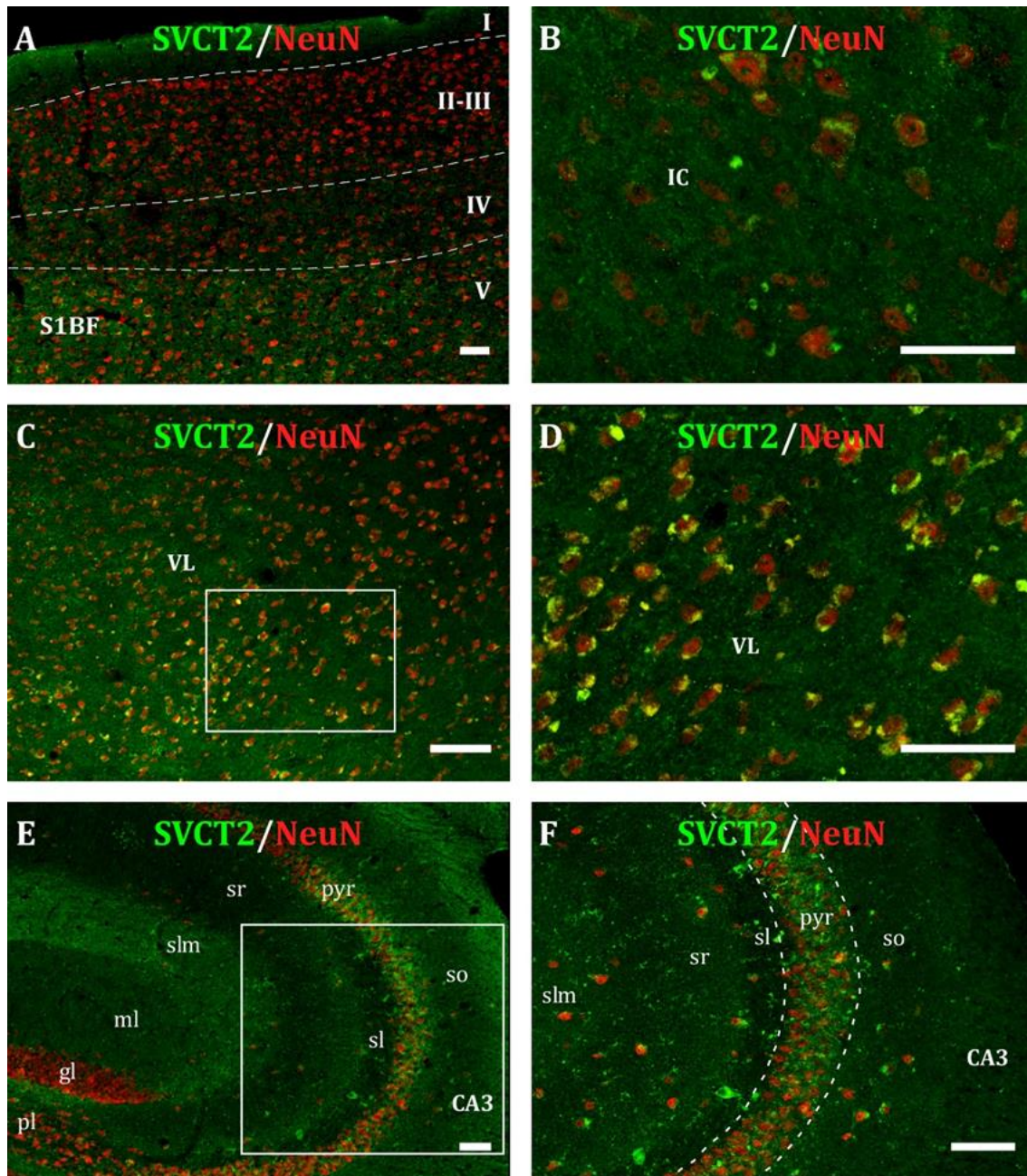


Figura 32. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para SVCT2 y NeuN. Las fotos muestran en verde la IR-SVCT2 y en rojo para NeuN, en secciones sagitales de un ratón Pol μ +/- de 18 meses de edad. A: Corteza somatosensorial primaria, *barrels fields* (S1BF). B: Corteza insular (IC). C: Núcleo ventrolateral del tálamo (VL). D: Aumento de la zona recuadrada de la imagen C. E: Hipocampo. F: Campo amónico CA3 del hipocampo de la zona recuadrada de la imagen E. Barra de escala: 50 μ m. gl: estrato granuloso; ml: estrato molecular; sr: estrato radiado; sl: estrato lúcido; slm: estrato lacunoso-molecular; pl: capa polimórfica; pyr: estrato piramidal; so: estrato *oriens*.

La IHQ doble de α TTP y GFAP evidenció la ausencia de colocalización de estas dos proteínas (Figura 33 A-C). Aunque, sí se observó colocalización en la capa de las células de Purkinje en el cerebelo (Figura 33 D). SVCT2 tampoco mostró colocalización con GFAP (Figura 34). No se observaron diferencias en el tamaño y la forma de los astrocitos, así como la densidad glial.

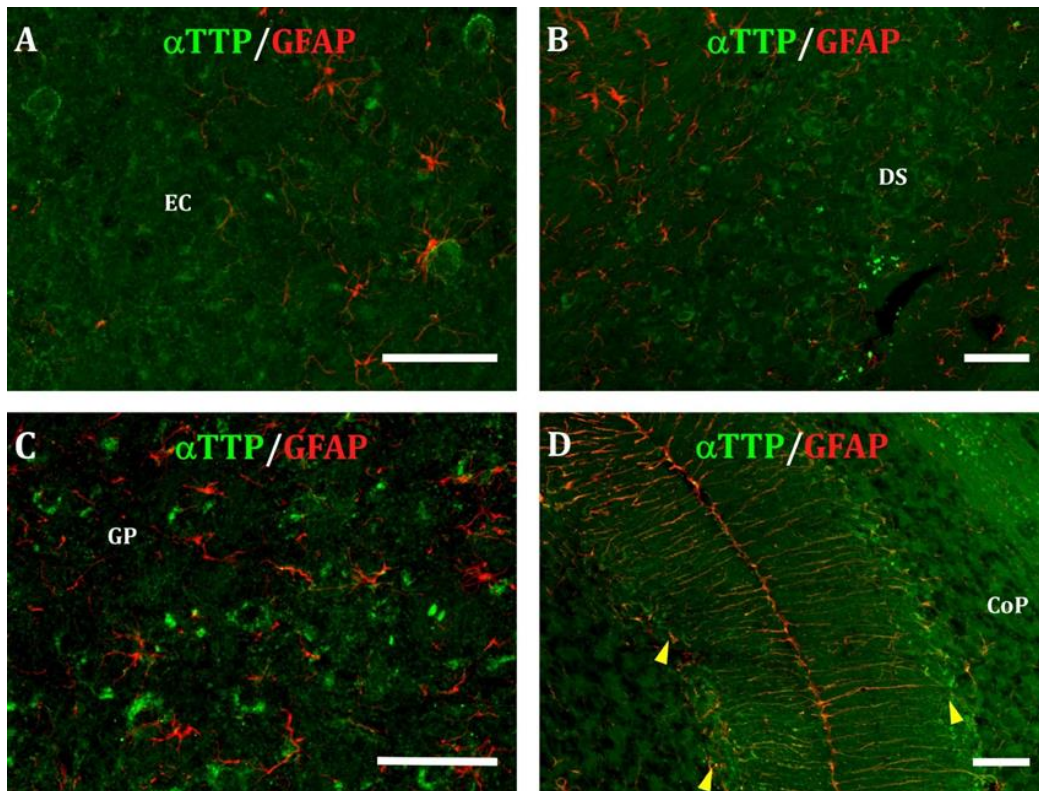


Figura 33. Imágenes de microscopio confocal de IHQ para α TTP y GFAP. Salvo en cerebelo, no hay colocalización entre ambos marcadores. En verde se muestra la IR- α TTP y en rojo para GFAP en un ratón KO de 24 meses de edad. Las imágenes fueron tomadas en secciones sagitales. A: Corteza entorrinal (EC). B: Subículo dorsal (DS). C: Globo pálido (GP). D: Capa de las células de Purkinje (CoP) del cerebelo. Se aprecia doble marcaje en la glía de Bergmann (puntas de flecha). Barra de escala: 50 μ m.

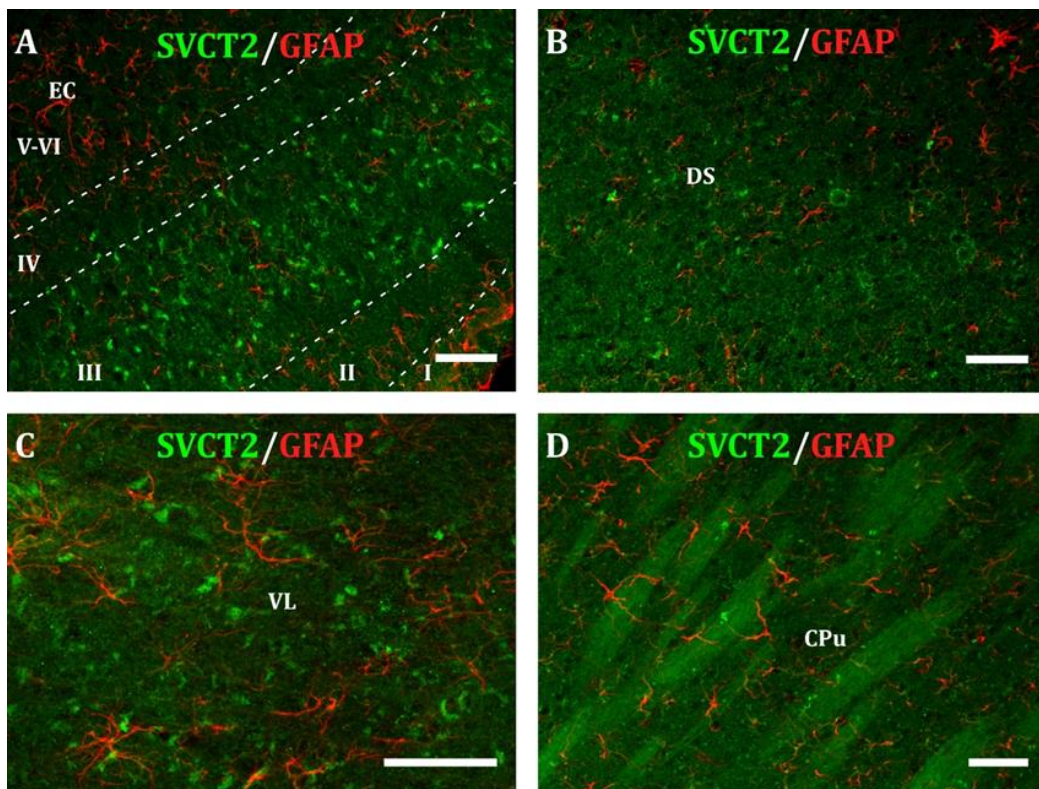


Figura 34. Imágenes de microscopio confocal de IHQ doble para SVCT2 y GFAP. Las fotografías muestran en verde la IR-SVCT2 y en rojo para GFAP, en secciones sagitales de un ratón Pol μ +/- de 24 meses de edad. A: Corteza entorrinal (EC). B: Subículo dorsal (DS). C: Núcleo ventrolateral del tálamo (VL). D: Núcleo estriado. Barra de escala: 50 μ m. CPu: caudado putamen (estriado).

2. Determinación de α T mediante LC-ESI-MS/MS

Para llevar a cabo la cuantificación de α T se propuso desarrollar un método analítico para la determinación de la concentración usando como IS su análogo seis veces deuterado (d_6 - α T). Es por ello, que se usaron tanto áreas de pico absolutas (APA), como áreas de pico relativas (RPA, del inglés *relative peak area*), tanto para la optimización, como para la validación, respectivamente.

Durante todo el proceso de optimización y validación se utilizó una “disolución mezcla de trabajo” compuesta por 5 μ g/mL de α T y d_6 - α T disueltas en EtOH con el fin de evaluar los parámetros cromatográficos y de calidad analítica.

2.1. Optimización del método analítico

La optimización de un método analítico consiste, principalmente, en el estudio y selección de los valores que pueden adoptar el conjunto de los parámetros que interfieren en dicho método y que dan lugar al mejor resultado posible en términos de resolución (R_s), áreas de picos y t_R , entre otros.

El diseño del proceso de optimización se realizó según el método clásico, que consiste en seleccionar uno de los parámetros a estudiar y evaluarlo mientras los demás parámetros se mantienen constantes. Por tanto, se seleccionó el valor óptimo de cada parámetro analizado de forma individual y éste se mantuvo constante en el resto del proceso. Lo que permite obtener todos los parámetros óptimos de uno en uno. Para ello, la inyección del analito en el equipo, y, en consecuencia, el análisis de una medida realizada en unas condiciones determinadas, se realizó por triplicado.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la optimización de los parámetros cromatográficos de la LC y los relacionados con el detector de MS.

2.1.1. Parámetros cromatográficos (HPLC)

Como se comentó anteriormente, dentro de los parámetros que pueden afectar a la separación cromatográfica, se estudiaron aquellos que estaban relacionados con la fase móvil y la fase estacionaria (columna cromatográfica), usando como detectores el DAD y la MS en modo on-line. En relación con la fase móvil, se evaluó tanto los componentes como la composición de ésta, ya que está directamente relacionada con el pH y con la fuerza iónica, el flujo y el modo de elución en el caso de que fuera necesario utilizar un gradiente de elución. En el caso

de la fase estacionaria, se usó una columna estándar basada en una fase estacionaria C18 (Zorbax Eclipse Plus) que permitiera llevar a cabo de forma adecuada la elución del α T. Se tuvieron en cuenta las características físico-químicas del compuesto y que permitiera trabajar bajo unas condiciones amplias encunto a la composición de la fase móvil, así como una temperatura que permitiera obtener un pico cromatográfico adecuado. También se evaluó la influencia del volumen de inyección, ya que la aplicación final del método analítico que se propone es determinar α T en muestras biológicas de volumen limitado.

Inicialmente se probaron composiciones de fase móvil compuestas por una fase acuosa (tampones volátiles) y una fase orgánica compatibles con el detector de MS. Estas pruebas preliminares hicieron descartar el uso de cualquier fase acuosa ya que proporcionaba picos cromatográficos muy retenidos, anchos y asimétricos. Ya que el desarrollo cromatográfico no estaba condicionado por la separación de diferentes compuestos, sino que se se trata de la determinación un único analito, se intentó desde el inicio un análisis rápido que permitiera la determinación de un número muy elevado de muestras en el menor tiempo posible. Por tanto, se propuso el uso, en la fase móvil, de una mezcla de disolventes orgánicos, lo que ayudaría a disminuir el t_R y, en consecuencia, el tiempo de análisis total. Es por ello por lo que se realizaron diferentes pruebas en las que se usaron mezclas de varios tipos de disolventes orgánicos como: acetonitrilo, metanol e IPA. La combinación de acetonitrilo y IPA permitió la obtención de picos mejor definidos que los que se observaron cuando se utilizó metanol en combinación con los otros. Para la búsqueda de la proporción de estos disolventes se tuvo en cuenta, por un lado, el t_R , que disminuía a medida que aumentaba la proporción del acetonitrilo y, por otro, que cuanto mayor era la proporción de IPA, mayor era la presión generada en las bombas del equipo. En función de éstas dos premisas, se seleccionó una composición de la fase móvil conformada por acetonitrilo:IPA (50:50 v/v), que permitió obtener un t_R bajo y una presión de columna adecuada para su uso diario.

El flujo de la fase móvil es un parámetro que afecta también al t_R del compuesto y, en menor medida, a la forma del pico cromatográfico. Para su estudio, se evaluó en un intervalo de valores comprendido entre 0.1-0.7 mL/min (dentro de los valores que permite el equipo y la presión permitida para trabajar en la

columna). Como era de esperar, este parámetro afectó al t_R , mientras que no tuvo influencia relevante en la definición y área del pico. Se seleccionó un flujo de 0.4 mL/min que permitía obtener un t_R de 0.7 min. La selección de la composición de la fase móvil y el flujo de ésta facilitó la elución e hizo posible que se pudiera llevar a cabo en condiciones isocráticas, sin la necesidad de tener que recurrir a realizar un gradiente de elución, modo que en gran medida confiere cierta irreproducibilidad a la metodología.

La temperatura de la columna fue estudiada, ya que la forma del pico cromatográfico a temperatura bajas suele presentar bases anchas con presencia, en algunos casos, de cola. Teniendo en cuenta el t_R y la definición del pico cromatográfico, se seleccionó una temperatura de 40 °C del intervalo de valores estudiados (entre 20-80 °C, de acuerdo con los valores que permitía la columna y el equipo), obteniendo un t_R bajo (0.7 min) y una forma de pico adecuada.

En el caso del volumen de inyección, aunque no debe influir en las RPA, se evaluó su influencia en cuánto a la obtención de picos cromatográficos bien definidos y simétricos. Se evaluaron volúmenes dentro del intervalo de valores que el equipo permite (entre 2-15 μ L). A pesar de que las diferencias entre los diferentes volúmenes fueron mínimas, se seleccionó como volumen óptimo 5 μ L por tratarse del volumen más pequeño que, proporcionaba una alta RPA y obviamente, implicaba una menor cantidad de muestra inyectada en cada replicado (Figura 35).

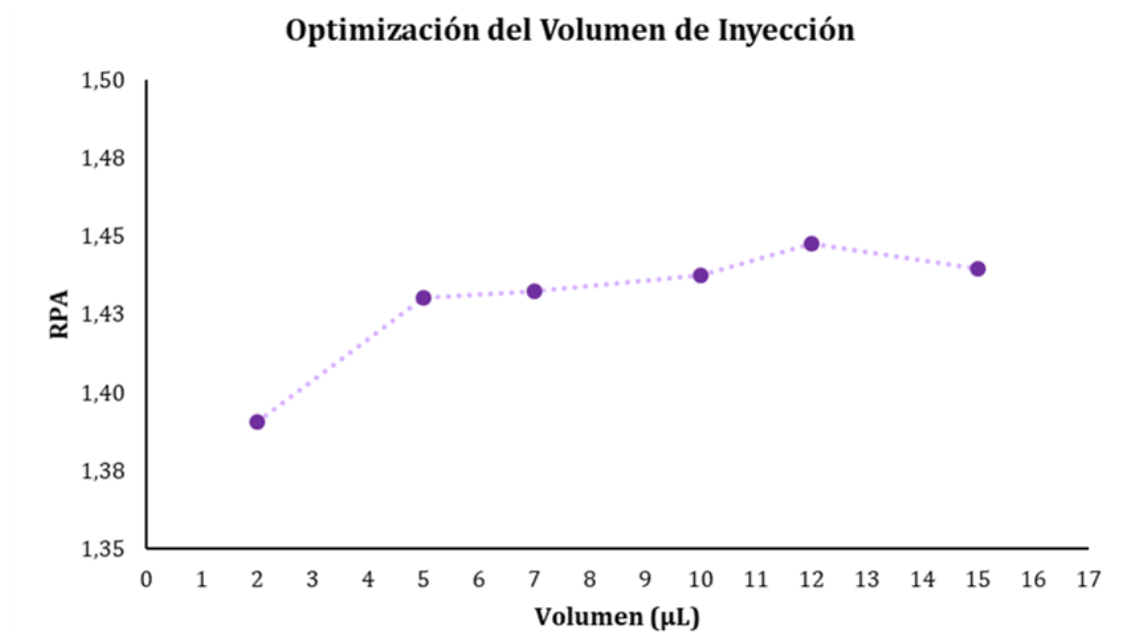


Figura 35. Influencia del volumen de inyección frente al área de pico relativa (RPA). Representación del estudio de optimización del volumen a inyectar en el HPLC.

Por último, se seleccionó la longitud de onda adecuada para la determinación de αT (295 nm) tras la obtención del espectro de absorción, en un intervalo entre 200-400 nm, bajo las mismas condiciones de trabajo.

En la Tabla 5 se muestra un resumen de los parámetros instrumentales seleccionados tras el proceso de optimización de las condiciones cromatográficas.

Parámetros LC	Intervalo evaluado	Valor seleccionado
<i>Fase móvil: componentes y % (v:v)</i>	Diferentes fases entre 20 - 80 %	Acetonitrilo:2-propanol (50:50)
<i>Flujo de la fase móvil (mL/min)</i>	0.1-0.7	0.4
<i>Columna</i>	-	C18
<i>Temperatura de la columna (°C)</i>	20-80	40
<i>Volumen de inyección (μL)</i>	2.0-15	5
<i>Longitud de onda (nm)</i>	-	295

Tabla 5. Parámetros optimizados de la LC.

Finalizada la optimización de los parámetros cromatográficos se procedió a optimizar los parámetros del detector de MS que estaba compuesto por una interfase de ionización basada en ESI y un QqQ.

2.1.2. Parámetros del ESI-MS/MS

Inicialmente se procedió a la selección de los iones precursores y productos. Para ello, se utilizó el software "Optimazer" versión B.07.00 (MassHunter, Agilent Technologies), integrado con el equipo, y se aplicó en modo "*full scan*", que permite obtener los iones de primera generación. Además, esta primera optimización permite obtener de forma automática los valores iniciales de parámetros instrumentales necesarios para generar los iones precursores, como el fragmentador; y los iones producto, como la energía de colisión y la abundancia de cada uno de ellos.

Para la correcta identificación y cuantificación del compuesto a analizar, se deben seleccionar al menos tres transiciones de los iones producto procedentes del ion precursor. De esas tres transiciones, una, la más abundante, es empleada como transición cuantitativa mientras que las restantes (al menos dos), fueron utilizadas como transiciones de identificación, denominadas cualitativas. Una vez aplicado el Optimazer, se observó que el modo de ionización más estable y sensible es el negativo $[M-H]^-$ frente al positivo $[M-H]^+$, tal y como se puede observar en el

espectro de masas (Figura 36), que se corresponde con la masa del analito. Las transiciones seleccionadas, junto con los parámetros implicados en su obtención se detallan en la Tabla 6, además de la ratio de las transiciones cualitativas/cuantitativa tanto para el αT como del $d6-\alpha T$.

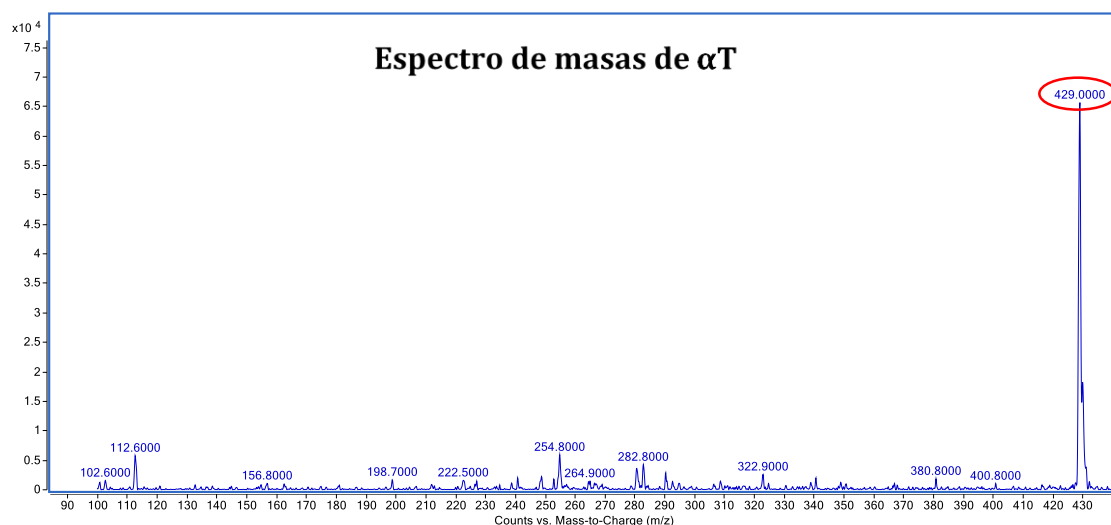


Figura 36. Espectro de masas de αT . Selección del ion precursor obtenido en modo de ionización negativo en un intervalo de 80 y 440 m/z .

Molécula (peso molecular g/mol)	Ion precursor (m/z) [M-H] ⁻	Fragmentador (V)	Energía de colisión (eV)	Ion producto (m/z) [M-H] ⁻	Tipo de transición	Ratio transición cualitativa/ cuantitativa
αT (340.4)	429.1	100	25	414.0	Cualitativa	4.4
			25	163.0	Cuantitativa	-
			48	134.5	Cualitativa	4.3
$d6-\alpha T$ (436.3)	435.1	98	25	417.0	Cualitativa	4.9
			28	168.9	Cuantitativa	-
			45	140.5	Cualitativa	3.7

Tabla 6. Características de las transiciones de αT y $d6-\alpha T$.

Una vez obtenidas las transiciones más abundantes, y conociendo la estructura química del αT y su deuterado, se propusieron las rutas de fragmentación partiendo del ion precursor que daba lugar a la estructura de los tres iones producto mostrados en las Figuras 37 y 38.

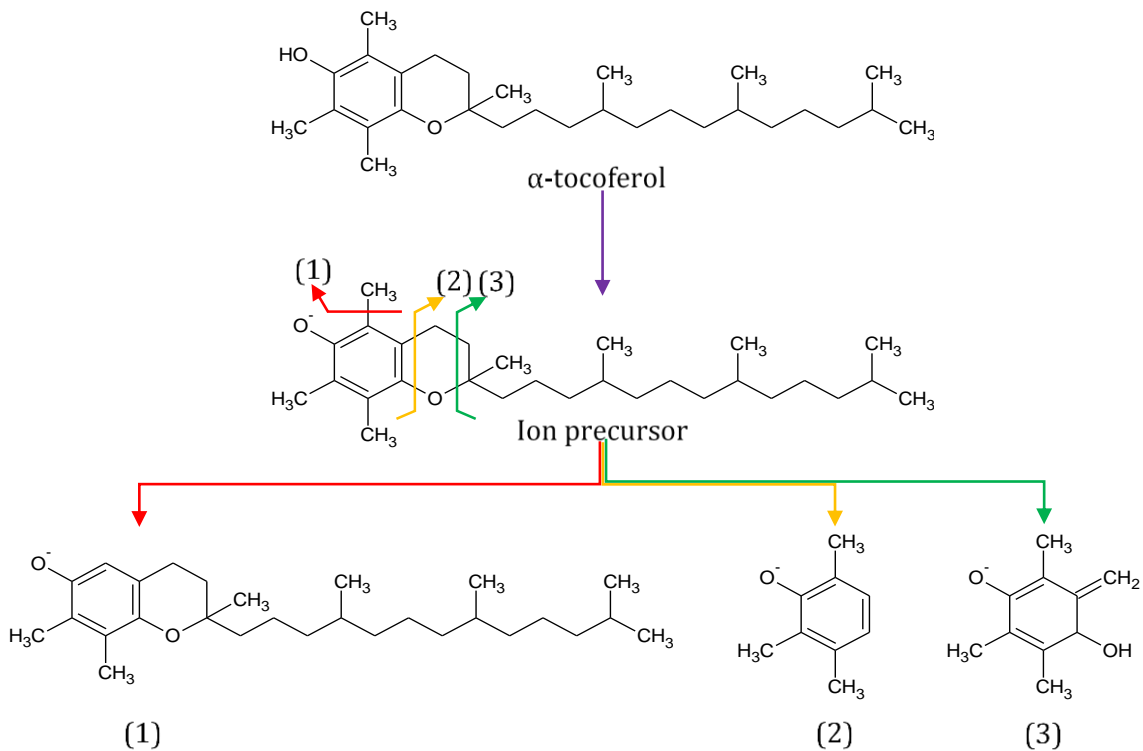


Figura 37. Estructura del α T, el ion precursor y su ruta de fragmentación para la obtención de sus iones producto. Ruta de fragmentación que se propuso para la obtención de las transiciones cuantitativas y cualitativas del α T. (1) 414.0 m/z , (2) 134.5 m/z y (3) 163.0 m/z .

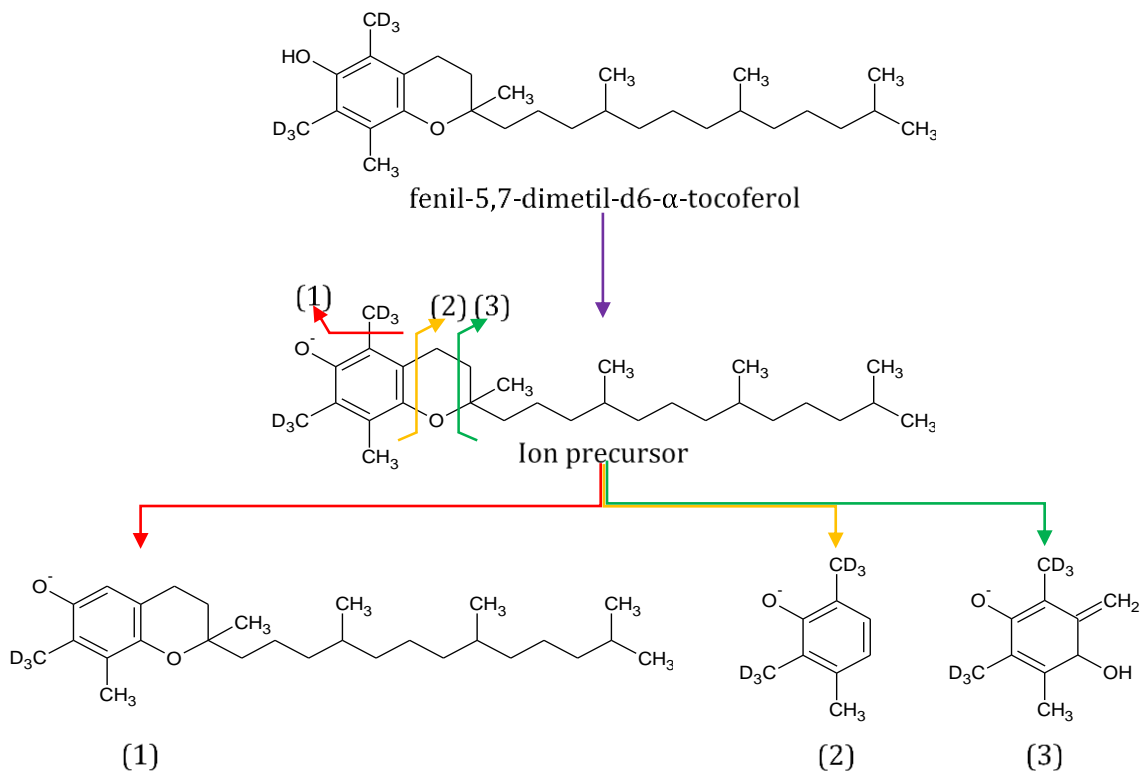


Figura 38. Estructura del d6- α T, el ion precursor y su ruta de fragmentación para la obtención de sus iones producto. Ruta de fragmentación que se propuso para la obtención de las transiciones cuantitativas y cualitativas del α T. (1) 417.0 m/z , (2) 140.5 m/z y (3) 168.9 m/z .

A continuación, se optimizaron aquellos parámetros de la MS que afectan directamente al proceso de ionización de las moléculas, que corresponde a la etapa previa de la generación de los iones precursores y la posterior entrada al analizador y que consta de un QqQ. Se evaluaron el flujo del gas de secado, la temperatura del gas de ionización y la presión del nebulizador, dentro del intervalo de valores que el equipo permitía, teniendo en cuenta, el RPA, la relación señal/ruido (S/N), la estabilidad y la intensidad de la señal.

El flujo del gas de secado, en este caso nitrógeno, ayuda a la formación del electrospray, con la formación inicialmente de microgotas en el proceso de nebulización, facilitando la evaporación de los disolventes y la formación y entrada de las moléculas ionizadas al MS. En este sentido, el intervalo de valores en los que se evaluó este parámetro fue entre 5 y 13 L/min. Tal y como se observa en la Figura 39, al aumentar el flujo de gas de secado, el RPA se mantiene constante en los primeros valores, pero a partir de 8 L/min, aumenta proporcionalmente. A pesar de que el RPA varía muy poco, los valores más bajos del flujo del gas proporcionaron RPA más bajas que el resto. Por esta razón, se seleccionó 13 L/min como valor óptimo, pues es el que mayor RPA confiere a la muestra analizada.

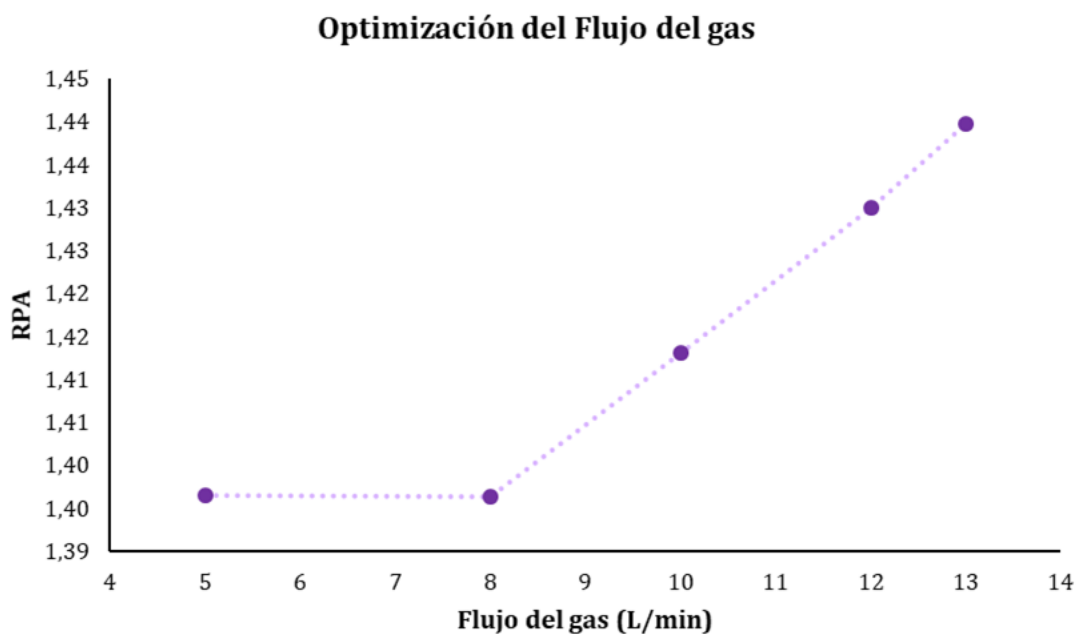


Figura 39. Influencia del flujo del gas sobre el área de pico relativa (RPA) del α T. Gráfica del estudio de la optimización del flujo el gas en la que se observó cómo variaba el RPA a medida que aumentaba el flujo del gas.

La temperatura del gas nitrógeno también influye en la pulverización de la muestra inyectada, ya que los disolventes han de ser evaporados, pero sin que la

molécula se vea afectada por la elevada temperatura. A este respecto, se examinó la influencia de la variación de la temperatura, entre 250-350 °C, con pequeñas variaciones en el RPA (Figura 40). Pese a ello, se comprobó que a los 300 °C la RPA era mayor que para los valores por debajo y por encima de esta cifra, lo que resultó en la formación de una campana, en la que 300 °C era el punto máximo.

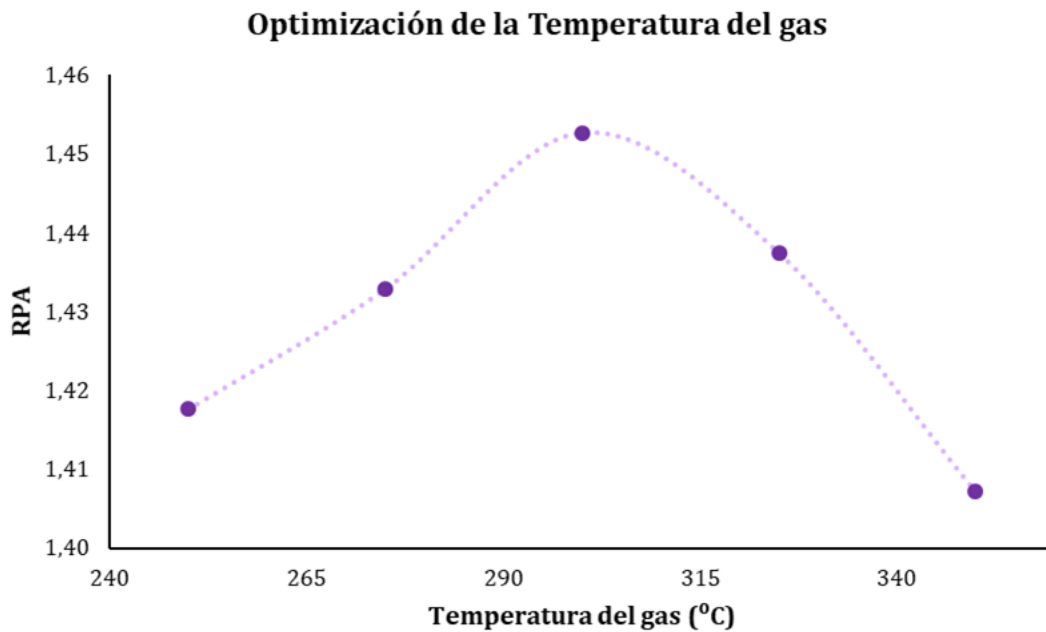


Figura 40. Influencia de la temperatura del gas en el área de pico relativa (RPA). Descripción gráfica de la optimización de la temperatura del gas y su impacto en el RPA.

De forma similar a lo comentado con los dos parámetros anteriores, la presión del nebulizador afecta a la evaporación de la muestra y, por este motivo, fue otro de los parámetros a considerar con el fin de estudiar su efecto sobre la ionización. Los valores de la presión del nebulizador que se tuvieron en cuenta en el estudio variaron entre 10 y 60 p.s.i. Teniendo en cuenta que los resultados oscilaron en un intervalo de valores pequeño, se observaron dos puntos máximos de RPA (Figura 41). De estos dos puntos máximos se seleccionó el de 35 p.s.i. como valor adecuado, pues los datos obtenidos eran más estables que el resto de puntos analizados.

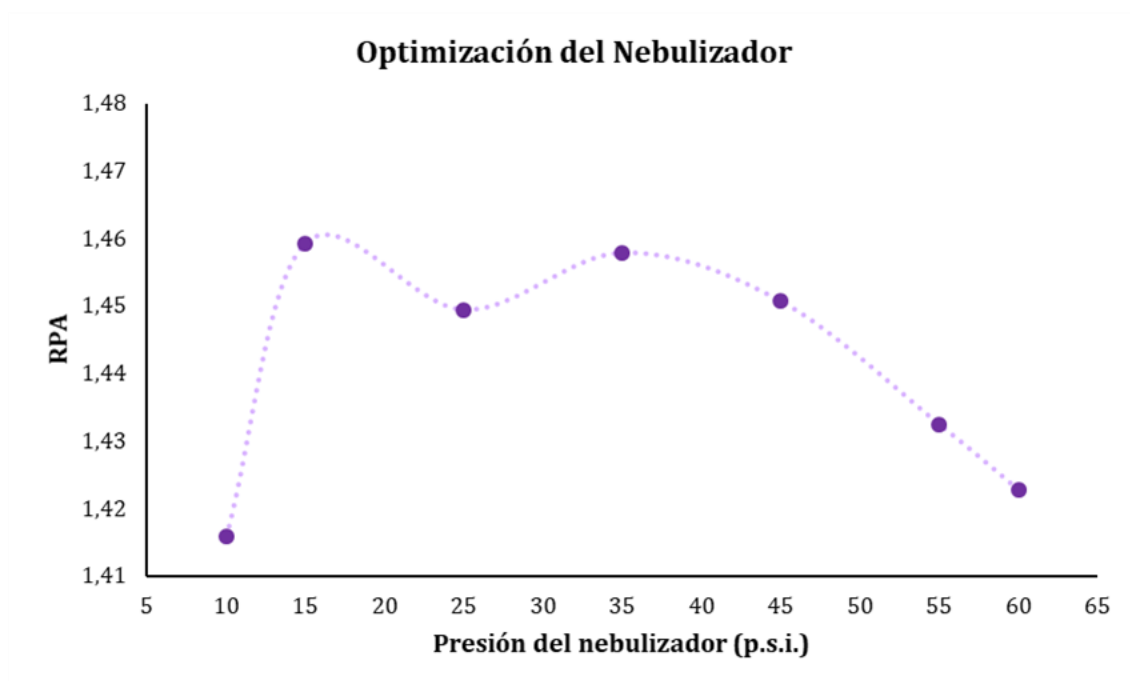


Figura 41. Influencia de la presión del nebulizador en el área de pico relativa (RPA). Evaluación de la optimización de la presión del nebulizador y su efecto en el RPA.

Realizada la optimización de los parámetros que afectan a ESI-MS/MS, junto con los valores predeterminados por la instrumentación, las condiciones de trabajo fueron las que se reflejan en la Tabla 7.

<i>Parámetros ESI-MS/MS</i>	<i>Intervalo evaluado</i>	<i>Valor seleccionado</i>
<i>Flujo del gas (L/min)</i>	5.0-13	13
<i>Temperatura del gas (°C)</i>	250 -350	300
<i>Presión del nebulizador (p.s.i.)</i>	10.0-60	35
<i>Corriente de cámara (μA)</i>	0.23	0.23
<i>Corriente capilar (nA)</i>	39	39

Tabla 7. Parámetros del acoplamiento de la fuente de electrospray con la espectrometría en tándem (ESI-MS/MS) optimizados.

El cromatograma del α T y del d6- α T obtenido en las condiciones optimizadas del LC-MS/MS, junto con sus tres transiciones, se muestran en la Figura 42.

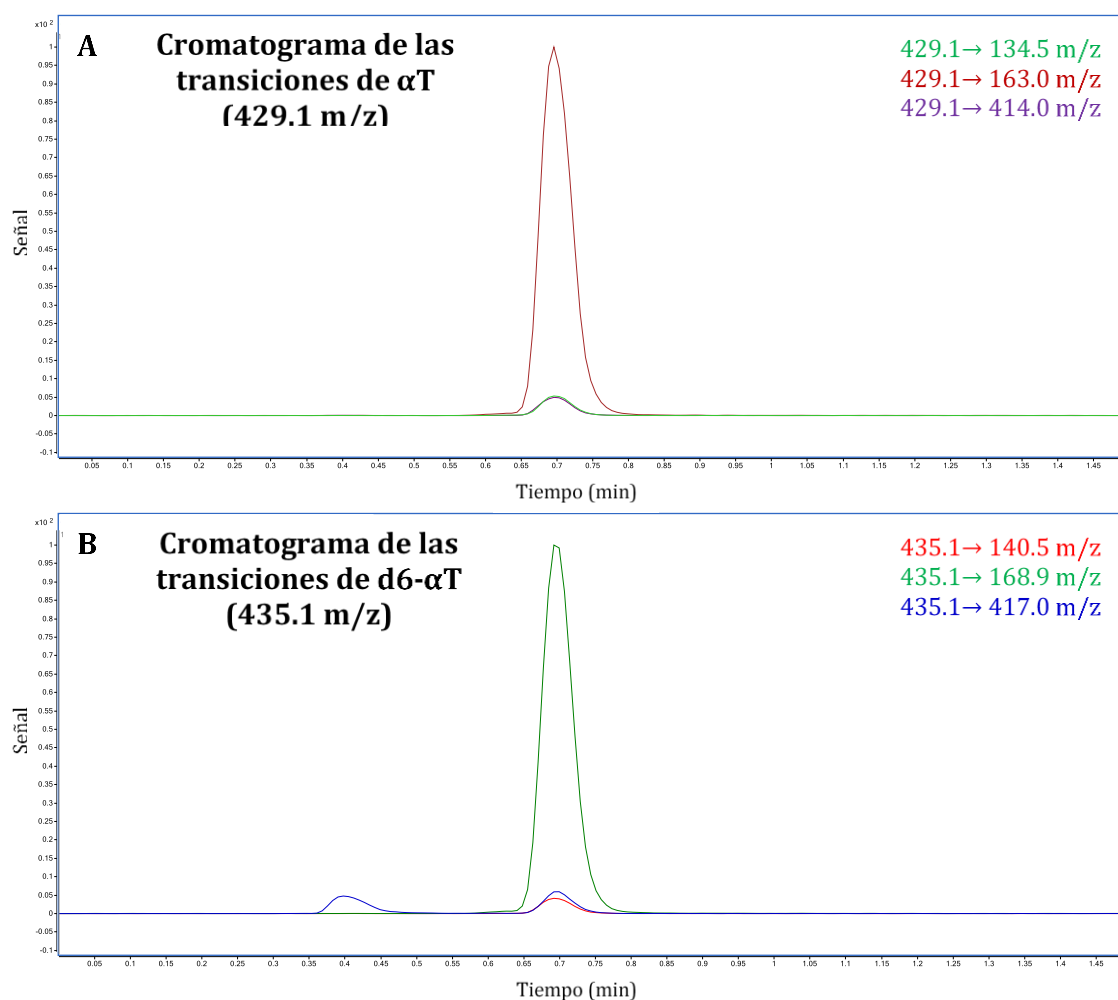


Figura 42. Cromatograma de iones extraídos (EIC) de α T y d6- α T. (A) Cromatograma de las transiciones (m/z) de α T, siendo la transición más abundante 429.1 \rightarrow 163.0 la cuantitativa. (B) Cromatograma de las transiciones (m/z) de d6- α T, siendo la transición más abundante 435.1 \rightarrow 168.9 la transición cuantitativa.

2.2. Validación del método analítico propuesto

La validación consiste en comprobar que el método desarrollado cumple con los requisitos para desempeñar la función para la cual ha sido diseñado (Morillas *et al.*, 2016), en este caso, la determinación cualitativa y cuantitativa del α T con la mayor calidad posible en las muestras deseadas. Para ello, se evaluaron los siguientes parámetros de calidad: precisión (repetibilidad y reproducibilidad), límites de detección (LOD, del inglés *limit of detection*) y de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantitation*), selectividad, linealidad, exactitud y EM. La evaluación se realizó siguiendo las directrices de la Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration, F.D.A.) de los EE.UU. para los métodos de bioanálisis, así como la “*Guía de la Organización Mundial de la Salud sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación. Segunda parte: Validación*” y “*La*

adecuación al uso de los métodos analíticos” del Grupo Eurachem (Chaloner-Larsson *et al.*, 1998; Morillas *et al.*, 2016).

Durante el proceso de validación se requiere que la muestra de trabajo empleada sea lo más parecida posible en términos de composición (matriz) a la muestra real que se pretende analizar. Considerando que las muestras que se querían analizar eran plasma y suero sanguíneo, se usó para el desarrollo del proceso de validación plasma y suero bobino comercial, que fueron procesados por el mismo método que se propuso para las muestras de sangre de ratón.

Las disoluciones empleadas en el proceso de validación fueron disoluciones isopropanólicas y metanólicas (en función de la matriz utilizada, plasma o suero respectivamente) que contenían 5 µg/mL de α T y d6- α T y realizando tres replicados por cada medida. De esta forma se obtuvieron y estudiaron las APA, las RPA, la intensidad de la señal y la relación S/N de todos los parámetros teniendo en cuenta los dos detectores posibles a utilizar (DAD y MS).

En el caso del estudio de la precisión y la exactitud, se requirieron desviaciones estándar relativas (RSD, del inglés *relative standard deviation*) por debajo del 15 % para considerarse adecuadas, mientras que el LOQ requirió una RSD inferior al 20 %. Para evaluar la exactitud y el EM se emplearon los QC detallados en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.2.2. Metodología LC-MS/MS propuesta*”.

2.2.1. Precisión: repetibilidad y reproducibilidad

La precisión estudia la dispersión de los resultados obtenidos cuando se repite n-veces una serie de medidas de una misma muestra. La precisión se puede comprobar en términos de repetibilidad y reproducibilidad, para ello, los datos son analizados con la RSD.

La repetibilidad examina las variaciones que se obtienen cuando una muestra es analizada, con el mismo método analítico y en las mismas condiciones, varias veces en un corto periodo de tiempo. La repetibilidad se examinó realizando un análisis de muestras etanólicas de 5 µg/mL de α T y d6- α T con 8 replicados en las condiciones optimizadas del método analítico.

La reproducibilidad, al igual que la repetibilidad, evalúa los datos resultantes de una misma muestra que es analizada repetidas veces con el mismo método, pero

en diferentes condiciones externas. A este respecto, se repitió el mismo experimento que se realizó para la repetibilidad con 24 - 48 h de diferencia y se compararon las mediadas realizadas en el mismo día (intra-día) y de diferentes días (inter-días).

De las medidas realizadas, tanto en el estudio de repetibilidad como en el de reproducibilidad, se obtuvieron los tiempos de retención, las APA, las RPA y se calcularon sus parámetros estadísticos: medias y RSD. Los resultados se muestran en la Tabla 8. Tal y como indican los datos, el método analítico diseñado es preciso, ya que todos los valores de RSD fueron inferiores al 15 %.

Molécula	Concentración (mg/L)	Intra-día RSD (%), n = 8			Inter-día RSD (%), n = 8		
		t _R	APA	RPA	t _R	APA	RPA
αT	5.0	0.45	3.87	1.35	0.56	1.50	2.74
d6- αT	5.0	0.39	4.88		0.75	2.52	

Tabla 8. Estudio de la presión del método analítico. αT : α -tocoferol; APA: área de pico absoluta; d6- αT : fenil-5,7-dimetil-d6- α -tocoferol; RPA: área de pico relativa; RSD: desviación estándar relativa; t_R: tiempo de retención.

El análisis estadístico empleado, para determinar si existen diferencias entre los análisis realizados, fue un test F-Snedecor con un nivel de confianza del 95 % y 7 grados de libertad ($n = 8$). No se encontraron diferencias significativas intra-día e inter-día.

2.2.2. Límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ)

El LOD se define como la concentración mínima que puede ser detectada por el método analítico, sin que sea necesariamente cuantificable, pero sí diferenciable del ruido de la línea base. Este parámetro da una idea acerca de la sensibilidad del método, mientras que el LOQ sería la concentración mínima cuantificable (RSD < 20 %) de una muestra que puede realizarse con una precisión y una exactitud aceptable y de forma reproducible.

LOD y LOQ se hallaron de forma experimental inyectando muestras de plasma y suero comercial dopadas con αT . La integración del área del pico cromatográfico de los compuestos proporciona el valor de la S/N de forma predeterminada en el equipo, de esta forma, se compararon las S/N hasta obtener ratios mínimas de 3:1 para el LOD y de 10:1 para el LOQ con RSD menores al 20 %. A partir de ello, el LOQ se puede calcular de forma teórica (como herramienta orientativa) a partir de la Ecuación 2.

$$\begin{array}{ccc}
 \text{LOD} = \frac{3}{1} \cdot \frac{S}{N} & & \text{LOQ} = \frac{10}{1} \cdot \frac{S}{N} \\
 \curvearrowright & & \curvearrowleft \\
 \frac{S}{N} = \frac{3}{\text{LOD}} & = & \frac{S}{N} = \frac{10}{\text{LOQ}}
 \end{array}$$

$$\frac{3}{\text{LOD}} = \frac{10}{\text{LOQ}} \rightarrow \text{LOQ} = \frac{10}{3} \cdot \text{LOD}$$

Ecuación 2.
$$\text{LOQ} = \frac{10}{3} \cdot \text{LOD}$$

Los valores alcanzados de LOD fueron de 0.9 y 0.12 $\mu\text{g/mL}$ para el DAD y el ESI-MS/MS, respectivamente. En el caso del LOQ se encontró que era de 3.0 y 0.4 $\mu\text{g/mL}$ para el DAD y el ESI-MS/MS respectivamente. Estos límites fueron comunes tanto para el αT como para el d6- αT .

2.2.3. Selectividad

La selectividad, también conocida como especificidad en otros ámbitos como el sector farmacéutico, hace referencia a la capacidad del método para identificar el analito de interés en presencia de otros componentes propios de la matriz a estudiar, sin que éstos interfieran en la medida. Es un parámetro identificativo, propio de una sustancia, que permite comprobar que la medida es referente a la molécula que se está analizando y no a un compuesto químico que se comporta de forma similar o a una coincidencia, lo que provocaría un error significativo en la medición.

Se evaluó la selectividad con seis alícuotas del plasma y el suero comercial tratados como se describe en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.2.5. A. Muestras de sangre: plasma y suero*” y seis alícuotas de EtOH. Estas alícuotas se compararon con sus respectivos homólogos, que habían sido dopados con la cantidad del LOQ en las condiciones optimizadas del método. Los resultados no mostraron ninguna interferencia de picos para el t_{R} del αT y el d6- αT , usando en este caso concreto las transiciones cualitativas.

2.2.4. Intervalo lineal y calibración

La linealidad se entiende como un rango o intervalo en el que los datos obtenidos (áreas o altura de pico) son directamente proporcionales a la

concentración de la molécula/s estudiada/s en una determinada muestra. Para su estudio, se utilizaron las RPA y un ajuste de regresión de mínimos cuadrados, en el cual, el coeficiente de correlación lineal (r) no ha de ser inferior a 0.999 para que el ajuste se considere adecuado.

Se propuso un intervalo en el que la concentración más baja de αT se encontraba próxima a la del LOQ y la concentración máxima por encima de las concentraciones habituales de trabajo. Este intervalo de estudio fue diferente para muestras detectadas con DAD de las detectadas con ESI-MS/MS. Se realizaron curvas de calibrado para plasma, suero y EtOH. En cada uno de los niveles de concentración se contaba con una concentración constante y conocida de $d6-\alpha T$ (5 $\mu g/mL$) usado como IS. Se prepararon de nuevo otras curvas de calibrado en las mismas condiciones para realizar un análisis estadístico entre días y examinar si el ajuste se veía alterado con el paso del tiempo. Para el análisis estadístico se aplicó el test de ANOVA de una vía, asumiendo varianzas equivalentes y un nivel de significación de 0.05 (IBM SPSS Statistics, versión 22).

Los intervalos de trabajo, las ecuaciones lineales y el coeficiente de determinación (r^2) se indican en la Tabla 9. Todos los ajustes se encontraron dentro de los valores de r adecuados para un buen ajuste lineal. También se encontraron diferencias significativas entre las curvas de calibrado preparadas en diferentes días de EtOH y plasma detectadas con la MS.

<i>Detector</i>	<i>Matriz</i>	Intervalo de concentración ($\mu g/mL$)	Ecuación de la regresión lineal	Coefficiente de determinación (r^2)
<i>DAD</i>	Día 1 - EtOH	3.00-200.0	$y = 108540 x - 266074$	0.9991
	Día 2 - EtOH		$y = 107370 x - 199852$	0.9984
<i>ESI-MS/MS</i>	Día 1 - EtOH	0.6125-20.00	$y = 1.1087 x + 0.0410$	0.9998
	Día 2 - EtOH		$y = 1.0791 x + 0.0363^*$	0.9993
	Día 1 - Plasma	0.6125-20.00	$y = 0.8199 x + 0.7050$	0.9993
	Día 2 - Plasma		$y = 0.7677 x + 0.6409^*$	0.9989
	Día 1 - Suero	0.6125-20.00	$y = 0.8216 x + 0.3393$	0.9999
	Día 2 - Suero		$y = 0.6799 x + 0.5879$	0.9994

Tabla 9. Análisis del intervalo lineal. Calibraciones de diferentes matrices para el detector de diodos (DAD) y el acoplamiento de la fuente de electrospray con la espectrometría en tándem (ESI-MS/MS) en diferentes días. Se consideró $*P < 0.05$ entre días diferentes. EtOH: etanol.

2.2.5. *Exactitud*

La exactitud se entiende como el grado de concordancia entre el valor obtenido tras la medida y el valor real de la muestra. Su estudio se lleva a cabo mediante la comparación del valor medido frente al valor real y se expresa en tanto por ciento (Ecuación 3).

Ecuación 3.
$$Exactitud = \frac{Valor\ medido}{Valor\ real} \cdot 100$$

Adicionalmente, se evaluó la recuperación del proceso de extracción de las muestras de plasma y suero cuando el IS es añadido antes del tratamiento y el EM, que se refiere a la interferencia que provocan en la medida los compuestos presentes en una matriz compleja. Se usó la RSD como parámetro indicativo de que los valores resultantes eran adecuados.

Para ello se prepararon tres QC con tres concentraciones diferentes (0.6125, 2.5 y 10 µg/mL) para plasma y suero. Este procedimiento se hizo dos veces, uno añadiendo el IS antes del tratamiento de la muestra (para estudiar la recuperación) y, otro, añadiendo el IS después del tratamiento (exactitud), previo a su inyección en el LC-ESI-MS/MS.

Las Tablas 10 y 11 indican los valores de los parámetros analizados. Todas las recuperaciones se encontraban entre el 98 y 117.9 % con RSD menores del 6 %. El EM no fue significativo, ya que todas las RSD se encontraron por debajo del 10 %. Además, no se encontraron diferencias entre añadir el IS antes o después del tratamiento.

<i>Plasma</i>								
<i>Compuesto</i>	IS añadido post-tratamiento de la muestra				IS añadido pre-tratamiento de la muestra			
	[αT] real (µg/mL)	[αT] medida (µg/mL)	RSD (%)	Exactitud (%)	[αT] real (µg/mL)	[αT] medida (µg/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)
<i>αT + 5 mg/mL de IS</i>	0.6125	0.7219	5.38	117.9	0.6125	0.6506	1.75	106.2
	2.5000	2.6195	3.32	104.8	2.5000	2.5208	5.38	100.8
	10.000	10.1525	1.52	101.5	10.000	10.112	4.98	101.1

Tabla 10. Evaluación de la recuperación y la exactitud en plasma. El estudio se llevó a cabo añadiendo el patrón interno (IS) antes y después del tratamiento de la matriz. αT: α-tocoferol; RSD: desviación estándar relativa.

Compuesto	Suero				Suero			
	IS añadido post-tratamiento de la muestra				IS añadido pre-tratamiento de la muestra			
	[α T] real (μ g/mL)	[α T] medida (μ g/mL)	RSD (%)	Exactitud (%)	[α T] real (μ g/mL)	[α T] medida (μ g/mL)	RSD (%)	Recuperación (%)
α T + 5 mg/mL de IS	0.6125	0.6224	1.23	101.6	0.6125	0.6204	0.19	101.3
	2.5000	2.4903	5.26	99.60	2.5000	2.4491	1.93	98.00
	10.000	10.0085	0.54	100.1	10.000	10.2347	4.05	102.3

Tabla 11. Estudio de la recuperación y la exactitud en suero. El análisis se realizó añadiendo el patrón interno (IS) antes y después del tratamiento del suero. α T: α -tocoferol; RSD: desviación estándar relativa.

2.2.6. Optimización del pretratamiento de muestras biológicas para la determinación de α T

Inicialmente, se trataron las muestras de tejidos de ratón utilizando el mismo tratamiento que el realizado en las muestras de plasma, ya que contiene una matriz más compleja que la del suero (ver sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.2.5. A. Muestras de sangre: plasma y suero*”). Sin embargo, estos primeros estudios no resultaron adecuados a este tipo de muestras debido a que se observó un mayor EM en las medidas. Dada la importancia del procesamiento de los tejidos, para optimizar su tratamiento, tras su homogeneización, se sometieron a diferentes estudios con el fin de seleccionar el procedimiento más adecuado para el tratamiento de cada una de ellas. El método empleado en el tratamiento del plasma reúne los principales pasos a tener en cuenta en este tipo de análisis, por ello se tomó de referencia y se realizaron modificaciones que se pueden dividir en dos tipos:

- **Aumento del volumen de los disolventes empleados (AVD).** Se establecieron 3 estudios con diferentes volúmenes (Tabla 12).

Disolventes AVD₁ (μ L) AVD₂ (μ L) AVD₃ (μ L)

PBS	200	350	500
SDS	500	1300	2000
EtOH	1000	2500	4000
BHT-1	2000	3500	5000
BHT-2	2000	3500	5000
IPA+d6- α T	190+10	332.5+17.5	475+25

Tabla 12. Esquema resumen de los protocolos de aumento del volumen de los disolventes (AVD) utilizados para procesar las muestras. BHT-1 y 2: butilhidroxitolueno (primer y segundo paso); d6- α T: fenil-5,7-dimetil-d6- α -tocoferol; EtOH: etanol; IPA: isopropanol; PBS: tampón fosfato salino; SDS: dodecilsulfato sódico.

- **Aumento del volumen de reconstitución (AVR).** Se establecieron 3 métodos en los cuales el volumen de los disolventes se mantuvo constante, mientras que el volumen de reconstitución se modificó en cada uno de ellos (Tabla 13).

<i>Disolventes</i>	<i>AVR₁ (μL)</i>	<i>AVR₂ (μL)</i>	<i>AVR₃ (μL)</i>
<i>PBS</i>	200	200	200
<i>SDS</i>	500	500	500
<i>EtOH</i>	1000	1000	1000
<i>BHT-1</i>	2000	2000	2000
<i>BHT-2</i>	2000	2000	2000
<i>IPA+d6-αT</i>	190+10	332.5+17.5	475+25

Tabla 13. Esquema resumen de los protocolos de aumento del volumen de reconstitución (AVR) utilizados para procesar las muestras. BHT-1 y 2: butilhidroxitolueno (primer y segundo paso); d6-αT: fenil-5,7-dimetil-d6-α-tocoferol; EtOH: etanol; IPA: isopropanol; PBS: tampón fosfato salino; SDS: dodecilsulfato sódico.

Inicialmente se aplicaron los tres protocolos de AVR a cinco muestras de hígado y cerebro. En ambos casos, a medida que se aumentaba el volumen, el valor de S/N era mayor, por tanto, la señal era mayor y la forma y la definición del pico cromatográfico también, observándose menos interferencias, lo que finalmente ayudaría a la integración del pico (Figura 43).

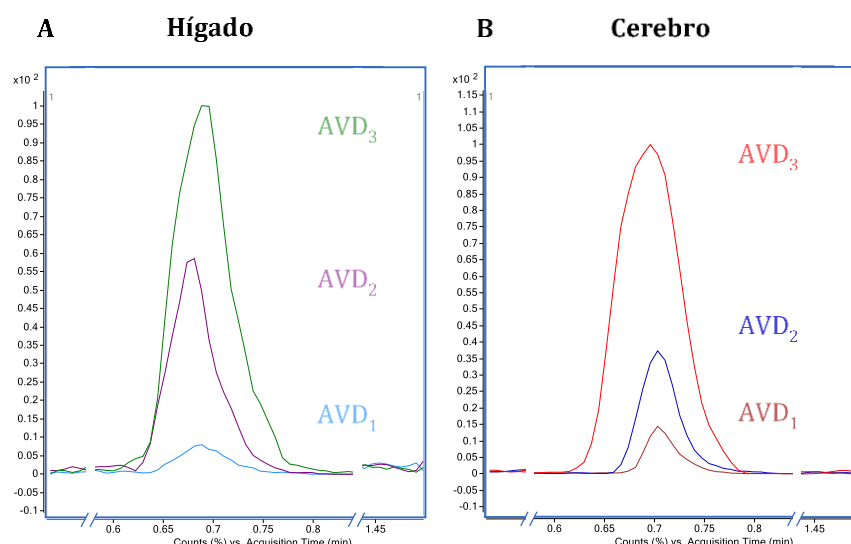


Figura 43. Cuantificación de αT en hígado (A) y cerebro (B) de ratón mediante los tres protocolos de aumento del volumen de los disolventes (AVD). Se utilizaron ratones Pol μ +/- en condiciones basales con una edad comprendida entre 8-12 meses.

Para comprobar si los resultados se debían únicamente al AVR o a la suma de éste con el aumento de los disolventes, se propuso realizar el mismo experimento, en este caso con los volúmenes del protocolo de AVD₁, y se variaron los volúmenes

de reconstitución. El hígado presentó mejor resultado aplicando el AVR₃, mientras que en el cerebro, a pesar de obtener mejor resultado con AVR₃, los valores se hallaban por debajo del LOD, por este motivo se seleccionó AVR₂ (Figura 44 A y B). De lo observado en estos datos, se aplicó directamente el estudio de AVR para la muestra de pulmón. Al igual que con el cerebro, se escogió para el pulmón el protocolo AVR₂ por los mismos motivos (Figura 44 C).

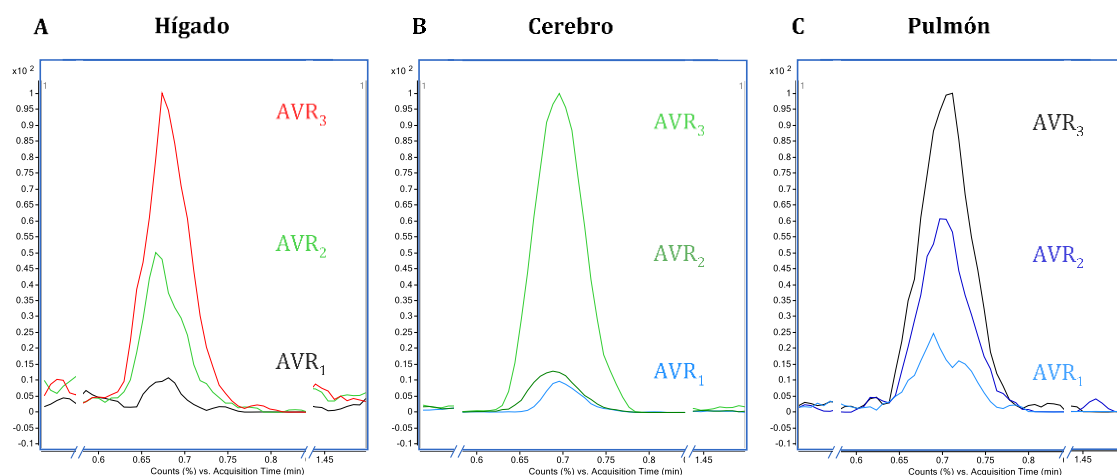


Figura 44. Cromatogramas extraídos de los iones cuantitativos de α T en hígado (A), cerebro (B) y pulmón (C) de ratón aplicando los tres protocolos de aumento del volumen de reconstitución (AVR). Se utilizaron ratones Pol μ +/- en condiciones basales con una edad comprendida entre 8-12 meses.

2.3. Aplicación del método LC-ESI-MS a formulaciones farmacéuticas y muestras biológicas

Tras la optimización y validación del método analítico, éste se aplicó para la determinación de α T en diferentes muestras: nanoemulsiones y muestras biológicas, como plasma y suero, procedentes de los diferentes modelos animales.

2.3.1. Medida de la eficacia de encapsulación de α T en nanoemulsiones

El método cromatográfico desarrollado fue aplicado en cuatro nanoemulsiones previamente elaboradas con los aceites de germen de trigo, coco, palma o soja. Éstas fueron analizadas mediante LC-DAD para conocer la concentración de α T y, en consecuencia, medir su eficacia de encapsulación con cada uno de los aceites (Tabla 14). La concentración de α T con la que se prepararon todas las nanoemulsiones fue de $25 \cdot 10^3$ mg/L. La cantidad de α T cuantificado con el equipo fue el que se encontraba en la fase acuosa, a partir del cual, se pudo calcular el porcentaje de α T libre y encapsulado. El estudio se realizó a partir de cuatro replicados para cada una de las nanoemulsiones. La media del % de α T encapsulado

fue del 96.21, 96.52, 94.04 y 91.23 % para el aceite de germen de trigo, el aceite de coco, de palma y de soja, respectivamente.

<i>Nanoemulsión</i>	Replicados	α T libre 1:100(mg/L)	% α T libre	% α T encapsulado
<i>Aceite de germen de trigo</i>	1	15.26	6.10	93.90
	2	9.55	3.82	96.18
	3	8.42	3.37	96.63
	4	4.65	1.86	98.14
<i>Aceite de coco</i>	1	5.15	2.06	97.94
	2	12.24	4.89	95.11
	3	8.59	3.44	96.56
	4	8.84	3.54	96.46
<i>Aceite de palma</i>	1	16.09	6.43	93.57
	2	7.91	3.16	96.84
	3	20.24	8.10	91.90
	4	15.46	6.18	93.82
<i>Aceite de soja</i>	1	23.01	9.18	90.82
	2	21.55	8.65	91.35
	3	22.90	9.22	90.78
	4	20.84	7.99	92.01

Tabla 14. Estudio de la eficacia de encapsulación. Resultados de la valoración de la eficacia de encapsulación. α T: α -tocoferol.

2.3.2. Determinación de α T en plasma y suero de ratones Pol μ

El estudio se llevó a cabo tal y como se indica en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.2.4. Determinación de α T administrado en plasma y suero*” mediante LC-MS/MS. Los niveles de α T en el control y en el grupo de α T libre, tanto en el plasma como en el suero, eran muy similares y no se encontraron diferencias significativas. Sin embargo, en el grupo administrado con α T-NE, la cantidad de α T hallada, tanto en plasma como en suero, era mayor que la de los otros grupos (p : 0.04 respecto al α T libre para el plasma y p : 0.002 tanto para el control como para el α T libre del suero). En todos los casos, los valores de α T en suero fueron mayores que los del plasma (Figura 45).

La evaluación post-mortem de los tejidos de forma macroscópica no reveló toxicidad asociada a la administración de α T-NE.

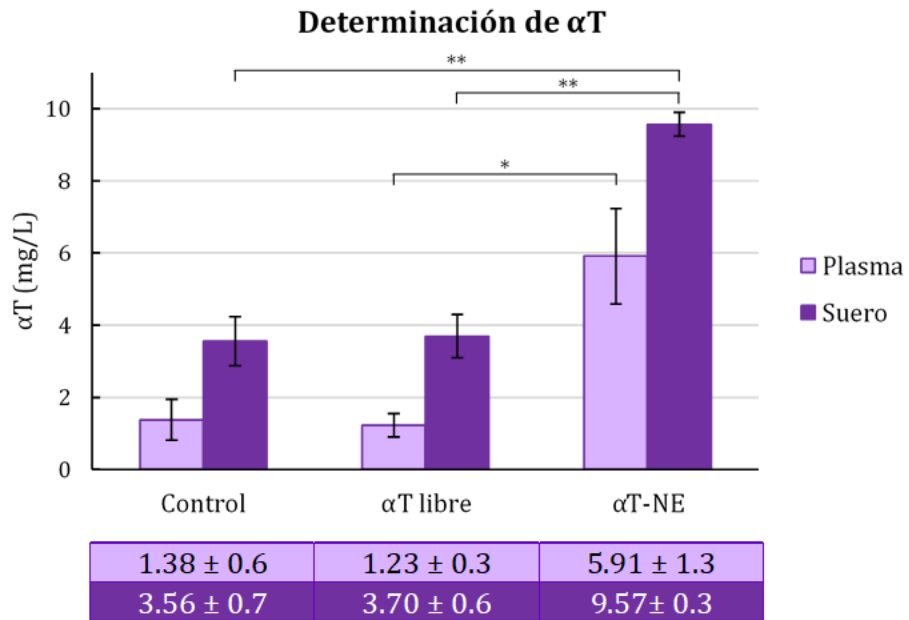


Figura 45. Cuantificación de α T en plasma y suero de ratones Pol μ +/-. Representación de la concentración de α T en plasma y suero de los ratones (11-12 meses) administrados con 80 mg/kg de α T libre y α T nanoemulsionado (α T-NE). Los valores son expresados como media \pm SEM de 3 animales. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3. Administración oral de α T-NE en modelos animales

Realizados todos los procedimientos previos de ayuno, administración oral, obtención y procesamiento de las muestras, descritos en la sección “*MATERIAL Y MÉTODOS: 2.3.2. Administración y obtención de muestras en los modelos murinos C57BL/6J y SAM*”, se procedió a evaluar los resultados obtenidos y establecer la concentración de α T en sangre (plasma y suero) y en tejidos (hígado, cerebro y pulmón) en los diferentes modelos murinos objeto de estudio.

3.1. Cinética y distribución de α T en el modelo murino C57BL/6J

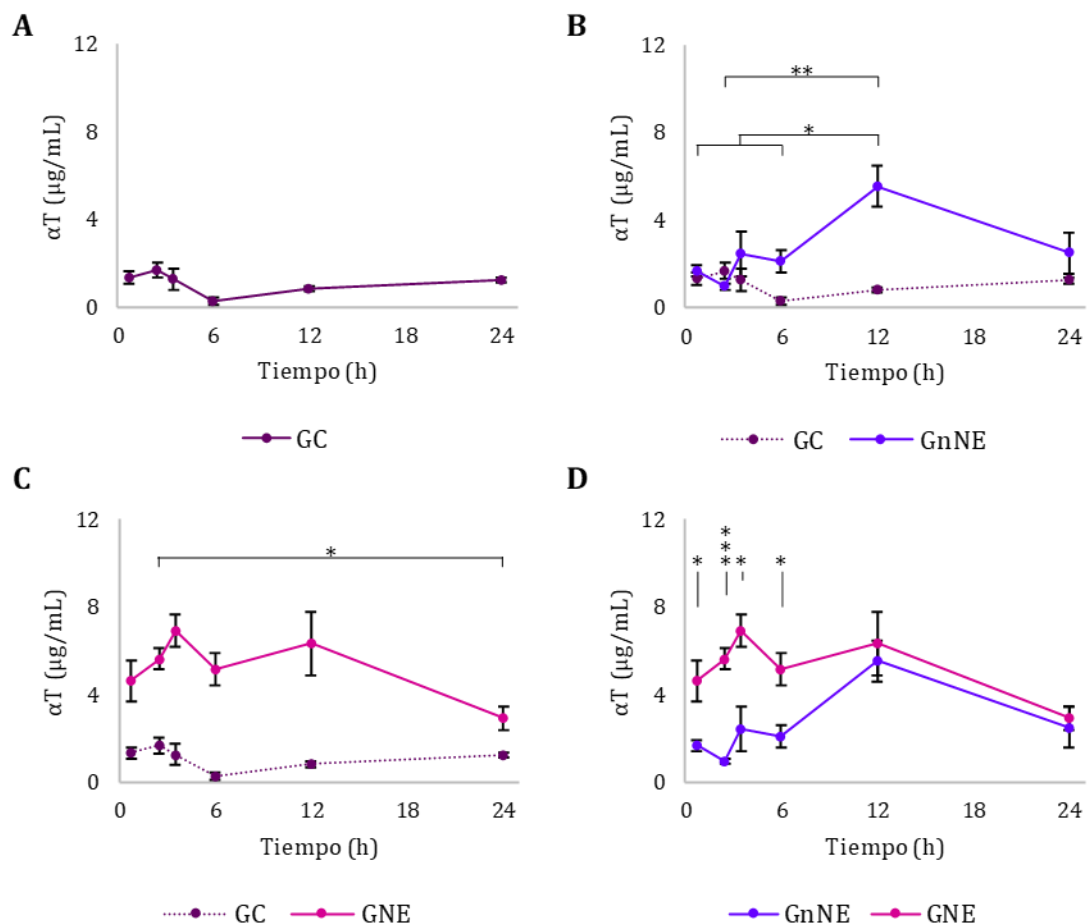
Los ratones C57BL/6J macho (8-10 meses) fueron divididos en los 3 grupos de administración ya descritos (GC, GnNE y GNE) y los datos obtenidos en cada punto de la cinética (n = 4 ratones por grupo) se detallan a continuación.

3.1.1. Niveles de α T en plasma

En los animales a los que se administró agua (GC), la concentración de α T en plasma osciló entre 0.29 ± 0.2 y 1.68 ± 0.4 $\mu\text{g/mL}$ (media: 1.11 ± 0.2 $\mu\text{g/mL}$) en el intervalo de tiempo estudiado, 24 h (Figura 46 A). En el grupo de animales administrados con α T libre (GnNE) se obtuvo un perfil diferente. Durante las primeras horas, la concentración de α T fue aumentado gradualmente de 1.67 ± 0.3 $\mu\text{g/mL}$ hasta su punto máximo, 5.54 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$, que se alcanzó transcurridas 12 h desde la administración, siendo estadísticamente significativo respecto a los puntos anteriores (p : 0.011, 0.002 y 0.027 para 0.75, 2.5 y 6 h, respectivamente) (Figura 46 B). El aumento observado se produjo con pequeñas fluctuaciones que no fueron estadísticamente significativas entre ellas. A partir de este momento, se observó una disminución de la concentración de α T en plasma hasta 2.5 ± 0.9 $\mu\text{g/mL}$ a las 24 h. En el grupo de animales administrados con el α T nanoemulsionado (GNE) se observó un comportamiento distinto. En su perfil se puede observar un ligero aumento de la concentración de α T desde el inicio de la administración hasta las 3.5 h (6.92 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$). A partir de este momento se produjo un descenso hasta las 6 h (5.44 ± 0.7 $\mu\text{g/mL}$) que volvió a aumentar a las 12 h (6.34 ± 1.4 $\mu\text{g/mL}$). Aunque estas pequeñas variaciones no fueron significativas, el valor alcanzado a las 24 h (2.92 ± 0.6 $\mu\text{g/mL}$) fue estadísticamente significativo respecto al punto de las 2.5 h (5.63 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y p : 0.04) (Figura 46 C). Al comparar el GnNE frente al GNE (Figura 46 D), se encontraron dos perfiles diferentes, ya que, en todos los puntos anteriores

a las 12 h, la concentración de α T fue significativamente mayor en el GNE (p : 0.023, 0.000, 0.012 y 0.014 para 0.75, 2.5, 3.5 y 6 h, respectivamente), mientras que, a partir de las 12 h, la concentración de α T fue similar en ambos grupos.

Plasma



Concentración de α T (μ g/mL)						
Tiempo	0.75 h	2.5 h	3.5 h	6 h	12 h	24 h
GC	1.33 \pm 0.3	1.68 \pm 0.4	1.26 \pm 0.5	0.29 \pm 0.2	0.82 \pm 0.1	1.24 \pm 0.1
GnNE	1.67 \pm 0.3	0.96 \pm 0.1	2.43 \pm 1.0	2.11 \pm 0.5	5.54 \pm 0.9	2.50 \pm 0.9
GNE	4.62 \pm 0.9	5.63 \pm 0.5	6.92 \pm 0.7	5.44 \pm 0.7	6.34 \pm 1.4	2.92 \pm 0.6

Figura 46. Perfil concentración-tiempo de α T en plasma. Las gráficas muestran la concentración de α T en el plasma de ratones C57BL/6j ($n = 4$ ratones por punto) a lo largo del tiempo en el GC (A), en el GnNE (B), en el GNE (C) y la comparación de los dos grupos a los que se les administró α T, GnNE y GNE (D). En la tabla se indican los valores de concentración de α T. Los datos son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; GnNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

Los resultados del estudio estadístico de los grupos GnNE y GNE frente a GC muestran algunas diferencias significativas (Tabla 15). En el GnNE sólo se obtuvo una concentración estadísticamente superior al GC a las 6 y 12 h. En cambio, en el GNE se obtuvieron valores estadísticamente superiores al GC en todos los puntos estudiados, a excepción de las 24 h.

Plasma

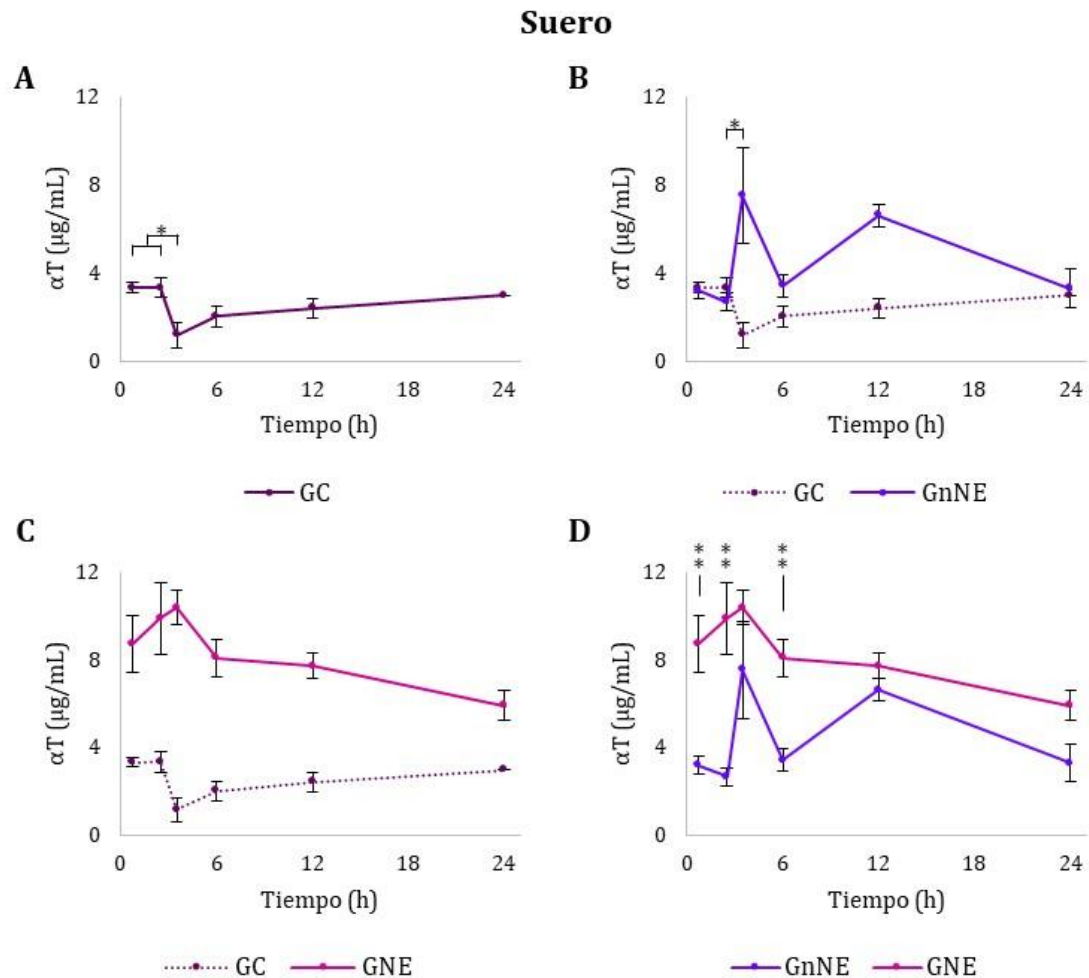
Tiempo (h)	0.75	2.5	3.5	6	12	24
Grupos	<i>p</i> -valor					
GC vs GnNE	-	-	-	0.016	0.014	-
GC vs GNE	0.015	0.001	0.001	0.001	0.009	-

■ P < 0.05 ■ P < 0.01 ■ P < 0.001

Tabla 15. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en plasma. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas.

3.1.2. Niveles de α T en suero

La concentración de α T en el GC osciló entre 1.19 ± 0.6 y 3.35 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (media: 2.56 ± 0.35 $\mu\text{g/mL}$) en el intervalo de tiempo analizado. A diferencia del plasma, se encontró un descenso significativo a las 3.5 h tras la administración respecto a los puntos anteriores (p : 0.026 y 0.025 para 0.75 y 2.5 h, respectivamente). Sin embargo, desde las 3.5 h hasta las 24 h, los niveles de α T se incrementaron lentamente, de manera que, entre el inicio y el final del estudio (entre las 0.75 y 24 h) no se hallaron diferencias significativas (Figura 47 A). El GnNE alcanzó dos puntos con concentraciones mayores al resto, a las 3.5 h y 12 h (7.54 ± 2.2 y 6.63 ± 0.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), siendo el de las 3.5 h estadísticamente mayor respecto al punto inmediatamente anterior, el de las 2.5 h (p : 0.038) (Figura 47 B). En el GNE los niveles de α T oscilaron entre 5.92 ± 0.7 y 10.37 ± 0.8 $\mu\text{g/mL}$ y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los puntos del estudio (Figura 47 C). De nuevo, al comparar GnNE y GNE, y del mismo modo que sucedió en el plasma, el GNE presentó niveles de α T más elevados que los del GnNE en todos los puntos de la cinética. Estos valores fueron significativamente mayores al inicio del estudio (p : 0.006, 0.005 y 0.003 para 0.75, 2.5 y 6 h), a excepción del punto de las 3.5 h. A partir de las 12 h, ambos perfiles tienden a disminuir las concentraciones de α T de forma semejante (Figura 47 D).



Concentración de αT (μg/mL)						
Tiempo	0.75 h	2.5 h	3.5 h	6 h	12 h	24 h
GC	3.34 \pm 0.2	3.35 \pm 0.5	1.19 \pm 0.6	2.04 \pm 0.5	2.43 \pm 0.4	3.00 \pm 0.3
GnNE	3.21 \pm 0.4	2.69 \pm 0.4	7.54 \pm 2.2	3.44 \pm 0.5	6.63 \pm 0.5	3.30 \pm 0.9
GNE	8.72 \pm 1.3	9.89 \pm 1.7	10.37 \pm 0.8	8.07 \pm 0.8	7.73 \pm 1.6	5.92 \pm 0.7

Figura 47. Perfil concentración-tiempo de α T en suero. Las gráficas muestran la concentración de α T en el suero de ratones C57BL/6J (n = 4 ratones por punto) a diferentes tiempos en el GC (A), en el GnNE (B), en el GNE (C) y la comparación de los dos grupos (GnNE y GNE) a los que se les administró α T (D). Los datos son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; GnNE: grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos en GnNE y GNE frente al GC. Aunque se observó que a partir de las 2.5 h los niveles de α T fueron mayores que los del GC en el GnNE, únicamente a las 12 h los valores fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, a las 3.5 h, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, el valor se encontraba muy cerca del límite (p: 0.059). Al igual que ocurrió con el plasma, en el GNE la concentración de α T fue mayor que la encontrada en el GC para todos los puntos analizados y estadísticamente significativos.

<i>Suero</i>						
<i>Tiempo (h)</i>	0.75	2.5	3.5	6	12	24
<i>Grupos</i>	<i>p-valor</i>					
<i>GC vs GnNE</i>	-	-	0.059	-	0.002	-
<i>GC vs GNE</i>	0.006	0.009	0.000	0.001	0.002	0.043

■ P < 0.05 ■ P < 0.01 ■ P < 0.001

Tabla 16. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en suero. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas.

3.1.3. Cálculo del área bajo la curva en muestras de plasma y suero

Para comparar los perfiles de α T en plasma y suero se calculó el ABC_{0.75-24} para los tres grupos estudiados (Tabla 17). En el plasma, mientras que el GnNE presentó un ABC_{0.75-24} 3.77 veces mayor respecto al GC, en el caso del GNE el ABC_{0.75-24} fue en torno a 5,52 y 1,5 veces mayor que el área hallada para el GC y el GnNE, respectivamente.

<i>ABC (μg/mL h)</i>			
	<i>GC</i>	<i>GnNE</i>	<i>GNE</i>
<i>Plasma</i>	21.79	80.83	120.3
<i>Suero</i>	58.11	113.8	178.8

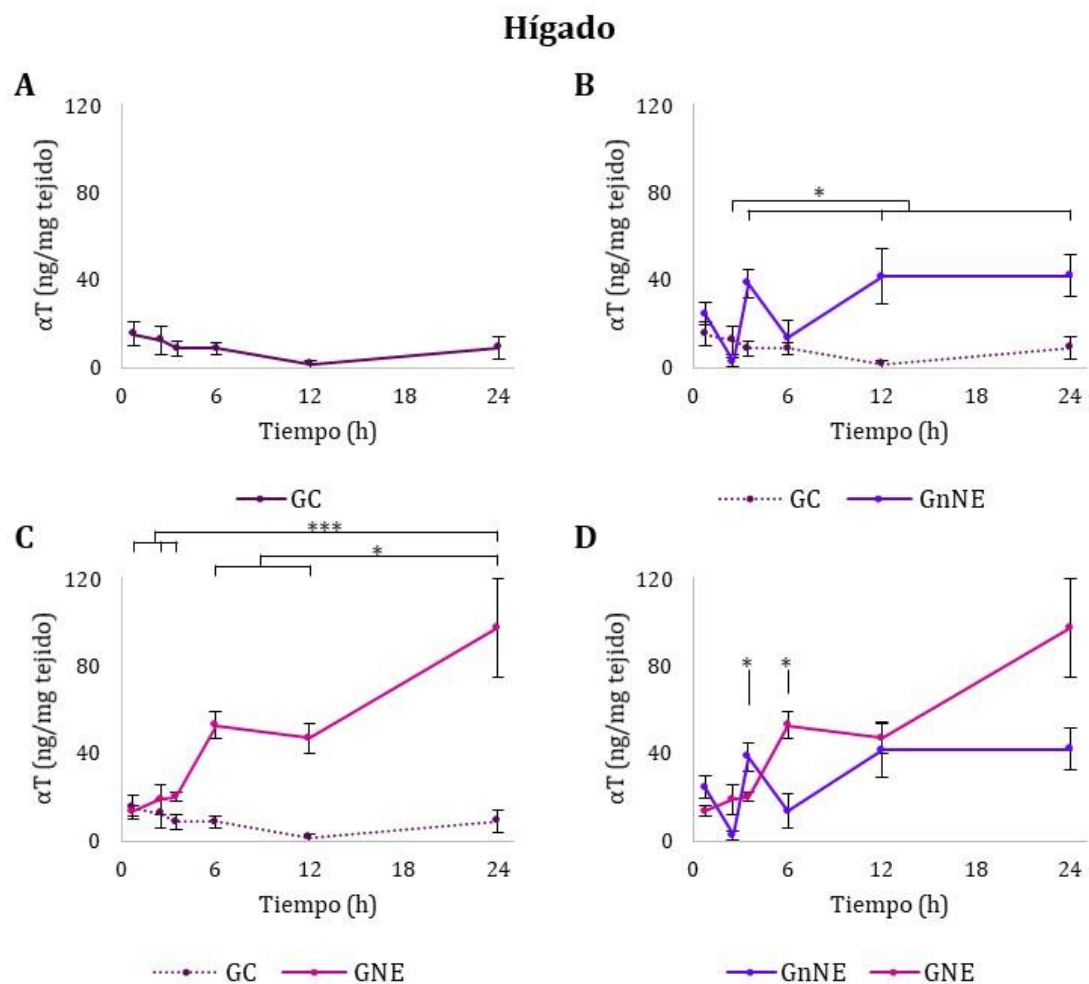
Tabla 17. Área bajo la curva en el intervalo del tiempo de 0.75-24 h (ABC_{0.75-24}) de plasma y suero para todos los grupos. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; GnNE: grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado.

El ABC_{0.75-24} fue determinado también para las muestras de suero en cada grupo (Tabla 17). Tanto el ABC_{0.75-24} del GnNE, como el del GNE, fueron mayores que el del GC (2 y 3.1 veces mayores respectivamente). Al comparar el GNE frente al GnNE, se encontró que la nanoemulsión presentaba un ABC_{0.75-24} 1.6 veces mayor.

3.1.4. Niveles de α T en extractos de hígado

Para el GC, los valores de α T fluctuaron entre los 1.77 ± 1.7 y 15.36 ± 5.5 ng/mg de tejido (media: 9.44 ± 1.86 ng/mg), sin mostrar diferencias significativas a lo largo del tiempo entre los puntos analizados (Figura 48 A). En el GnNE, la concentración de α T entre el inicio y las 12 h tras la administración mostró una evolución irregular, sin mostrar una tendencia clara. Las concentraciones de α T a las 3.5, 12 y 24 h fueron estadísticamente mayores respecto a la obtenida a las 2.5 h (p : 0.024, 0.022 y 0.021). En cambio, entre las 12 y 24 h los datos fueron similares. El GNE reveló un perfil totalmente diferente a los otros dos grupos (Figura 48 B y C),

en el cual la concentración de αT mostró un aumento gradual a lo largo del tiempo hasta las 24 h desde la administración. Debido a este aumento progresivo, el punto de las 24 h fue estadísticamente mayor que todos los puntos anteriores (p : 0.000, 0.000, 0.000, 0.04 y 0.012 para 0.75, 2.5, 3.5, 6 y 12 h, respectivamente). En la comparación de los perfiles del GnNE y del GNE se observaron dos puntos estadísticamente significativos: a las 3.5 h, donde los niveles de αT son mayores en GnNE (p : 0.04), y a las 6 h, aunque en este caso fueron mayores en el GNE (p : 0.014) (Figura 48 D).



Concentración de αT (ng/mg de tejido)						
Tiempo	0.75 h	2.5 h	3.5 h	6 h	12 h	24 h
GC	15.36 \pm 5.5	12.53 \pm 6.5	8.91 \pm 3.5	8.85 \pm 2.8	1.77 \pm 1.8	9.24 \pm 5.0
GnNE	24.72 \pm 4.9	2.67 \pm 1.9	38.55 \pm 6.7	13.76 \pm 7.8	41.95 \pm 12.4	42.24 \pm 9.5
GNE	13.82 \pm 2.3	19.13 \pm 6.7	20.28 \pm 1.9	53.19 \pm 6.2	47.31 \pm 6.9	98.08 \pm 22.6

Figura 48. Perfil concentración-tiempo de αT en hígado. Las gráficas muestran la variación de la concentración de αT con el tiempo en el hígado de ratones C57BL/6J ($n = 4$ ratones por punto) en el GC (A), en el GnNE (B), en el GNE (C) y la comparación de GnNE y GNE (D). Los datos son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; GnNE: grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

Los niveles de αT en el GnNE permanecieron por encima de los valores encontrados en el GC, con la excepción del punto de las 2.5 h. Transcurridas 3.5 h desde la administración, se encontró el único punto que mostró un valor estadísticamente mayor, a pesar de que los datos de las 12 y 24 h se encontraban próximas al límite. En el GNE, al inicio del estudio, la concentración de αT fue similar a la del GC (0.75 h), sin embargo, a partir de este punto, el resto de valores fueron mayores y estadísticamente superiores al GC a partir del punto de las 3.5 h. El análisis estadístico del GC frente a los grupos GnNE y GNE se puede observar en la Tabla 18.

<i>Hígado</i>						
<i>Tiempo (h)</i>	0.75	2.5	3.5	6	12	24
<i>Grupos</i>	<i>p-valor</i>					
<i>GC vs GnNE</i>	-	-	0.015	-	0.08	0.06
<i>GC vs GNE</i>	-	-	0.029	0.001	0.001	0.017

■ P < 0.05 ■ P < 0.01 ■ P < 0.001

Tabla 18. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en hígado. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas.

3.1.5. *Niveles de αT en extractos de cerebro*

Para el análisis se utilizó uno de los hemisferios del cerebro. La concentración de αT obtenida en extractos de cerebro no mostró diferencias significativas en los valores obtenidos a diferentes tiempos en ninguno de los grupos, obteniéndose además valores medios muy similares en los tres grupos de estudio (GC: 5.12 ± 0.2 ng/mg de tejido; GnNE: 5.58 ± 0.5 ng/mg de tejido; GNE: 5.36 ± 0.3 ng/mg de tejido). Sin embargo, sí se observó que el GnNE obtuvo un valor estadísticamente superior al GNE en el punto de las 24 h después de la administración ($p: 0.019$).

<i>Cerebro</i>						
<i>Tiempo (h)</i>	0.75	2.5	3.5	6	12	24
<i>Grupos</i>	<i>Concentración de αT (ng/mg de tejido)</i>					
<i>GC</i>	5.91 ± 0.5	5.16 ± 0.5	4.41 ± 0.6	4.99 ± 0.6	5.49 ± 0.3	4.74 ± 1.0
<i>GnNE</i>	7.14 ± 1.6	5.26 ± 0.5	6.58 ± 0.6	4.02 ± 0.4	5.26 ± 0.4	5.24 ± 0.2
<i>GNE</i>	5.21 ± 0.4	5.57 ± 0.9	5.18 ± 0.8	5.94 ± 0.8	5.83 ± 0.8	$4.40 \pm 0.2^{*GnNE}$

Tabla 19. Niveles de αT en función del tiempo en cerebro. Los datos son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; GnNE: grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado.

Se analizaron estadísticamente las concentraciones de α T del GnNE y el GNE respecto al GC. En el caso de GnNE, se obtuvo una concentración de α T estadísticamente superior a las 3.5 h (Tabla 20). Sin embargo, en el GNE no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

<i>Cerebro</i>						
<i>Tiempo (h)</i>	0.75	2.5	3.5	6	12	24
<i>Grupos</i>	<i>p-valor</i>					
<i>GC vs GnNE</i>	-	-	0.033	-	-	-
<i>GC vs GNE</i>	-	-	-	-	-	-

■ P < 0.05 ■ P < 0.01 ■ P < 0.001

Tabla 20. Análisis estadístico del grupo control (GC) frente al grupo de α -tocoferol no nanoemulsionado (GnNE) y el grupo de α -tocoferol nanoemulsionado (GNE) en cerebro. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas.

3.1.6. Niveles de α T en extractos de pulmón

El perfil de concentración de α T con respecto al tiempo fue analizado también en el pulmón. Sin embargo, a pesar de seleccionar el mejor protocolo posible para el tratamiento de este órgano, no fue posible cuantificar los niveles de α T. Esto se debió a que, aunque se pudo observar la señal que denota su presencia (LOD = 0.12 μ g/mL), la cantidad de α T se hallaba por debajo del LOQ (0.4 μ g/mL).

3.2. Administración puntual y cuantificación de α T en modelos murinos de envejecimiento: SAMP8 y SAMR1

En la administración de la formulación en SAMP8 y SAMR1 únicamente se seleccionó el punto de 3.5 h tras la administración debido a que la cantidad de α T en sangre que se encontró en el C57BL/6J en este punto fue la mayor. Además, de este modo se redujo significativamente el número de animales. En vista de los resultados en el C57BL/6J, sólo se realizaron los experimentos con el GC y el GNE. En este caso, se analizaron muestras de plasma, hígado y cerebro y se compararon con los datos obtenidos del C57BL/6J. No se consideró necesario administrar α T libre, ya que con α T-NE se elevaron los niveles de α T más que cuando se administró libre; ni determinar los niveles de α T en suero, ya que habitualmente se usa el plasma; ni en extractos de pulmón, pues no se encontraron niveles detectables en el modelo C57BL/6J.

3.2.1. Niveles de αT en plasma

En ambos modelos, el GNE presentó una concentración de αT estadísticamente superior respecto al GC. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de αT al comparar SAMP8 y SAMR1, en ninguno de los dos grupos, GC y GNE. Estas diferencias sí se observaron al comparar estos datos con los obtenidos en el modelo C57BL/6J. Así pues, los valores de αT en el modelo SAM son mayores que los que encontramos en C57BL/6J en los GC. De igual forma sucedió con el GNE al comparar el SAMP8 y el SAMR1 con el modelo C57BL/6J. Los resultados del análisis de las muestras de plasma procedentes de SAMP8 y SAMR1 se muestran en la Figura 49 y los resultados del análisis estadístico se detallan en la Tabla 21.

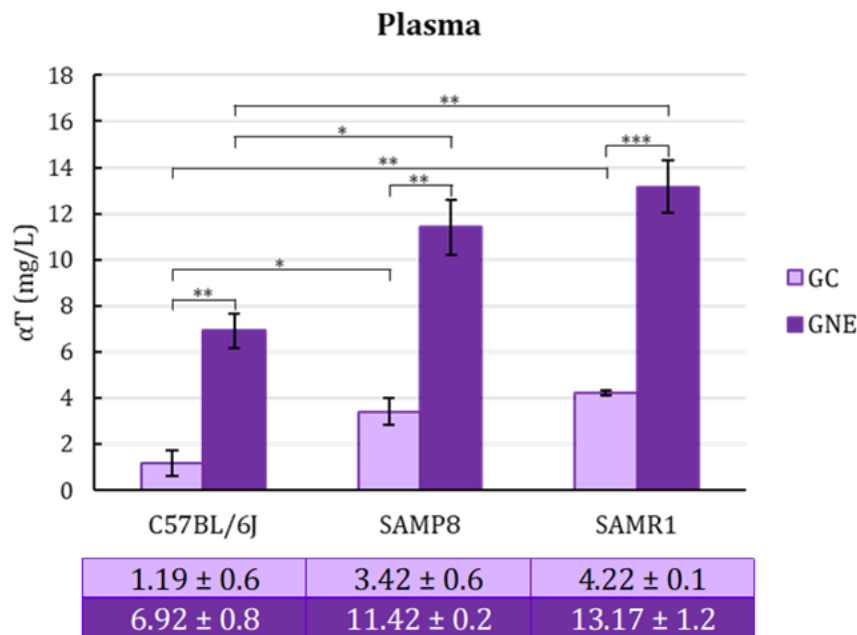


Figura 49. Comparación entre los niveles de αT en plasma de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1. Los datos representan los niveles de αT sin administración (GC) frente a los niveles obtenidos tras la administración de las nanoemulsiones con αT (GNE) y son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

<i>Plasma</i>					
<i>Cepas</i>	SAMP8	SAMR1	C57BL/6J vs SAMP8	C57BL/6J vs SAMR1	SAMP8 vs SAMR1
<i>Grupos</i>	<i>p-valor</i>				
GC	0.001	0.000	0.032	0.002	-
GNE			0.015	0.001	-

■ $P < 0.05$
 ■ $P < 0.01$
 ■ $P < 0.001$

Tabla 21. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en plasma. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado.

3.2.2. Niveles de αT en extractos de hígado

Resultados similares encontramos en los niveles de αT en el hígado (Figura 50 y Tabla 22). Se observó una mayor concentración de αT en el GNE respecto a los controles en todos los modelos. No se encontraron diferencias significativas entre los GC y GNE del SAMP8 y el SAMR1. Sin embargo, ambos mostraron mayor nivel de αT , tanto en los controles como en el GNE respecto al C57BL/6J.

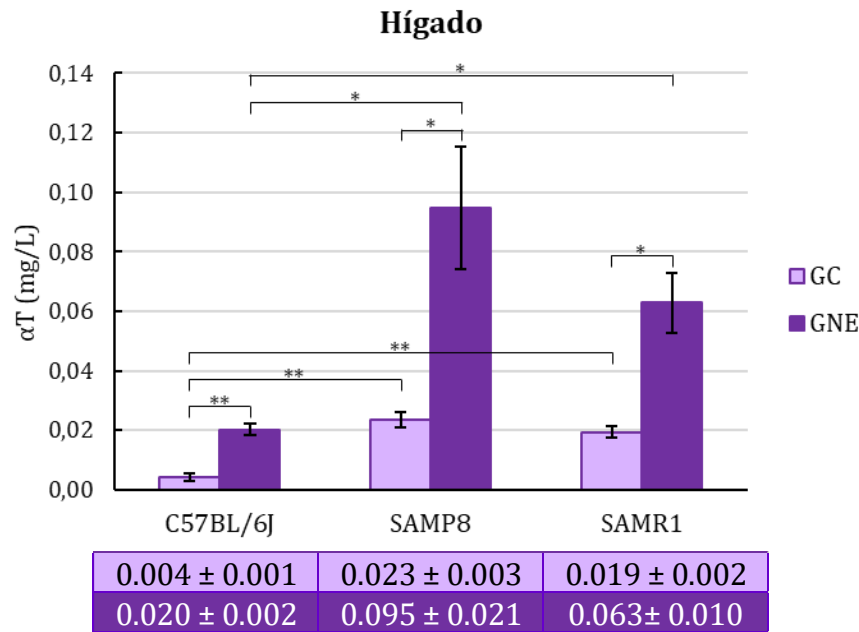


Figura 50. Comparación entre los niveles de αT en hígado de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1. Los datos representan los niveles de αT sin administración (GC) frente a los niveles obtenidos tras la administración de las nanoemulsiones con αT (GNE) y son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

Hígado					
Cepas	SAMP8	SAMR1	C57BL/6J vs SAMP8	C57BL/6J vs SAMR1	SAMP8 vs SAMR1
Grupos			p-valor		
GC	0.034	0.020	0.001	0.001	-
GNE			0.036	0.021	0.05

■ $P < 0.05$ ■ $P < 0.01$ ■ $P < 0.001$

Tabla 22. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en hígado. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado.

3.2.3. Niveles de αT en extractos de cerebro

En cerebro, tanto el SAMP8 y como el SAMR1 no mostraron diferencias entre el GC y el GNE (Figura 51), al igual que sucedió con el C57BL/6J, aunque la significación de estos grupos en el SAMP8 se acercó al límite (Tabla 23). Además, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos modelos de

ratón SAM. A pesar de esto, sí se vieron diferencias de los modelos SAM en ambos grupos respecto al C57BL/6J.

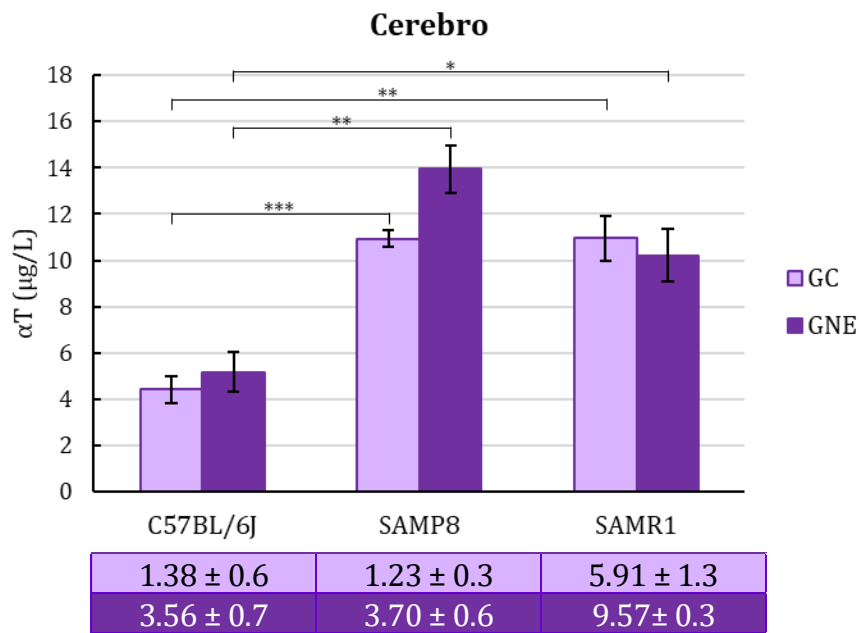


Figura 51. Comparación entre los niveles de αT en cerebro de animales C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1. Los datos representan los niveles de αT sin administración (GC) frente a los niveles obtenidos tras la administración de las nanoemulsiones con αT (GNE) y son expresados como media \pm SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado; SEM: error estándar de la media.

Cerebro

Cepas	SAMP8	SAMR1	C57BL/6J vs SAMP8	C57BL/6J vs SAMR1	SAMP8 vs SAMR1
Grupos	<i>p</i> -valor				
GC	0.06	-	0.000	0.001	-
GNE			0.001	0.012	-

■ $P < 0.05$
 ■ $P < 0.01$
 ■ $P < 0.001$

Tabla 23. Análisis estadístico entre las diferentes cepas de ratones y los grupos de administración en cerebro. La ausencia de un valor en algunos puntos se debe a que no se encontraron diferencias significativas. GC: grupo control; GNE: grupo de α -tocoferol nanoemulsionado.

DISCUSIÓN

El uso de moléculas antioxidantes para el tratamiento de procesos relacionados con el envejecimiento y las enfermedades asociadas a éste, es cada vez más frecuente. En este sentido, el uso de las vitaminas E y C, dos moléculas con un gran poder antioxidante, está muy extendido. A pesar de ello, algunos aspectos, como la presencia de sus transportadores en tejidos altamente susceptibles al envejecimiento, como el cerebro, o el uso de formulaciones novedosas, como las nanoemulsiones, para promover una mayor biodisponibilidad de sus principios activos, siguen siendo objeto de estudio.

En cuanto a la distribución cerebral de α TTP y SVCT2, SVCT2 ha sido objeto de más estudios que el α TTP (Hosomi *et al.*, 1998; Garcia Mde *et al.*, 2005; Mun *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2009; Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015), probablemente debido a su importante papel en el hígado como regulador de las concentraciones plasmáticas (Traber, 2005). Sin embargo, los estudios realizados en ratones KO para ambos transportadores muestran trastornos neurológicos y ponen de relieve el papel fundamental que ambos transportadores desempeñan a nivel cerebral (Yokota *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 2002; Sotiriou *et al.*, 2002; Traber, 2004; Corpe *et al.*, 2010). Los resultados encontrados en la presente Tesis Doctoral, ponen de manifiesto la amplia distribución de α TTP y SVCT2 en el tejido cerebral de ratones Pol μ , avalando así su importancia a nivel funcional.

Cuantificar, de forma precisa y eficiente, la distribución de las moléculas antioxidantes en los diferentes tejidos es fundamental para entender el efecto de éstas. El uso de técnicas analíticas instrumentales es una de las herramientas más empleadas y fiables para desempeñar esta labor. Aunque en la actualidad existen diversos métodos analíticos que permiten la determinación de α T, el método optimizado y validado en la presente Tesis Doctoral mediante LC-ESI-MS/MS permitió realizar la determinación de α T de forma rápida, precisa, exacta, selectiva, reproducible y en el intervalo de trabajo requerido para las muestras analizadas.

Por último, el uso de nanoemulsiones para la administración oral de α T en roedores es escaso (Hatanaka *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2012; Parthasarathi *et al.*, 2016), a pesar de que se ha demostrado que este tipo de formulaciones consigue elevar la biodisponibilidad de los compuestos en condiciones determinadas (Yang & McClements, 2013; Sun *et al.*, 2014; Pathak & Raghuvanshi, 2015; Pangen *et al.*,

2018). En el presente trabajo, no sólo se evidenció una mayor biodisponibilidad en ratones C57BL/6J administrados con α T-NE, sino que, además, en otros modelos de ratones de senescencia, SAMP8 y SAMR1, también se observó un incremento de la concentración en sangre tras la administración de α T-NE con respecto al control.

1. Estudio de la distribución de los transportadores α TTP y SVCT2 en cerebro murino

El α T y la VitC juegan un papel importante como neuroprotectores frente al envejecimiento del SNC (Shichiri *et al.*, 2011; Pallauf *et al.*, 2013; Ulatowski & Manor, 2013; Tan *et al.*, 2018). Ambas moléculas necesitan de transportadores específicos (α TTP y SVCT2) para su correcto funcionamiento, y, por tanto, conocer detalladamente la ubicación dentro del SNC de estos transportadores tiene especial relevancia a la hora de esclarecer dónde podrían llegar a ejercer su acción dichas moléculas. Por ello, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido realizar un análisis exhaustivo de la distribución neuroanatómica de ambos transportadores en un modelo de envejecimiento retardado de ratón (Pol μ) a diferentes edades.

Las variaciones alélicas que tienen lugar entre diferentes cepas de ratones, así como los diferentes genotipos dentro de la mismas cepa, pueden provocar alteraciones en las rutas metabólicas que participan en el metabolismo y el almacenamiento de las vitaminas (Baxter *et al.*, 2012; Harrison *et al.*, 2014; Mocchegiani *et al.*, 2014).

El modelo de ratón Pol μ $-/-$, descrito en “INTRODUCCIÓN: 1.3.3. Modelo murino Pol μ ”, se escogió en este trabajo como modelo animal de envejecimiento retardado. A pesar de que el estudio se llevó a cabo en ratones que presentaban los tres genotipos posibles para Pol μ a lo largo de la edad, no se encontraron diferencias en el patrón de distribución de ninguno de los transportadores. Lo cual nos lleva a suponer que estos ratones mantienen los transportadores a lo largo de la edad. Por otro lado, en el estudio que llevaron a cabo Lykkesfeldt, J. & Moos, T. en cobayas jóvenes y de edad avanzada vieron una disminución de los niveles de VitC que tiene lugar en etapas muy tempranas de la vida. El descenso en los niveles se produjo en los menores de 6 meses, mientras que en los de mayor edad no se observó ningún cambio. Ante estos resultados, consideraron que este cambio se debía más a la etapa

de maduración que a una disminución producida como consecuencia de la edad. Estos datos podrían sugerir que los procesos de oxidación degenerativa podrían tener lugar antes de lo que se cree. Por ello, sería necesario realizar estudios similares a edades más tempranas. Además, varios estudios llevaron a cabo experimentos con el objetivo de evaluar la influencia de la expresión de genes en ambas vitaminas (Lim *et al.*, 2004; Oyarce *et al.*, 2018). Como ya se comentó, durante el envejecimiento se produce mayor estrés oxidativo, lo que puede provocar un aumento en la expresión de los genes que intervienen como respuesta a dicho estrés (Ulatowski *et al.*, 2012). Así, en el estudio de Takahashi, K. *y cols.* se observó que los niveles de α TTP hepática varían con la edad, a pesar de que la expresión del ARNm no se vio alterada durante el envejecimiento en ratones C57BL/6NCr (Takahashi *et al.*, 2017).

La neuroinflamación y la subsiguiente astrogliosis relacionadas con la edad (Cohen & Torres, 2019) no se observaron en los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral. La preservación de los astrocitos supone un beneficio a la hora de mantener las funciones cerebrales en las mejores condiciones posibles.

1.1. α TTP

La distribución de α TTP en las distintas áreas cerebrales ha sido examinada previamente en algunos estudios mediante técnicas diferentes a la IHQ. Hosomi, A. *y cols.* analizaron la distribución de α TTP en el cerebro de rata mediante las técnicas de *Northen blot*, PCR con transcriptasa inversa e hibridación *in situ* (Hosomi *et al.*, 1998). Sus resultados indicaron la práctica ausencia de señal para α TTP en todas las áreas cerebrales, sin embargo, mostraron que el ARNm de α TTP se hallaba, aunque con una intensidad de señal muy baja, en la corteza cerebelosa, en concreto, alineado con la capa de células de Purkinje, aunque no en ellas. Esto llevó a sugerir que, probablemente, el ARNm de α TTP se expresaba en las células gliales de Bergmann. Estos resultados van en línea con los obtenidos en nuestro trabajo en el que se empleó la IHQ doble para α TTP/GFAP (Figura 33). En el cerebelo, es precisamente donde se pudo apreciar el marcaje doble en el área circundante a las células de Purkinje y que podría, por tanto, corresponderse con las células gliales de Bergmann. En 2014, Ulatowski, L. *y cols.* observaron que la deficiencia de VitE en ratones suponía una atrofia de las neuronas de Purkinje que desaparece al ser

administrada (Ulatowski *et al.*, 2014). Este estudio sugirió que la VitE es importante para que la integridad morfológica y funcional de las células de Purkinje se mantengan. Además, la presencia de α TTP en la glía de Bergmann pone de manifiesto la relevancia del α T y del α TTP en la protección de las células de Purkinje frente al daño oxidativo (Ulatowski & Manor, 2013).

En humanos, el único estudio de localización del α TTP realizado en tejido cerebral fue realizado por Copp, R. P. *y cols.* en 1999 (Copp *et al.*, 1999). Mediante técnicas IHQ analizaron la expresión de α TTP en cerebros humanos, comparando controles con pacientes de enfermedad de Alzheimer, Síndrome de Down, AVED, enfermedad hepática colestásica y abetalipoproteinemia. Sus resultados indicaron que α TTP no estaba presente en cerebros considerados control. En cambio, en el caso de los pacientes con las patologías mencionadas, no sólo se encontró el transportador en el cuerpo celular y las dendritas de las células de Purkinje, sino que también estaba presente en las células piramidales del hipocampo (concretamente en el área CA2). La falta de expresión de α TTP en cerebros control podría deberse, según se argumentó en este trabajo, a una falta de sensibilidad del método empleado, así como a la baja expresión del transportador. A diferencia de lo observado por Copp, R. P. *y cols.*, nuestros resultados indican que α TTP está presente en la mayoría de las regiones cerebrales del modelo murino Pol μ . Además de la diferencia entre especies a la hora de comparar los resultados, la discordancia en cuanto a resultados podría tener también una base metodológica.

A pesar de la ausencia de trabajos enfocados al estudio de α TTP en cerebro, sí son varios los que se han centrado en el modelo de ratón KO para α TTP. Estos ratones presentan síntomas neurológicos similares a los que aparecen con la AVED, como ataxia, síntomas neurológicos y bajos niveles de α T en cerebro que mejora con la suplementación de α T (Yokota *et al.*, 2001). En este sentido, α TTP no sólo ayuda a mantener los niveles plasmáticos de α T, sino que también ayuda a mantener el α T tisular, como en el caso del cerebro (Leonard *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2010). La ausencia de α TTP en corteza cerebral puede afectar a la regulación de la expresión de algunos genes que están relacionados con la neurogénesis (regulados negativamente) y la neurodegeneración (regulada positivamente), así como una

alteración de la memoria, el aprendizaje, la ansiedad y el equilibrio, entre otros (Lim & Traber, 2007).

Otra perspectiva analizada a la hora de estudiar el papel de la VitE en el cerebro ha sido la de analizar los niveles de α T, principal ligando del α TTP. Vatassery, G. T. y cols. examinaron los niveles de α T en distintas regiones cerebrales de ratas mediante LC con un detector de fluorescencia (Vatassery *et al.*, 1984). La mayor concentración de α T se encontró en la sustancia gris de la corteza frontal, el tálamo y el puente troncoencefálico. La concentración fue menor en otras regiones como el bulbo raquídeo, la médula espinal y el cerebelo. Sin embargo, de todos ellos, el cerebelo fue el que mostró mayor actividad metabolizadora del α T. Estudios más recientes, realizados en el modelo de ratón SAMP8, evaluaron el efecto de la edad sobre los niveles de α T en el hipocampo y la amígdala medidos por HPLC-DAD (Petursdottir *et al.*, 2007), observando una mayor cantidad en ratones de edad avanzada con respecto a los más jóvenes. Resultados similares fueron obtenidos más tarde en el modelo C57BL/6NCr por Takahashi, K. y cols. mediante HPLC con un detector de fluorescencia (Takahashi *et al.*, 2017). Sus resultados indicaron que las mayores concentraciones de α T fueron encontradas en el cerebro completo, en el hipocampo y, en menor medida, en cerebelo, pero en todas las muestras aumentaron los niveles a medida que aumentaba la edad. Nánási, N. y cols. también midieron los niveles de α T en cerebro de ratones C57BL/6 a diferentes edades mediante HPLC con un detector de fluorescencia y HPLC con un detector electroquímico (Nanasi *et al.*, 2018). En este caso, los niveles más elevados los encontraron en el cuerpo estriado y en el hipocampo, seguido de la corteza cerebral. Los niveles más bajos se hallaron en el cerebelo y el tronco encefálico. Además, también observaron que a mayor edad se detectaban mayores niveles de α T. El análisis de α T también se ha llevado a cabo en tejido humano. Johnson, E. J. y cols, en 2013, cuantificaron los niveles de α T en corteza cerebral, occipital y temporal, así como cerebelo, en el cual los niveles fueron menores en comparación con las anteriores (Johnson *et al.*, 2013).

Así pues, aunque existen ciertas discrepancias en los resultados entre los trabajos anteriormente citados, probablemente debidos a la metodología empleada, al modelo analizado o a la alimentación de dichos animales, los estudios realizados de la distribución de α T en cerebro indican una distribución bastante amplia en

prácticamente todas las regiones cerebrales. Esta distribución podría estar respaldada también por una amplia presencia del α TTP, esencial para la homeostasis del α T. Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran esta amplia distribución, además de proporcionar una descripción más detallada, en la que se incluyen no solo las zonas sino incluso las capas de algunas regiones, lo que proporciona una visión más completa de la localización de α TTP en cerebro murino.

Algunos estudios han apuntado a que la deficiencia del α T conlleva, en ratones deficientes de α TTP, a un deterioro en la prueba de condicionamiento del miedo (Ulatowski *et al.*, 2014). Esto puso de relieve el papel de la amígdala, la cual se cree que está implicada en el aprendizaje asociado a las emociones. También se ha observado mayores niveles de ansiedad en ratones por la deficiencia de VitE (Gohil *et al.*, 2003). Estos estudios, junto con otros realizados, indicaron que la VitE desempeña un papel importante en el aprendizaje, la memoria y las respuestas emotivas (Gohil *et al.*, 2004; Shichiri *et al.*, 2011; Ulatowski & Manor, 2015) y, por tanto, el hipocampo y el sistema límbico se veían afectados por los cambios en los niveles de VitE. Además, también se observó marcaje en la corteza entorrinal, una región implicada en los procesos de memoria y aprendizaje (Maass *et al.*, 2015).

Como ya se detalló anteriormente, en el presente trabajo se encontró marcaje para α TTP en regiones cerebrales relacionadas con la memoria y sus conexiones, ya que no sólo se halló en cuerpos neuronales, sino también en los tractos de las fibras (Marcos *et al.*, 2018). Como fue el caso de la presencia de α TTP en las fibras musgosas que conectan el giro dentado con el área CA3, un componente importante del circuito del hipocampo, esencial en el buen funcionamiento de la memoria (Suzuki & Eichenbaum, 2000).

1.2. SVCT2

La presencia de SVCT2 en cerebro ha sido analizada en varios estudios. Mun, G.H. y cols. describieron en 2006 el patrón de distribución de SVCT2 en el cerebro de rata mediante IHQ (Mun *et al.*, 2006). Además, varios estudios han detectado la presencia de SVCT2 en neuronas embrionarias de ratones (Castro *et al.*, 2001; Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015), células gliales hipotalámicas de ratones (García Mde *et al.*, 2005) y en neuronas mesencefálicas embrionarias (Yan *et al.*, 2009).

En el estudio que llevaron a cabo García, Mde. *y cols.* para evaluar la expresión de SVCT2 mediante hibridación *in situ*, encontraron marcaje en la corteza cerebral, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo, mientras que en astrocitos el marcaje fue negativo (García Mde *et al.*, 2005). También encontraron una fuerte expresión de SVCT2 en células endoteliales del tercer ventrículo, en especial en los tanicitos (células especializadas que se encuentran en las paredes ventriculares hipotalámicas) y en las células gliales de la zona hipotalámica, aunque el marcaje en células gliales fue principalmente negativo. A pesar de la presencia de SVCT2 en los tanicitos, no está claro que participen en el transporte de la vitamina desde el LCR hasta el intersticio del cerebro. Sin embargo, la presencia de SVCT2 en esas células implica un papel importante en la captación de VitC por las células del plexo coroideo (Harrison & May, 2009). El estudio de García, Mde. *y cols.* difiere en algunos aspectos con los datos hallados en el estudio desarrollado en la presente Tesis Doctoral, sin embargo, la presencia de SVCT2 coincide ampliamente con lo que se ha detallado.

Como ya se ha comentado, Mun, G. H. *y cols.* realizaron la cartografía de distribución de SVCT2 en el cerebro de ratas, y sus resultados difieren en algunos aspectos de lo encontrado en ratones (Mun *et al.*, 2006). A este respecto, en el cerebro de la rata, se encontró SVCT2 únicamente en los cuerpos celulares, mientras que en los experimentos realizados en nuestro estudio se observó tanto en fibras como en cuerpos celulares (Marcos *et al.*, 2018). Por otro lado, en el estudio realizado en ratas no se detectó inmunomarcaje para las regiones del estriado, el núcleo accumbens o cualquier núcleo del tálamo, a diferencia de lo detallado en los ratones de la presente Tesis Doctoral, en la que encontramos IR para esas áreas. Además, en las ratas se observó un fuerte marcaje en muchos núcleos hipotalámicos y en la capa de células de Purkinje, que no coincide con lo detallado en los ratones. Oyarce, K. *y cols.* también hallaron resultados similares a los de Mun, G. H. *y cols.* (Oyarce *et al.*, 2018), pues encontraron SVCT2 en las células de Purkinje (mediante hibridación *in situ*).

Tanto en el estudio realizado en ratas como en el presente trabajo en ratones se observó una marcada IR en las neuronas corticales y en el hipocampo, a pesar de que se vieron ciertas diferencias. Esto coincide con lo que encontraron Tsukaguchi,

H. *y cols.* mediante *Northern blot* en cerebros de ratón (Tsukaguchi *et al.*, 1999). Además, al igual que el presente trabajo, tampoco hallaron marcaje en astrocitos, y como ya se ha comentado en otros estudios, encontraron SVCT2 en las células endimarias del tercer ventrículo.

Por otro lado, Siushansian, R. *y cols.* argumentaron que la mayor parte de la VitC se almacena en los astrocitos en rata, ya que, según sus estudios, los astrocitos en cultivo pueden acumularlo en concentraciones similares a las de las neuronas (Siushansian & Wilson, 2002). Para comprobarlo, Berger, U. V. *y cols.* analizaron el ARNm de SVCT2 en astrocitos en cultivo de rata y en secciones de cerebro de rata (Berger & Hediger, 2000). El ARNm fue encontrado en los astrocitos en cultivo, pero no en los astrocitos de las secciones cerebrales. Korcok, J. *y cols.* también encontraron SVCT2 en astrocitos en cultivo de cerebro de rata (Korcok *et al.*, 2000). Astuya, A. *y cols.* mediante la técnica de la hibridación *in situ* confirmaron que SVCT2 se encontraba en neuronas, pero no en astrocitos, lo que sugirió que la presencia de SVCT2 en astrocitos en cultivo se debe a una inducción de la expresión del transportador que se ha atribuido a la elevada concentración de oxígeno del cultivo (Astuya *et al.*, 2005; May, 2012). Sin embargo, Nualart, F. *y cols.* marcaron SVCT2 y GFAP mediante hibridación *in situ* e IHQ, y en sus resultados mostraron marcaje de SVCT2 en los astrocitos que se encuentran en el área externa de la corteza entorrinal y en la glía *limitans* (la delgada barrera de los astrocitos asociada con la lámina basal parenquimatosa que rodea el cerebro) (Nualart *et al.*, 2012). Todos estos resultados sugieren que SVCT2 podría encontrarse en astrocitos altamente especializados.

La creencia de que la distribución diferencial de la VitC en las regiones cerebrales era un claro indicador de la presencia de SVCT2 fue ampliamente aceptada. Sin embargo, en muchos casos esto no se cumple. La explicación se encuentra en el hecho de que el SVCT2 no es el único transportador de VitC, pues la forma oxidada del ascorbato, el DHA, utiliza los transportadores GLUT en las neuronas (García-Krauss *et al.*, 2016). Aunque el transporte principal de VitC se realiza principalmente por medio de SVCT2, el transporte por GLUT está incluido cuando se analizan los niveles de VitC en cerebro mediante HPLC (Harrison *et al.*, 2010). Así pues, la elevada presencia de VitC en regiones con neuronas en las que se ha encontrado la presencia de SVCT2 estaría justificada, mientras que en las

regiones en las que encontramos astrocitos, el contenido es inferior. A pesar de ello, en situaciones de estrés oxidativo la expresión de SVCT2 aumenta tanto en neuronas como en astrocitos (May, 2012).

Se han realizado varios estudios tomando como referencia los niveles de VitC y/o anión ascorbato y su localización en el cerebro de diferentes especies, incluidos los humanos (Oke *et al.*, 1987). En un estudio en el que se empleó la IHQ en el cerebro de macacos se observó que el marcaje se localizó sólo en los cuerpos celulares que contenían VitC en la corteza somatosensorial primaria (Coveñas *et al.*, 2011), mientras que la IHQ realizada en tronco de encéfalo de niños presentó VitC en varias regiones del tronco cerebral (Covenas *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos para la expresión de SVCT2 en el presente trabajo concuerdan parcialmente con lo que indican estos estudios. Las mayores diferencias se encontraron con lo descrito para la VitC en el tronco cerebral de cerebros humanos en desarrollo, aunque hay que tener en cuenta que ni el modelo ni la edad a la que se realiza el análisis son comparables.

1.3. α TTP/SVCT2

En esencia, tanto α TTP como SVCT2 se localizaron en regiones cerebrales similares. Ambos se encontraron ampliamente distribuidos en las estructuras límbicas y en los sistemas visual y auditivo. Por un lado, en las regiones motoras y somatosensoriales α TTP mostró una mayor expresión que SVCT2, siendo el único en localizarse en los núcleos del tálamo que se asocian con el control hormonal. Por otro lado, la expresión de SVCT2 fue más extensa en las estructuras olfativas y en regiones implicadas en funciones como el sueño REM, la modulación del dolor y la navegación espacial.

Aparentemente, el perfil de distribución de los dos transportadores sugiere que la distribución podría ser complementaria en algunas zonas estudiadas del cerebro. Así, en los ganglios basales, se encontró marcaje para α TTP en el globo pálido, mientras que SVCT2 se detectó en el estriado. En el caso de la vía auditiva, se detectó α TTP en el cuerpo trapezoide, en tanto que SVCT2 fue encontrado en el núcleo del cuerpo trapezoide. El doble marcaje para ambos transportadores se halló en otras regiones del cerebro como el colículo inferior, la corteza entorrinal, el

subículo dorsal y otras regiones corticales. Este patrón complementario podría ser un reflejo morfológico de las interacciones entre ambas vitaminas.

Algunos estudios han observado el efecto sinérgico de ambas vitaminas en la neuroprotección frente al estrés oxidativo provocado por radicales libres (Rice, 2000; Harrison *et al.*, 2010). Se detectaron niveles más bajos de VitC en corteza cerebral de roedores, la cual, a su vez, estaba relacionada con mayores niveles de productos asociados a la peroxidación de lípidos (Harrison *et al.*, 2010). Mientras que la VitC ataca los radicales libres en la fase acuosa antes de que se produzca la interacción y, por tanto, el daño en los lípidos (Harrison *et al.*, 2014), la VitE proporciona la primera línea de defensa contra la peroxidación de las membranas lipídicas (Brigelius-Flohe, 2006; Patel *et al.*, 2011; Mocchegiani *et al.*, 2014). En algunos estudios se observó que el ascorbato podía ejercer un papel relevante a la hora de reciclar el αT , ya que en las membranas es capaz de reducir el radical α -tocoferoxilo para obtener αT de nuevo (Niki *et al.*, 1995; Dolu *et al.*, 2015). El marcaje que se encontró en las regiones corticales fue pericelular, lo que podría suponer una mayor relevancia en la regulación de la homeostasis en el compartimento extracelular. En este sentido, los niveles que alcancen las vitaminas en este compartimento tienen gran importancia para llevar a cabo la regulación de la comunicación sináptica (Rebec & Pierce, 1994; Rice, 2000).

Aunque existe controversia acerca de los beneficios que producen ambas vitaminas (Nikolaidis *et al.*, 2012; Ashor *et al.*, 2015; Mock *et al.*, 2017; Gonzalez-Fuentes *et al.*, 2018), su sinergia se ha demostrado en algunos estudios. De esta manera, la presencia de los dos transportadores en una región cerebral concreta podría contribuir a que ésta sea más resistente a la oxidación, a la neurotoxicidad y a una mayor muerte neuronal. La colocalización observada en las IHQ para ambos transportadores indica que se localizan en áreas donde existe una alta densidad neuronal junto con una elevada tasa metabólica, en los cuales ambas vitaminas serían especialmente importantes. En este sentido, se ha visto que, en distintas especies, los niveles de AA aumentan de forma proporcional a medida que la densidad neuronal aumenta en la corteza cerebral de los adultos y disminuyen a medida que aumenta la densidad de células gliales (Rice, 2000). Esto encaja en la línea de que el metabolismo oxidativo tiene lugar en una tasa mayor en las neuronas

que en las células gliales y que destaca su papel como molécula neuroprotectora (Rice, 2000).

2. Determinación de α T mediante LC-ESI-MS/MS

El método propuesto, se optimizó y validó, para la determinación de α T usando LC-ESI-MS/MS, cuya aplicación final estaba enfocada al estudio de la eficacia de encapsulación de este compuesto en las nanoemulsiones estudiadas y los niveles de concentración presentes en muestras biológicas de ratón.

El método utilizado para realizar el proceso de optimización, estudiar un parámetro mientras el resto permanecen constantes, es uno de los más sencillos para llevar a cabo, sin embargo, implica un mayor número de experimentos a realizar. Por otro lado, proporciona información acerca de cómo afecta la variación de cada parámetro en la respuesta analítica. Los parámetros químicos e instrumentales fueron optimizados siguiendo criterios puramente cromatográficos que se discutirán a continuación.

De igual modo el proceso de validación se desarrolló siguiendo parámetros de calidad según las directrices de la Administración de Medicamentos y Alimentos (F.D.A.) de EE.UU. para métodos de bioanálisis, considerados como apropiados para llevar a cabo la determinación de α T teniendo en cuenta las aplicaciones finales. De esta forma, a pesar de que existen numerosos métodos analíticos que permiten cuantificar α T con diferentes fines (Krcmova *et al.*, 2009; Van Meulebroek *et al.*, 2012b; Cimadevilla *et al.*, 2015; Hinchliffe *et al.*, 2016; Karazniewicz-Lada *et al.*, 2018), la metodología analítica desarrollada responde a criterios de mejora de parámetros puramente instrumentales y de validación, como son la rapidez, disminución del volumen de la muestra, precisión, exactitud y selectividad.

2.1. Optimización del método analítico

La optimización de los parámetros que influyen en la detección mediante ESI-MS/MS se realizó como se detalla en la sección “*RESULTADOS: 2.1. Optimización del método analítico*”.

En la LC, los principales parámetros que influyen en la elución de los componentes de una mezcla son variables relacionadas con la fase móvil (composición y componentes de la fase acuosa y orgánica, pH, fuerza iónica, flujo,

modo de elución isocrática o con gradiente) y de la fase estacionaria, es decir, la columna cromatográfica (tipo de columna, modalidad cromatográfica y temperatura). A ello hay que añadir los parámetros relacionados con el detector que se vaya a utilizar para la detección del compuesto/s de interés, que, en nuestro caso concreto, incluye un proceso de doble de detección (DAD on-line ESI-MS/MS), debido a las posibilidades que nos proporciona el equipo usado para el análisis.

Los parámetros instrumentales que influyen en la LC fueron cuidadosamente estudiados y seleccionados. En el caso de la fase móvil, ésta estaba compuesta únicamente de disolventes orgánicos, acetonitrilo y 2-propanol. Aunque habitualmente uno de los disolventes de la fase móvil suele ser acuoso, la aplicación de dos disolventes orgánicos permitió reducir el t_R del αT y, por tanto, el tiempo total del análisis, cumpliendo así uno de los objetivos del método: proponer una metodología ultra-rápida usando una CL convencional con una columna estándar. En fase reversa o inversa el uso de porcentajes muy elevados de disolventes polares suele aumentar el t_R en moléculas hidrofóbicas cuando se utilizan columnas C18. En este sentido, el hecho de que se pudiera desarrollar la separación en modo isocrático contribuyó, no sólo a la rapidez, sino también a la simplificación del método y del proceso de optimización.

La columna que se utilizó para realizar la determinación de nuestro analito de interés fue una C18 (Zorbax Eclipse Plus, 2.1 μm de diámetro interno, 50 mm de longitud y 1.8 μm de tamaño de partícula), columna que permite trabajar en fase reversa, es decir, que la fase estacionaria es más apolar que la fase móvil. Es por ello que la retención de los compuestos se produce por la interacción hidrofoba entre la fase estacionaria y el analito en cuestión. Así, las moléculas apolares, como el αT se quedan más retenidas en la fase estacionaria que las moléculas polares. No obstante, el uso de disolventes hidrofóbicos disminuye el t_R , mientras que los polares lo aumentan. El tamaño y la disposición de la molécula también influye, ya que mientras que un compuesto lineal tiene una gran superficie hidrofóbica, su isómero ramificado posee menor superficie hidrofóbica para interactuar con la fase estacionaria y queda menos retenido. Como ya hemos comentado el αT es una molécula apolar con una cadena lineal de carbonos que interacciona con la fase estacionaria lo que aumenta el t_R . Dado que no se buscaba una separación

cromatográfica al uso, pues se contaba con un sólo compuesto de interés, el objetivo se centró en obtener un tiempo de retención bajo que permitiera realizar determinaciones ultrarrápidas y conseguir así un análisis en el menor tiempo posible. Sin embargo, también se tuvo en cuenta que, aunque únicamente se quería determinar la concentración de α T, cuando se utilizaran matrices biológicas complejas, habría una multitud de componentes en el extracto obtenido tras el tratamiento de la muestra, que influirían en el resultado final.

El volumen de inyección es un parámetro cromatográfico que está más relacionado con el tipo de muestra que se va a aplicar. Se decidió evaluar este parámetro debido a que, en el caso de las muestras procedentes de roedores, la cantidad de sangre y de tejido disponible para el análisis es muy pequeña. Obviamente, a mayores volúmenes de inyección más cantidad de los componentes biológicos interferentes entran en el sistema. Esto puede implicar mayores problemas de ionización y, como consecuencia, un mayor EM, aunque, por otro lado, el α T se introduce también en mayor cantidad. Sin embargo, volúmenes de inyección muy pequeños implican una menor cantidad de α T que puede afectar finalmente a la sensibilidad del método. Por lo tanto, es necesario seleccionar un valor de compromiso entre la sensibilidad y la elevada cantidad de interferencias. Como se puede observar en la Figura 35, el volumen más pequeño, de 2 μ L, fue obviamente el de menor RPA, mientras que volúmenes muy grandes implican un aumento de interferencias en la muestra, que podría conllevar una pérdida de sensibilidad y selectividad. Por ello, se seleccionó el volumen de 5 μ L, ya que este valor presentaba un valor de RPA aceptable, sin pérdida de S/N, y se evitaban volúmenes elevados que aumentarían la inyección de interferencias provocando un aumento del EM y un gasto mayor de extracto biológico.

Teniendo en cuenta que la técnica instrumental usada para la determinación está acoplada a un detector de MS con ESI y un QqQ como analizador, es necesario seleccionar los iones característicos del compuesto en estudio antes de optimizar los parámetros que afectan a la ionización. Para ello, inicialmente se procedió a la selección de los iones precursores y productos de α T y d_6 - α T mediante la herramienta *Optimazer*, donde quedó demostrado que la ionización de ambas moléculas para obtener el ion precursor debía hacerse en modo negativo. De las

estructuras de las moléculas (Figuras 37 y 38), se dedujo que la pérdida del protón tenía más posibilidades de producirse en el grupo hidroxilo del anillo aromático. De forma similar, se supusieron las estructuras del resto de iones producto, donde se tuvo en cuenta las fuerzas de atracción de los enlaces de la molécula y el peso molecular.

La optimización de aquellos factores que estaban estrechamente relacionados con la etapa de ionización se estudiaron evaluando, en cada caso, parámetros tales como RPA y RSD. El flujo y la temperatura del gas presentaron en su estudio, un valor para el cual las RPA alcanzaron la máxima cifra, ya que el caso del flujo las RPA aumentaron a medida que aumentaba el flujo; mientras que en la temperatura del gas, las RPA de temperaturas por debajo y por encima de 300 °C fueron menores que las de este punto (Figuras 39 y 40). Cuando se evaluó el estudio de la influencia de la presión del nebulizador, se observaron dos puntos máximos de RPA (15 y 35 p.s.i.). En este caso se seleccionó 35 p.s.i., debido a que la variación de los puntos anteriores y posteriores era menor que en el caso de 15 p.s.i. Lo que garantizaba una menor fluctuación de los datos.

2.2. Validación del método cromatográfico

Los resultados obtenidos del proceso de validación indicaron que el método era preciso, en términos de repetibilidad y reproducibilidad, exacto, selectivo y permitía trabajar en un amplio intervalo de concentración lineal. La precisión se estudió en términos de repetibilidad y de reproducibilidad, y tal y como se muestra en los resultados, en todos los casos los valores de RSD obtenidos (< 5 %) permitieron calificar al método propuesto como preciso en cuanto al t_R , APA y RPA.

La aplicación de un método de calibración basado en el uso de un IS tiene especial relevancia cuando la aplicación final del método es mayoritariamente en muestras biológicas. Esto consigue minimizar los errores en la cuantificación de dicha sustancia por la presencia de una matriz muy compleja. El LOQ obtenido para los dos detectores usados en línea (on-line) fue mayor con el detector óptico (3.0 µg/mL) mientras que el LOQ mediante ESI-MS/MS, fue menor (0.4 µg/mL). Esto permitió la cuantificación de αT en la mayoría de las muestras usadas, tanto para la eficacia de encapsulación de las nanoemulsiones como para las muestras de ratón utilizadas, ya que la concentración de αT encontrada fue superior en la mayoría de

las muestras analizadas. Una vez obtenido el valor del LOQ, se estableció el intervalo lineal de trabajo. Este intervalo fue desde 3.0 a 200.0 $\mu\text{g}/\text{Ml}$, en el caso del DAD, y de 0.6125 a 20.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el ESI-MS/MS. La presencia de diferencias significativas entre las curvas de calibrado realizadas en días diferentes, pusieron de manifiesto la necesidad de repetir las curvas de calibrado con cierta frecuencia, usar QC durante la medida de muestras y aplicar ciclos de lavado en la columna analítica utilizando diferentes porcentajes de la fase móvil.

Tanto los valores de exactitud como de selectividad no revelaron problemas en la realización de las medidas, y ambos parámetros de calidad se consideraron adecuados para la llevar a cabo la determinación de αT en las muestras propuestas. Además, el EM encontrado en las muestras de plasma y suero estuvo en todos los casos por debajo del 20 %, con lo que no supusieron un efecto negativo en los resultados.

2.2.1. Estudio sobre el tratamiento de tejidos biológicos

En el tratamiento de muestras biológicas se ha de tener en cuenta varios factores, entre ellos, el objetivo de la determinación (naturaleza de los analitos y los parámetros de calidad exigidos) y el tipo de muestra a procesar. Es por ello que, a la hora de realizar el tratamiento de fluidos y tejidos biológicos, se deben realizar una serie de pasos con el objetivo de reducir la presencia de compuestos que conforman la matriz de la muestra y que pueden interferir en la medida de el/los analito/s objeto del análisis. Estas etapas suelen incluir i) una desnaturalización de proteínas en la que se suele usar surfactantes, ii) una precipitación de proteínas usando habitualmente algún disolvente orgánico (EtOH, metanol o acetonitrilo, entre otros) y iii) una etapa de extracción (líquido-líquido, en fase sólida, fluidos supercríticos, entre otras). Además, este proceso puede implicar una última etapa de desecación completa de la muestra y su consiguiente reconstitución con la doble finalidad de poder concentrar o diluir la muestra, en función de las necesidades, además de poder modificar la naturaleza del disolvente reconstituyente, si fuera necesario.

En el tratamiento de muestras para la determinación del αT se ha de tener en cuenta que, aunque no se une químicamente a los macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas), sí puede estar asociado a otros componentes biológicos (Ruperez *et al.*, 2004). Por este motivo, una saponificación o condiciones agresivas

no serían necesarias, mientras que el uso de disolventes orgánicos, como el etanol y el SDS, para romper las posibles asociaciones con otras moléculas, está muy extendido (Rupérez *et al.*, 2001). Además, el uso de BHT como antioxidante y, por tanto, inhibidor de radicales libres, previene la oxidación del α T durante el proceso de tratamiento de muestras (Rupérez *et al.*, 1999). En cuanto a los disolventes de extracción, el hexano es el más utilizado, aunque también se han observado buenos resultados con propanol y acetona, entre otros (Rupérez *et al.*, 2001).

En este sentido, se hizo imprescindible desarrollar un tratamiento adecuado teniendo en cuenta que las muestras que se querían analizar, en este caso tejidos biológicos (hígado, cerebro y pulmón). En el estudio del AVD, tanto las muestras de hígado como las de cerebro, presentaban mejores resultados con los protocolos AVD₂ y AVD₃. Esto se debe principalmente a que al aumentar el volumen de los disolventes se produce un efecto “dilución” y, por tanto, disminuye el EM de todos los compuestos presentes en la muestra. Sin embargo, implica un mayor gasto de reactivos y, en consecuencia, una mayor generación de residuos. Por ello, se realizó un segundo estudio de AVR. Dado que el tratamiento de las muestras implica una desecación y una posterior reconstitución, se vio que realmente el factor que estaba implicado era el volumen de reconstitución.

El hígado es un tipo de órgano altamente complejo en su composición debido a que está implicado en numerosos procesos: producción de bilis, almacenamiento de sustancias grasas, síntesis de proteínas plasmáticas y metabolismo y eliminación de vitaminas y sustancias xenobióticas, entre otras muchas (Kalra & Tuma, 2020). Probablemente debido a ello, se observó un elevado EM respecto a otros tejidos. De la Figura 44 se puede deducir que el AVR₃ es claramente el mejor protocolo para procesar este tejido, pues necesita un mayor volumen de reconstitución para disminuir la interferencia de todas las sustancias que lo componen.

El cerebro es un órgano de tejido nervioso compuesto principalmente por neuronas y células gliales, con un alto contenido graso debido a la presencia de la mielina (lípidos: 70-80 %) (Brady *et al.*, 2005; Maldonado & Alsayouri, 2020). Esto da lugar a una matriz biológica altamente homogénea cuando es comparada con otras matrices, como es el caso del hígado. Por otro lado, los pulmones, cuya función principal es el intercambio gaseoso (Haddad & Sharma, 2020), son órganos de

composición variable (agua, lípidos, colágeno), aunque menos complejos que el hígano. Con estos dos órganos ocurrió algo similar, ya que el protocolo AVR₃ era el que permitía obtener picos más limpios y eficaces (Figura 44). Pero, debido a las características intrínsecas de estos dos tejidos, se decidió seleccionar un protocolo en el que la dilución fuera la menor posible (AVR₂), con el fin de aumentar la sensibilidad del proceso final.

2.3. Aplicación del método propuesto en la determinación de α T en formas farmacéuticas y muestras biológicas

A continuación, se discute los resultados obtenidos en los diferentes estudios en los que el método analítico, optimizado y validado (Villaseca-Gonzalez *et al.*, 2018), fue empleado.

2.3.1. Eficacia de encapsulación de nanoemulsiones

El estudio de la eficacia de encapsulación, es decir, la evaluación de la carga de α T en matrices nanoestructuradas de lípidos de diferente composición, fue una de las aplicaciones del método analítico para la cual fue desarrollado. Los resultados revelaron que las 4 formulaciones propuestas a partir de diferentes aceites presentaban una encapsulación superior al 90 %. Sin embargo, a la hora de seleccionar una nanoemulsión para llevar a cabo estudios *in vivo*, previamente se han de realizar estudios *in vitro*, como los que se realizaron en nuestro laboratorio, en los que se han de tener en cuenta otros factores como la bioaccesibilidad y los ensayos de lipólisis (Plaza-Oliver *et al.*, 2015). Este estudio permitió seleccionar la nanoemulsión de soja para realizar estudios *in vivo*.

2.3.2. Determinación de α T en muestras de plasma y suero murino

El método analítico optimizado y validado en matrices biológicas (plasma y suero), fue finalmente aplicado a muestras reales. Así pues, y en consonancia con otros estudios realizados en distintas condiciones, se vio que la formulación de α T en nanoemulsiones de soja favorece una mayor absorción del α T y, por tanto, aumenta su biodisponibilidad (Hatanaka *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). Además, se encontró que la cantidad de α T fue mayor en el suero que en el plasma. Sin embargo, para poder afirmar este hecho fue necesario realizar estudios

que nos permitiesen estudiar el comportamiento del perfil sanguíneo de α T en ambas muestras.

Así fue como se propuso el estudio cinético, con el objetivo de observar y estudiar cómo varía la concentración de α T administrado por vía oral y en forma de nanoemulsión en la sangre y en tejidos de roedores. Los resultados se detallan en la sección “*RESULTADOS: 3. Administración oral de α T-NE en modelos animales*”.

3. Administración oral de α T-NE

La VitE y el α T han sido ampliamente utilizados en la clínica gracias a las diferentes propiedades biológicas que manifiestan *in vivo* (Schmolz *et al.*, 2016; Galli *et al.*, 2017). Su carácter multifuncional pone de relieve los beneficios que puede ejercer en el organismo. Sin embargo, para ello es necesario que se alcance la concentración en sangre necesaria para que pueda observarse un efecto terapéutico. En este sentido, debido a las propiedades físico-químicas que presenta la VitE, su disponibilidad en sangre es controvertida (Lodge *et al.*, 2004; Hatanaka *et al.*, 2010).

Se han realizado varios estudios de suplementación de VitE, o de α T, en los cuales se ha demostrado que este aporte aumentaba los niveles de α T en sangre y varios tejidos. En el estudio llevado a cabo por Chen, W. *y cols.*, ratones macho C57BL/6J de dos meses de edad fueron alimentados con una dieta rica en VitE durante un mes (Chen *et al.*, 2012). Los datos mostraron mayores niveles de α T en plasma respecto a sus controles. En tejido, el hígado fue el órgano donde más α T se encontró y el pulmón en el que menos. Posteriormente, Bayram, B. *y cols.* realizó un estudio de administración de 20 mg/kg de VitE, en forma de RRR- α -tocoferil acetato, en la dieta habitual de los animales (Bayram *et al.*, 2013). Para ello, utilizaron ratones macho C57BL/6 durante 8 semanas a diferentes edades (2, 8, 12, 16 y 20 meses). Mientras que en hígado confirmaron que los niveles de α T iban aumentando, en cerebro no observaron cambios con la edad. En otro estudio, se utilizaron ratones Xpg -/- (procedentes de un fondo C57BL/6J y FVB) a los que se suministró en la dieta VitE en dosis bajas, intermedias y altas (2.5 mg/kg, 75 mg/kg y 375 mg/kg de pienso, respectivamente) desde el nacimiento hasta los dos y tres meses de edad (La Fata *et al.*, 2017). Sus resultados mostraron que los niveles de α T en plasma aumentaron significativamente a medida que se aumentaba la cantidad ingerida. En el hígado también observaron un aumento de los niveles de α T, al igual que ocurrió en

cerebro. Cabe destacar que, en el caso del cerebro, se consiguieron niveles mucho mayores en la dieta de los tres meses que en la de dos meses. Takahashi, K. y cols. evaluaron la variación de los niveles de α T a lo largo de la edad (3, 6, 12, 18 y 24 meses) en muestras de plasma y varios tejidos (incluidos hígado y cerebro) de ratones C57BL/6Ncr, cuya dieta contenía 165 mg/kg de α T en el pienso (Takahashi *et al.*, 2017). Sus resultados mostraron que los niveles de α T presentan cierta tendencia a disminuir en plasma, que se ve claramente en hígado, mientras que en cerebro aumentaron con la edad. Matsuo, K. y cols. examinaron ratones macho CR57BL/6J y DBA/2C con tres semanas de edad, los cuales fueron alimentados con una dieta que contenía un suplemento de 500 mg/kg de α T durante un mes (Matsuo *et al.*, 2019). Los niveles de α T fueron mayores en plasma, hígado y corteza cerebral, respecto a los controles. Se encontraron diferencias entre cepas, lo que sugiere que existen procesos metabólicos modificados. En los estudios realizados en ratas macho Sprague-Dawley, que recibieron un suplemento de α T, también se observaron mayores niveles en plasma y cerebro (Cecchini *et al.*, 2003; Ferri *et al.*, 2015; Kiyose *et al.*, 2015).

En la actualidad, el desarrollo de nuevas metodologías ha permitido el diseño de sistemas de administración de fármacos, que, entre otras funciones, mejoran la relación eficacia/seguridad y superan los principales inconvenientes que suponen algunas propiedades físico-químicas en la administración de sustancias activas (Mandal *et al.*, 2010; Tiwari *et al.*, 2012). Las nanoemulsiones tienen un papel relevante a la hora de mejorar la biodisponibilidad de los compuestos que portan (Jaiswal *et al.*, 2015). Por ello, en este trabajo se planteó el uso de nanoemulsiones como sistema de administración oral de α T.

A este respecto, y teniendo en cuenta la bibliografía existente hasta el momento, se han realizado tres estudios de administración de VitE en forma de nanoemulsión por vía oral en los que se ha analizado su perfil cinético en plasma. Gong, Y. y cols. administraron nanoemulsiones de VitE en ratas macho Sprague-Dawley en una dosis única de 40 mg/kg (Gong *et al.*, 2012). En su estudio observaron que la biodisponibilidad de VitE era mayor en forma de nanoemulsión frente a la administrada en cápsula blanda (usada muy a menudo en la administración de VitE, pero con baja biodisponibilidad oral). El segundo de los trabajos en los que se

analizó el perfil cinético de la VitE mediante la administración de nanoemulsiones fue el llevado a cabo por Hanataka, J. y cols. En este trabajo se realizó una administración oral en ratas de una dosis única de 30 mg/kg de α T tras un ayuno de 24 h (Hatanaka *et al.*, 2010). Sus resultados mostraron un aumento de la biodisponibilidad de α T en sangre frente al control. Por último, en el estudio realizado por Parthasarathi, S. y cols. se administró, por medio de una sonda de alimentación, una dosis única de 100 mg/kg de α T a ratas macho adultas, las cuales permanecieron en ayunas la noche anterior (Parthasarathi *et al.*, 2016). Al igual que en los casos anteriores, la biodisponibilidad de la nanoemulsión de α T fue mayor que la de otras emulsiones convencionales y submicrométricas.

Los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio por Plaza-Oliver, M. y cols., comentados en la sección “INTRODUCCIÓN: 2.4. Nuevas formas farmacéuticas de administración de α T”, dieron como resultado la obtención y selección de una nanoemulsión adecuada para α T con gran potencial para estudios *in vivo* (Plaza-Oliver *et al.*, 2015). Este trabajo, junto con el método analítico para determinar α T desarrollado en la presente Tesis Doctoral, proporcionaron las herramientas necesarias para llevar a cabo una administración oral de α T-NE en dos cepas distintas de ratones: la cepa C57BL/6J, ampliamente estudiada, y la cepa SAMP8, modelo animal de senescencia acelerada, frente a su control, SAMR1.

La administración de α T-NE en ratones C57BL/6J se realizó con el objetivo de obtener el perfil cinético en plasma y suero del α T, así como su distribución en tejidos, como el hígado, cerebro y pulmón. El grupo administrado con α T libre desempeñó la función de control del α T-NE, ya que también se quiso comprobar que la nanoemulsión ayudaba a obtener mejores resultados que si se administraba el α T sin emulsionar.

Los ratones son animales nocturnos (Peirson *et al.*, 2018), por lo que la ingesta del alimento se hace principalmente durante el periodo de oscuridad. El pienso que sirve de alimento a los animales en el estabulario contiene VitE, por lo que, durante el desarrollo de los experimentos, todos los ratones fueron sometidos a un periodo de ayuno de 6 h previo a la administración de las sustancias. De esta forma, se eliminó la interferencia de la VitE del pienso en el estudio cinético.

Posteriormente, con los resultados obtenidos en los ratones C57BL/6J, se realizó un experimento de administración puntual de α T-NE similar en ratones SAMP8 y SAMR1, en el cual las muestras fueron tomadas únicamente a las 3.5 h de la administración. Las diferencias metabólicas entre ratones de diferentes líneas justifican la necesidad de comprobar si los resultados son comparables a los obtenidos en cepas diferentes. Este hecho quedó evidenciado en el estudio de Baxter, L. L. *y cols.*, en el que observaron diferencias significativas en la concentración de α T en plasma, hígado y cerebro entre ratones Balb/cJj y C57BL/6J tras recibir un suplemento dietético de α T (Baxter *et al.*, 2012). Estos resultados sugerían que las rutas metabólicas implicadas en el almacenamiento y excreción de α T de diferentes cepas podrían estar alteradas como consecuencia de la variación alélica, algo similar a lo que observaron Matsuo, K. *y cols.* (Matsuo *et al.*, 2019).

El análisis del comportamiento de la VitE tras la administración oral en el modelo SAMP8 podría ser de especial interés para su uso en futuros estudios de administración crónica, ya que se trata de un modelo de envejecimiento acelerado en el que el nivel de estrés oxidativo es muy alto (Morley *et al.*, 2012).

3.1. Determinación de α T en sangre del modelo murino C57BL/6J

Aunque generalmente el plasma y el suero son empleados indistintamente para el análisis de diferente moléculas, la elección de uno de ellos en estudios clínicos ha sido tema de controversia en las últimas décadas (Ladenson *et al.*, 1974; Kubasik & Sine, 1978; Boyanton & Blick, 2002; Liu *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2020; Plebani *et al.*, 2020). Su principal diferencia es que, durante la obtención de la muestra, en el caso del plasma, la centrifugación se realiza en presencia de anticoagulantes (conservando los factores de coagulación y el fibrinógeno); mientras que en el suero se realiza en ausencia de anticoagulantes, lo que da lugar al proceso de coagulación (perdiendo en dicho proceso los factores de coagulación y el fibrinógeno) (Uges, 1988; Mathew & Varacallo, 2020). En el caso del plasma, el anticoagulante y la presencia de fibrinógeno pueden suponer una fuente de contaminación, afectando a la calidad de la muestra; en tanto que, en el suero, el proceso de coagulación que tiene lugar durante la centrifugación supone una gran fuente de variabilidad entre muestra y muestra (Dufourd *et al.*, 2019).

En general, la muestra sanguínea de elección para llevar a cabo estudios cinéticos suele ser el plasma (Zamboni *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2015; Morozova *et al.*, 2017; Gabani *et al.*, 2020), si bien es cierto que el suero se ha empleado como muestra en algunos estudios (Doerge *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2019). En la presente Tesis Doctoral se han analizado ambas muestras, observándose un perfil de comportamiento similar en plasma y en suero. Además, la administración de α T-NE permitió alcanzar mayores niveles de α T en las muestras analizadas que cuando se administró el α T sin emulsionar.

En el GC, las concentraciones de α T se mantuvieron constantes (con alguna pequeña variación en el suero) a pesar del prolongado ayuno. Estos datos ponen de relieve la regulación de los niveles de α T que tiene lugar en el hígado. En el GnNE, se observó un aumento de α T en ambas muestras. Cabe destacar la gran variabilidad que se encontró en el suero y que podría deberse a las características propias de la muestra, así como al proceso de coagulación que tiene lugar durante su obtención (Dufourd *et al.*, 2019). Además, mientras que en el plasma se encontró un máximo de concentración de α T a las 12 h, en el suero se encontraron dos puntos máximos, a las 3.5 y 12 h tras la administración, pero sin significación entre puntos, salvo el de las 3.5 h. Por otro lado, el GNE mostró un claro aumento de los niveles de α T respecto al GC desde los primeros puntos tras la administración, a diferencia de lo que pasó en el GnNE. Mientras que en el suero se encontró el máximo a las 3.5 h, en el plasma se encontraron dos máximos aparentes, a las 3.5 h y a las 12 h. Algunos estudios, apuntan a que este segundo máximo responde al ciclo enterohepático que sufre la molécula (Wu & Croft, 2007; Schmolz *et al.*, 2016). Es posible que este proceso influyera en el GnNE del suero donde también se vieron dos máximos. Por último, al comparar el GnNE con el GNE se vio, tanto en plasma como en suero, que el GNE proporcionó niveles significativamente mayores de α T durante las primeras horas tras la administración. Por lo tanto, el α T-NE eleva los niveles de α T en sangre más que el α T no nanoemulsionado desde el inicio de la administración. Además, se observó que los niveles que se alcanzaban en plasma eran menores que los que se midieron en suero. Esta diferencia, pudo deberse tanto a las diferencias del proceso de extracción de las muestras como a la composición de ellas. Sin embargo, los estudios realizados y la bibliografía disponible son escasos para proporcionar una respuesta adecuada a este suceso.

3.2. Distribución de α T en tejidos del modelo murino C57BL/6J

El hígado, debido al papel que desempeña en la discriminación a favor del α T frente al resto de isómeros, fue uno de los tejidos examinados. El GC reveló que, a pesar del ayuno, los niveles se mantuvieron constantes. Esto podría indicar la existencia de mecanismos de regulación de los niveles de α T que permite mantenerlos incluso en ayunas. Nuestros resultados mostraron que, en línea con otros estudios citados anteriormente (Chen *et al.*, 2012; Bayram *et al.*, 2013; La Fata *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2019), los niveles de α T en hígado aumentaron significativamente tras la administración, ya sea en forma de nanoemulsión como no emulsionada. En el GnNE se observó una gran variabilidad durante las primeras horas, quizás debido a una absorción irregular a nivel intestinal por la falta de grasa dietética, necesaria para la absorción del α T, así como por la digestión de lípidos y formación de micelas (Hatanaka *et al.*, 2010) y la transferencia del α T a sangre. Cabe destacar que en el GNE, a diferencia de lo que observaron Kiyose, C. y cols., los niveles de α T continuaron aumentando a partir de las 6 h hasta las 24 h (Kiyose *et al.*, 2015).

El análisis del cerebro no mostró diferencias relevantes en la concentración de α T entre los diferentes grupos. Aunque el mecanismo no está claro aún, pues se cree que varias proteínas estarían implicadas en su transporte, se ha demostrado que α T atraviesa la BHE de forma controlada y regulada asociado a HDL y LDL (Dehouck *et al.*, 1997; Goti *et al.*, 2000; Goti *et al.*, 2001; Goti *et al.*, 2002; Balazs *et al.*, 2004). Sin embargo, este paso puede no ser tan rápido (Butterfield *et al.*, 1998; Viana *et al.*, 1999; Vatassery *et al.*, 2007), lo que podría explicar que con una sola administración de α T no se observaran cambios importantes a nivel cerebral.

Por último, los niveles de α T cuantificados en pulmón se hallaron por debajo del LOQ. Esto sugiere que, a diferencia del hígado, en el aporte externo no supone una variación que permita ser cuantificado por el método analítico descrito. A pesar de que se realizó una administración única, Chen, W. y cols. también encontraron niveles bajos en este órgano tras cuatro semanas de suplementación con VitE (Chen *et al.*, 2012). Esto quizás pueda estar relacionado con los bajos niveles de α TTP que se encuentran en los pulmones (Hosomi *et al.*, 1998), sin embargo, la bibliografía disponible es insuficiente para establecer esta relación.

3.3. Determinación de α T en el modelo murino SAM

Los resultados obtenidos en C5BL/6J pusieron de manifiesto el buen funcionamiento de la nanoemulsión a la hora de elevar los niveles de α T en sangre y tejidos. Como ya se ha comentado, el α T juega un papel clave en enfermedades neurológicas, así como en procesos asociados al envejecimiento (ver sección "INTRODUCCION: 2.2. Funciones biológicas de la VitE").

En la actualidad, el uso de vitaminas para el análisis del papel de estas en los procesos asociados al envejecimiento está ampliamente generalizado, sin embargo, son escasos los estudios realizados para evaluar sus beneficios en ratones SAMP8. El modelo SAMP8 presenta unas características que lo hacen uno de los mejores modelos para el estudio del estrés oxidativo durante el envejecimiento (Morley *et al.*, 2012). Sin embargo, no se han encontrado trabajos en los que se analice el efecto de las vitaminas en este modelo. Tan sólo se han evaluado los efectos de la vitamina D (Cheng *et al.*, 2017; Rui *et al.*, 2017) y la VitE (en forma de α T), que se comentan a continuación.

En 2004, Nakajima, K. *y cols.* evaluaron el efecto que ejercían 20 mg de solución oleosa de α T junto con 0.98 mL de solución salina depositados directamente en el estómago por medio de una sonda, dos veces por semana, durante 28 días en machos y hembras SAMP8 con 50 semanas de edad (Nakajima, 2004). Los niveles en sangre, así como en tejidos, no fueron analizados. Se analizó la pérdida de memoria y aprendizaje (mediante una prueba similar a la evitación pasiva), el crecimiento (mediante el peso corporal) y la senescencia (mediante parámetros cualitativos como la pasividad, la pérdida de pelo, cataratas y presencia de úlceras en la córnea, entre otros). Los resultados del estudio demostraron que el α T ejercía cierta mejora en estos parámetros frente a su control.

El segundo de los trabajos realizados sobre el modelo SAMP8 fue el llevado a cabo por Petursdottir, AL. *y cols.* en 2007 (Petursdottir *et al.*, 2007). En su trabajo, evaluaron el contenido de α T en el hipocampo y en la amígdala en relación con el daño oxidativo asociado a la edad en ratones macho SAMP8 de 2, 4, 12 y 18 meses. Así, pudieron observar que, en términos generales, los niveles de α T difieren con la edad, encontrando que los de 18 meses presentaban mayores concentraciones en hipocampo y amígdala que el resto de las edades. Además, a los 2 meses se obtuvo

mayor concentración en la amígdala que en el hipocampo, no así en el resto de las edades.

Posteriormente, Bayram, B. *y cols.*, además del estudio en C57BL/6 mencionado anteriormente, llevaron a cabo otro estudio de administración de 150 mg/kg de VitE en forma de RRR- α -tocoferil acetato en la dieta habitual de ratones hembra SAMP8 y SAMR1 de 2.5 meses de edad durante 4.5 meses (Bayram *et al.*, 2013). Como se comentó anteriormente, sólo midieron la cantidad de α T en hígado y cerebro. En el primer caso, en el hígado, hallaron mayor concentración en SAMP8 que en el SAMR1 al finalizar la administración. Pero en cerebro argumentaron que no encontraron ningún aumento de α T. Lo que, según ellos, justificaba la realización de estudios adicionales para evaluar los cambios relacionados con la edad en la administración de vitaminas antioxidantes.

Así pues, dada la escasez de información de α T administrado en ratones SAM, el objetivo del trabajo se centró en comprobar si la nanoemulsión elevaba las concentraciones de α T en sangre y tejidos frente a sus grupos controles, como ocurrió con los C57BL/6J. Además, a pesar de que SAMP8 y SAMR1 proceden originalmente del mismo fondo genético, la variabilidad metabólica provocada por la senescencia acelerada es elevada (Tomobe & Nomura, 2009). Por ello, se hizo necesario observar el comportamiento de la nanoemulsión, y del α T absorbido, en ambas cepas. Este estudio podría proporcionar la información necesaria para poder llevar a cabo una administración crónica en estos modelos con el fin de aumentar los niveles de α T tras ser administrado crónicamente en forma de nanoemulsión.

De los experimentos realizados con los C57BL/6J, se dedujo que el α T administrado en forma de nanoemulsión proporcionaba mayores concentraciones en sangre que la administrada en forma libre. Sabiendo esto, y en línea con la aplicación del principio de las tres “R” (reducir, refinar y reemplazar) cuando se usan animales vivos para fines científicos, se eliminó el GnNE con el objetivo de reducir el número de animales empleados. Siguiendo este mismo principio, se seleccionó un único punto de administración que permitiera discernir si efectivamente se conseguía elevar los niveles de α T en sangre y tejidos, sin la necesidad de replicar el estudio al completo con todos los puntos. Para ello, se seleccionó el punto que proporcionara mayores niveles de α T, tanto en plasma como

en suero, de los datos obtenidos para C57BL/6J. En las Figuras 46 y 47, se observa como el GNE alcanza mayores niveles de concentración a las 3.5 h de la administración, mientras que el GC sufrió un pequeño descenso en la concentración para ambas muestras. Por este motivo, se seleccionó este punto y aplicarlo en los roedores SAM. Además, la similitud encontrada entre los perfiles de la concentración-tiempo en plasma y suero, junto con la dificultad para obtener ambas muestras de un único roedor, obligó a elegir entre una de las dos muestras. A pesar de la controversia, comentada anteriormente, que supone discernir entre plasma y suero, se seleccionó el plasma como muestra de estudio, ya que suele ser la muestra de elección en estudios de cinética de moléculas bioactivas y los datos en la administración del C57BL/6J fueron más estables.

Los resultados de este experimento confirmaron que la nanoemulsión consiguió elevar los niveles de α T en roedores SAM. Los datos fueron similares a lo hallado con los ratones C57BL/6J, pues se encontraron diferencias significativas entre los CG y los GNE de SAMP8 y de SAMR1 en plasma e hígado, pero no en cerebro. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre SAMP8 y SAMR1, probablemente debido a que se trata del análisis de un único punto o por el origen genético en común.

Así mismo, se compararon los resultados de los ratones SAM con los C57BL/6J, en los cuales sí se encontraron diferencias significativas para todas las muestras. En el caso del plasma, tanto el GC como el GNE de los roedores SAM presentaron niveles de α T que fueron significativamente mayores que los del C57BL/6J. Un dato a tener en cuenta es que los niveles de α T en el SAM son mayores que los del C57BL/6J en el GC, lo que puede deberse a las diferencias fisiológicas entre ambas cepas. Además, el incremento de α T entre el GC y el GNE es similar en las tres cepas, por lo que la absorción parecía que tenía lugar de forma semejante.

En el hígado sucedió algo parecido, pues tanto en los CG como en los GNE de las dos cepas SAM, los niveles fueron significativamente mayores que los del C57BL/6J. La significación fue mayor para los GC ($p < 0.01$) que para los GNE ($p < 0.05$), lo cual, al igual que con el plasma, apoya la idea de que los niveles de α T en los SAM son mayores, incluso con el ayuno, que los del C67BL/6J. Tras la administración, la concentración de α T aumentó considerablemente en los SAM,

especialmente en el SAMP8. Además de las diferencias filogenéticas, esta diferencia en el SAMP8 podría estar relacionada con el envejecimiento acelerado que experimentan estos roedores (ya que se trata de ratones viejos), pues como ya describieron Takahashi, K. *y cols.* los niveles de α TTP disminuyen con el envejecimiento y da lugar a la acumulación de α T en hígado (Takahashi *et al.*, 2017).

Por último, en cerebro se mantuvieron las diferencias entre cepas SAM y C57BL/6J en el GC y el GNE. Estas diferencias fueron más acusadas en los GC que en los GNE de SAMP8 y SAMR1 frente a los C57BL/6J. Además, esta diferencia fue más marcada para el SAMP8 que para el SAMR1, quizás por los mismos motivos que en el caso del hígado.

Estos datos indican, por una parte, que el nivel basal de α T en ambos modelos (C57BL/6J y SAM) es significativamente diferente, tanto en sangre como en los tejidos analizados, sin embargo, y a pesar de esto, la administración de α T en forma de nanoemulsión produce un incremento significativo de este en sangre e hígado, pero no así en cerebro. Por tanto, aunque se trate de la evaluación de un solo punto de la cinética, se podría esperar que la formulación produzca un incremento en la biodisponibilidad del α T en el modelo SAM, lo que nos habilitaría para realizar un estudio de administración crónica en este modelo, garantizando probablemente el aumento de los niveles de α T gracias a la nanoemulsión.

CONCLUSIONES

1. Los transportadores de VitE, α TTP, y VitC, SVCT2, se encontraron ampliamente distribuidos en el cerebro de los ratones Pol μ . Esta distribución fue similar independientemente de la edad y el genotipo de los animales estudiados.
2. Ambos transportadores, α TTP y SVCT2, se localizaron conjuntamente en la mayoría de las regiones cerebrales estudiadas, mientras que la presencia individual de SVCT2 presentaba una distribución más restringida a determinadas áreas cerebrales.
3. α TTP y SVCT2 se encontraron presentes en neuronas del hipocampo y la corteza entorrinal, regiones asociadas con procesos de aprendizaje y memoria.
4. La amplia distribución de los transportadores de VitE y VitC en el cerebro del modelo animal Pol μ puso de manifiesto el papel relevante que podrían ejercer ambas vitaminas en el SNC durante el envejecimiento.
5. El método analítico propuesto, optimizado y validado, para la determinación de α T mediante LC on-line DAD y ESI-MS/MS permitió obtener una elevada precisión, exactitud y selectividad dando como resultado unos datos de análisis de elevada calidad.
6. Además, las determinaciones que se llevaron a cabo se pudieron realizar en un tiempo muy corto (ultra-rápido), sin derivatización y en modo isocrático, dentro de un intervalo de trabajo adecuado al tipo de muestras que se pretendían analizar y con una señal estable y reproducible.
7. El método desarrollado se aplicó con éxito en la cuantificación de α T en sistemas de administración de sustancias activas (como es el caso de las nanoemulsiones) y en diferentes fluidos y tejidos biológicos de ratones; por tanto, esta metodología es una herramienta fundamental de apoyo a estudios de formulación farmacéutica y cinética tras la administración oral de una sustancia.
8. La administración oral única de α T-NE puso de relieve el papel desempeñado por la nanoemulsión, proporcionando una mayor biodisponibilidad de α T en sangre, tanto en ratones C57BL/6J como en roedores SAM.
9. Tanto en muestras de plasma como de suero, el α T presentó un comportamiento similar en todos los grupos evaluados cuando fue administrado en forma de nanoemulsión y sin nanoemulsionar en el modelo

C57BL/6J. Sin embargo, la variabilidad y la concentración en las mediciones de α T fueron mayores en el suero que en el plasma.

10. En las muestras de hígado, las cantidades de α T fueron más elevadas tras la administración de α T-NE frente al control y al no nanoemulsionado en los diferentes modelos de ratones (C57BL/6J, SAMP8 y SAMR1); probablemente como consecuencia del papel regulador a nivel sistémico de los niveles de α T que tiene lugar en dicho órgano.
11. En los extractos de cerebro, ambos modelos de ratones (C57BL/6J y SAM) presentaron el mismo comportamiento. No se observaron cambios en los niveles de ninguno de los grupos de estudio con respecto a los controles.
12. En los extractos de pulmón la concentración de α T no pudo determinarse ya que se halló por debajo del LOD del método analítico en todos los casos.
13. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la concentración de α T entre SAMP8 y SAMR1, sin embargo, los niveles de α T, antes y después de la administración puntual de α T-NE, eran mayores en el modelo SAM que en el modelo C57BL/6J en todas las muestras biológicas analizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abidi, S.L. (2000) Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *Journal of Chromatography A*, 881, 197-216.
- Abrahams, S., Haylett, W.L., Johnson, G., Carr, J.A. & Bardien, S. (2019) Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neuroscience*, 406, 1-21.
- Adaway, J.E. & Keevil, B.G. (2012) Therapeutic drug monitoring and LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 883-884, 33-49.
- Adaway, J.E., Keevil, B.G. & Owen, L.J. (2015) Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Ann Clin Biochem*, 52, 18-38.
- Ahmad Dar, A., Sangwan, P.L. & Kumar, A. (2020) Chromatography: An important tool for drug discovery. *Journal of separation science*, 43, 105-119.
- Akiguchi, I., Pallas, M., Budka, H., Akiyama, H., Ueno, M., Han, J., Yagi, H., Nishikawa, T., Chiba, Y., Sugiyama, H., Takahashi, R., Unno, K., Higuchi, K. & Hosokawa, M. (2017) SAMP8 mice as a neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology*, 37, 293-305.
- Al-Talla, Z.A. & Tolley, L.T. (2005) Analysis of vitamin E derivatives in serum using coordinated ion spray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 2337-2342.
- Alonso, I.S., Ruiz, S.G., Quintanilla, D.P. & Zarcero, S.M. (2009) Análisis instrumental. *Netbiblo*.
- Anton, B., Vitetta, L., Cortizo, F. & Sali, A. (2005) Can we delay aging? The biology and science of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 525-535.
- Anwar, K., Iqbal, J. & Hussain, M.M. (2007) Mechanisms involved in vitamin E transport by primary enterocytes and in vivo absorption. *J Lipid Res*, 48, 2028-2038.
- Araujo, P., Bjorkkjaer, T., Froyland, L. & Waagbo, R. (2018) Effect of storage time, temperature, antioxidant and thawing on fatty acid composition of plasma, serum and red blood cells - A pilot biobank study. *Clin Biochem*, 52, 94-105.
- Arzi, A., Hemmati, A.A. & Razian, A. (2004) Effect of vitamins C and E on cognitive function in mouse. *Pharmacol Res*, 49, 249-252.
- Ashor, A.W., Siervo, M., Lara, J., Oggioni, C., Afshar, S. & Mathers, J.C. (2015) Effect of vitamin C and vitamin E supplementation on endothelial function: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Nutr*, 113, 1182-1194.

- Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., García, M.d.l.A., Reinicke, K., Rodríguez, F., Vera, J.C., Millán, C., Ulloa, V., Low, M., Martínez, F. & Nualart, F. (2005) Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 79, 146-156.
- Azzi, A. (2018) Many tocopherols, one vitamin E. *Mol Aspects Med*, 61, 92-103.
- Azzi, A. (2019) Tocopherols, tocotrienols and tocomonoenols: Many similar molecules but only one vitamin E. *Redox Biol*, 26, 101259.
- Baghdady, Y.Z. & Schug, K.A. (2016) Review of in situ derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of separation science*, 39, 102-114.
- Bakre, S.M., Gadmale, D.K., Toche, R.B. & Gaikwad, V.B. (2014) Rapid determination of alpha tocopherol in olive oil adulterated with sunflower oil by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 3093-3098.
- Balasubramanian, P., Howell, P.R. & Anderson, R.M. (2017) Aging and Caloric Restriction Research: A Biological Perspective With Translational Potential. *EBioMedicine*, 21, 37-44.
- Balazs, Z., Panzenboeck, U., Hammer, A., Sovic, A., Quehenberger, O., Malle, E. & Sattler, W. (2004) Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem*, 89, 939-950.
- Banks, R., Speakman, J.R. & Selman, C. (2010) Vitamin E supplementation and mammalian lifespan. *Mol Nutr Food Res*, 54, 719-725.
- Bao, Q., Pan, J., Qi, H., Wang, L., Qian, H., Jiang, F., Shao, Z., Xu, F., Tao, Z., Ma, Q., Nelson, P. & Hu, X. (2014) Aging and age-related diseases--from endocrine therapy to target therapy. *Mol Cell Endocrinol*, 394, 115-118.
- Bardowell, S.A., Ding, X. & Parker, R.S. (2012) Disruption of P450-mediated vitamin E hydroxylase activities alters vitamin E status in tocopherol supplemented mice and reveals extra-hepatic vitamin E metabolism. *J Lipid Res*, 53, 2667-2676.
- Baxter, L.L., Marugan, J.J., Xiao, J., Incao, A., McKew, J.C., Zheng, W. & Pavan, W.J. (2012) Plasma and tissue concentrations of alpha-tocopherol and delta-tocopherol following high dose dietary supplementation in mice. *Nutrients*, 4, 467-490.
- Bayram, B., Nikolai, S., Huebbe, P., Ozcelik, B., Grimm, S., Grune, T., Frank, J. & Rimbach, G. (2013) Biomarkers of oxidative stress, antioxidant defence and inflammation are altered in the senescence-accelerated mouse prone 8. *Age (Dordr)*, 35, 1205-1217.

- Berger, U.V. & Hediger, M.A. (2000) The vitamin C transporter SVCT2 is expressed by astrocytes in culture but not in situ. *NeuroReport*, 11, 1395-1399.
- Berger, U.V., Lu, X.C., Liu, W., Tang, Z., Slusher, B.S. & Hediger, M.A. (2003) Effect of middle cerebral artery occlusion on mRNA expression for the sodium-coupled vitamin C transporter SVCT2 in rat brain. *J Neurochem*, 86, 896-906.
- Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.-C. & Reynaud, C.-A. (2003) Immunoglobulin κ Light Chain Gene Rearrangement Is Impaired in Mice Deficient for DNA Polymerase μ . *Immunity*, 19, 203-211.
- Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.-C., Landreau, C., Weill, J.-C. & Reynaud, C.-A. (2002) Cutting Edge: DNA Polymerases μ and λ Are Dispensable for Ig Gene Hypermutation. *The Journal of Immunology*, 168, 3702-3706.
- Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.C. & Reynaud, C.A. (2006) Nonoverlapping functions of DNA polymerases μ , λ , and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, 25, 31-41.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.
- Birringer, M. & Lorkowski, S. (2019) Vitamin E: Regulatory role of metabolites. *IUBMB Life*, 71, 479-486.
- Blatt, D.H., Leonard, S.W. & Traber, M.G. (2001) Vitamin e kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. *Nutrition*, 17, 799-805.
- Blatt, D.H., Pryor, W.A., Mata, J.E. & Rodriguez-Proteau, R. (2004) Re-evaluation of the relative potency of synthetic and natural alpha-tocopherol: experimental and clinical observations. *J Nutr Biochem*, 15, 380-395.
- Bolon, B., Butt, M.T., Garman, R.H. & Dorman, D.C. (2013) Nervous System Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, pp. 2005-2093.
- Boothby, L.A. & Doering, P.L. (2005) Vitamin C and vitamin E for Alzheimer's disease. *Ann Pharmacother*, 39, 2073-2080.
- Borel, P., Pasquier, B., Armand, M., Tyssandier, V., Grolier, P., Alexandre-Gouabau, M.C., Andre, M., Senft, M., Peyrot, J., Jaussan, V., Lairon, D. & Azais-Braesco, V. (2001) Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, G95-G103.
- Borel, P., Preveraud, D. & Desmarchelier, C. (2013) Bioavailability of vitamin E in humans: an update. *Nutr Rev*, 71, 319-331.

- Bowman, B.A.B., Russell, R.M. & Foundation, I.L.S.I.-N. (2001) Present Knowledge in Nutrition. ILSI Press, International Life Sciences Institute.
- Boyanton, B.L., Jr. & Blick, K.E. (2002) Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem*, 48, 2242-2247.
- Brady, S., Siegel, G., Albers, R.W. & Price, D. (2005) Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Elsevier.
- Brigelius-Flohe, R. (2006) Bioactivity of vitamin E. *Nutr Res Rev*, 19, 174-186.
- Brigelius-Flohe, R. (2009) Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. *Free Radic Biol Med*, 46, 543-554.
- Brown, R.E. (2016) Hebb and Cattell: The Genesis of the Theory of Fluid and Crystallized Intelligence. *Front Hum Neurosci*, 10, 606.
- Bruno, R.S., Leonard, S.W., Park, S.I., Zhao, Y. & Traber, M.G. (2006) Human vitamin E requirements assessed with the use of apples fortified with deuterium-labeled alpha-tocopheryl acetate. *Am J Clin Nutr*, 83, 299-304.
- Burton, G.J. & Jauniaux, E. (2011) Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25, 287-299.
- Butterfield, D.A., Koppal, T., Howard, B., Subramaniam, R., Hall, N., Hensley, K., Yatin, S., Allen, K., Aksenov, M., Aksenova, M. & Carney, J. (1998) Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci*, 854, 448-462.
- Camandola, S. & Mattson, M.P. (2017) Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J*, 36, 1474-1492.
- Cardelli, M. (2018) The epigenetic alterations of endogenous retroelements in aging. *Mechanisms of ageing and development*, 174, 30-46.
- Carmona, J.J. & Michan, S. (2016) Biology of Healthy Aging and Longevity. *Rev Invest Clin*, 68, 7-16.
- Carr, A.C. & Maggini, S. (2017) Vitamin C and Immune Function. *Nutrients*, 9.
- Castillo-Garzon, M.J., Ruiz, J.R., Ortega, F.B. & Gutierrez, A. (2006) Anti-aging therapy through fitness enhancement. *Clin Interv Aging*, 1, 213-220.
- Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Vasquez, O., Aguayo, L.G. & Nualart, F. (2001) High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem*, 78, 815-823.

- Cavins, J.F. & Inglett, G.E. (1974) High-resolution liquid chromatography of vitamin E isomers. *Cereal chemistry*, 1974 v.51 no.5, pp. 605-600.
- Cebada-Sanchez, S., Insausti, R., Gonzalez-Fuentes, J., Arroyo-Jimenez, M.M., Rivas-Infante, E., Lagartos, M.J., Martinez-Ruiz, J., Lozano, G. & Marcos, P. (2014) Distribution of peptidergic populations in the human dentate gyrus (somatostatin [SOM-28, SOM-12] and neuropeptide Y [NPY]) during postnatal development. *Cell and tissue research*, 358, 25-41.
- Cecchini, T., Ciaroni, S., Ferri, P., Ambrogini, P., Cuppini, R., Santi, S. & Del Grande, P. (2003) Alpha-tocopherol, an exogenous factor of adult hippocampal neurogenesis regulation. *J Neurosci Res*, 73, 447-455.
- Cefalu, C.A. (2011) Theories and mechanisms of aging. *Clin Geriatr Med*, 27, 491-506.
- Chaloner-Larsson, G., Anderson, R., Egan, A., Costa Filho, F., Gomez Herrera, J.F. & Organization, W.H. (1998) Guía de la OMS sobre los requisitos de las prácticas adecuadas de fabricación (PAF). Ginebra: Organización Mundial de la Salud.
- Chayot, R., Danckaert, A., Montagne, B. & Ricchetti, M. (2010) Lack of DNA polymerase mu affects the kinetics of DNA double-strand break repair and impacts on cellular senescence. *DNA Repair (Amst)*, 9, 1187-1199.
- Chen, W., Shi, Y., Qi, S., Zhou, H., Li, C., Jin, D. & Li, G. (2019) Pharmacokinetic Study and Tissue Distribution of Lorlatinib in Mouse Serum and Tissue Samples by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Methods Chem*, 2019, 7574369.
- Chen, W.H., Li, Y.J., Wang, M.S., Kang, Z.C., Huang, H.L. & Shaw, H.M. (2012) Elevation of tissue alpha-tocopherol levels by conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice is not associated with changes in vitamin E absorption or alpha-carboxyethyl hydroxychroman production. *Nutrition*, 28, 59-66.
- Cheng, J., Rui, Y., Qin, L., Xu, J., Han, S., Yuan, L., Yin, X. & Wan, Z. (2017) Vitamin D Combined with Resveratrol Prevents Cognitive Decline in SAMP8 Mice. *Curr Alzheimer Res*, 14, 820-833.
- Cheon, S.Y., Kim, H., Rubinsztein, D.C. & Lee, J.E. (2019) Autophagy, Cellular Aging and Age-related Human Diseases. *Exp Neurobiol*, 28, 643-657.
- Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R. & Vaupel, J.W. (2009) Ageing populations: the challenges ahead. *The Lancet*, 374, 1196-1208.
- Cimadevilla, H.M., Hevia, D., Miar, A., Mayo, J.C., Lombo, F. & Sainz, R.M. (2015) Development and validation of a single HPLC method for determination of alpha-tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomed Chromatogr*, 29, 843-852.

- Clarke, M.W., Burnett, J.R. & Croft, K.D. (2008) Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 45, 417-450.
- Cohen, J. & Torres, C. (2019) Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging Cell*, 18, e12937.
- Colombo, M.L. (2010) An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*, 15, 2103-2113.
- Copp, R.P., Wisniewski, T., Hentati, F., Larnaout, A., Ben Hamida, M. & Kayden, H.J. (1999) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain Res*, 822, 80-87.
- Corpe, C.P., Tu, H., Eck, P., Wang, J., Faulhaber-Walter, R., Schnermann, J., Margolis, S., Padayatty, S., Sun, H., Wang, Y., Nussbaum, R.L., Espey, M.G. & Levine, M. (2010) Vitamin C transporter Slc23a1 links renal reabsorption, vitamin C tissue accumulation, and perinatal survival in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 1069-1083.
- Covenas, R., Gonzalez-Fuentes, J., Rivas-Infante, E., Lagartos-Donate, M.J., Mangas, A., Geffard, M., Arroyo-Jimenez, M.M., Cebada-Sanchez, S., Insausti, R. & Marcos, P. (2015) Developmental study of vitamin C distribution in children's brainstems by immunohistochemistry. *Ann Anat*, 201, 65-78.
- Coveñas, R., Mangas, A., Bodet, D., Duleu, S., Marcos, P. & Geffard, M. (2011) Vitamin C in the monkey brain.
- Cristofalo, V.J., Gerhard, G.S. & Pignolo, R.J. (1994) Molecular Biology of Aging. *Surgical Clinics of North America*, 74, 1-21.
- da Costa, J.P., Vitorino, R., Silva, G.M., Vogel, C., Duarte, A.C. & Rocha-Santos, T. (2016) A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Res Rev*, 29, 90-112.
- de Hoffmann, E. (2005) Mass Spectrometry Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- de Hoffmann, E. & Stroobant, V. (2013) Mass Spectrometry: Principles and Applications. Wiley.
- de Marina Bayo, A.G., Marco, D.J.Y. & e-libro, C. (2016) HPLC instrumental. Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.
- De Nicolo, A., Cantu, M. & D'Avolio, A. (2017) Matrix effect management in liquid chromatography mass spectrometry: the internal standard normalized matrix effect. *Bioanalysis*, 9, 1093-1105.

- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G. & Cecchelli, R. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol*, 138, 877-889.
- Delanty, N. & Dichter, M.A. (2000) Antioxidant Therapy in Neurologic Disease. *Archives of Neurology*, 57.
- Dionisi, F., Prodoliet, J. & Tagliaferri, E. (1995) Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high-performance liquid chromatography/amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1505-1511.
- Doerge, D.R., Twaddle, N.C., Banks, E.P., Jefferson, W.N. & Newbold, R.R. (2002) Pharmacokinetic analysis in serum of genistein administered subcutaneously to neonatal mice. *Cancer Lett*, 184, 21-27.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D. & Alice, M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *The Journal of Chemical Physics*, 49, 2240-2249.
- Dolu, N., Khan, A. & Dokutan, S. (2015) Effect of Vitamin E Administration on Learning of the Young Male Rats. *J Exp Neurosci*, 9, 81-85.
- Dominguez, O., Ruiz, J.F., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Gonzalez, M.A., Kirchhoff, T., Martinez, A.C., Bernad, A. & Blanco, L. (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *EMBO J*, 19, 1731-1742.
- Dong, Y., Guo, C.R., Chen, D., Chen, S.M., Peng, Y., Song, H. & Shi, J.R. (2018) Association between age-related hearing loss and cognitive decline in C57BL/6J mice. *Mol Med Rep*, 18, 1726-1732.
- Dores-Sousa, J.L., De Vos, J. & Eeltink, S. (2019) Resolving power in liquid chromatography: A trade-off between efficiency and analysis time. *Journal of separation science*, 42, 38-50.
- Dufourd, T., Robil, N., Mallet, D., Carcenac, C., Boulet, S., Brishoual, S., Rabois, E., Houeto, J.L., de la Grange, P. & Carnicella, S. (2019) Plasma or serum? A qualitative study on rodents and humans using high-throughput microRNA sequencing for circulating biomarkers. *Biol Methods Protoc*, 4, bpz006.
- Duhem, N., Danhier, F. & Preat, V. (2014) Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*, 182, 33-44.
- Eckert, M.A. (2011) Slowing down: age-related neurobiological predictors of processing speed. *Front Neurosci*, 5, 25.
- Effros, R.B. (2005) Roy Walford and the immunologic theory of aging. *Immun Ageing*, 2, 7.

- Eitenmiller, R.R. & Lee, J. (2004) Vitamin E: food chemistry, composition, and analysis. CRC Press.
- Epler, K.S., Ziegler, R.G. & Craft, N.E. (1993) Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 619, 37-48.
- Erickson, C. (2003) The neurobiology of memory changes in normal aging. *Experimental gerontology*, 38, 61-69.
- Erö, C., Gewaltig, M.-O., Keller, D. & Markram, H. (2018) A Cell Atlas for the Mouse Brain. *Frontiers in Neuroinformatics*, 12.
- Escudero, B., Lucas, D., Albo, C., Dhup, S., Bacher, J.W., Sanchez-Munoz, A., Fernandez, M., Rivera-Torres, J., Carmona, R.M., Fuster, E., Carreiro, C., Bernad, R., Gonzalez, M.A., Andres, V., Blanco, L., Roche, E., Fabregat, I., Samper, E. & Bernad, A. (2014) Polmu deficiency increases resistance to oxidative damage and delays liver aging. *PLoS One*, 9, e93074.
- Esteki, M., Shahsavari, Z. & Simal-Gandara, J. (2019) Food identification by high performance liquid chromatography fingerprinting and mathematical processing. *Food Res Int*, 122, 303-317.
- Evans, H.M. & Bishop, K.S. (1922) On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction. *Science*, 56, 650-651.
- Evans, H.M., Emerson, O.H. & Emerson, G.A. (1974) The isolation from wheat germ oil of an alcohol, alpha-tocopherol, having the properties of vitamin E. *Nutr Rev*, 32, 80-82.
- Failla, G. (1958) The aging process and cancerogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 71, 1124-1140.
- Fanali, G., Fasano, M., Ascenzi, P., Zingg, J.M. & Azzi, A. (2013) alpha-Tocopherol binding to human serum albumin. *Biofactors*, 39, 294-303.
- Feridooni, H.A., Kane, A.E., Ayaz, O., Boroumandi, A., Polidovitch, N., Tsushima, R.G., Rose, R.A. & Howlett, S.E. (2017) The impact of age and frailty on ventricular structure and function in C57BL/6J mice. *J Physiol*, 595, 3721-3742.
- Ferri, P., Angelino, D., Gennari, L., Benedetti, S., Ambrogini, P., Del Grande, P. & Ninfali, P. (2015) Enhancement of flavonoid ability to cross the blood-brain barrier of rats by co-administration with alpha-tocopherol. *Food Funct*, 6, 394-400.
- Festing, M.F. (1979) Properties of inbred strains and outbred stocks, with special reference to toxicity testing. *J Toxicol Environ Health*, 5, 53-68.

- Figuerola-Mendez, R. & Rivas-Arancibia, S. (2015) Vitamin C in Health and Disease: Its Role in the Metabolism of Cells and Redox State in the Brain. *Front Physiol*, 6, 397.
- Finno, C.J. & Valberg, S.J. (2012) A comparative review of vitamin E and associated equine disorders. *J Vet Intern Med*, 26, 1251-1266.
- Flood, J.F. & Morley, J.E. (1992) Early onset of age-related impairment of aversive and appetitive learning in the SAM-P/8 mouse. *J Gerontol*, 47, B52-59.
- Franklin, K.B. & Paxinos, G. (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates.
- Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O. & Van Veldhoven, P.P. (2013) Aging, age-related diseases and peroxisomes. *Subcell Biochem*, 69, 45-65.
- Gabani, B.B., Sulochana, S.P., Siddesh, A.H.A., Kiran, V., Saini, N.K., Samanta, S.K., Hallur, M.S., Rajagopal, S. & Mullangi, R. (2020) Validated LC-MS/MS Method for Simultaneous Quantitation of SAFit-1 and SAFit-2 in Mice Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *Drug Res (Stuttg)*.
- Gabor, F., Fillafer, C., Neutsch, L., Ratzinger, G. & Wirth, M. (2010) Improving oral delivery. *Handb Exp Pharmacol*, 345-398.
- Galkin, F., Zhang, B., Dmitriev, S.E. & Gladyshev, V.N. (2019) Reversibility of irreversible aging. *Ageing Res Rev*, 49, 104-114.
- Galli, F., Azzi, A., Birringer, M., Cook-Mills, J.M., Eggersdorfer, M., Frank, J., Cruciani, G., Lorkowski, S. & Ozer, N.K. (2017) Vitamin E: Emerging aspects and new directions. *Free Radic Biol Med*, 102, 16-36.
- Galli, F., Cristina Polidori, M., Stahl, W., Mecocci, P. & Kelly, F.J. (2007) Vitamin E Biotransformation in Humans Vitamin E, pp. 263-280.
- Ganta, S., Deshpande, D., Korde, A. & Amiji, M. (2010) A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Mol Membr Biol*, 27, 260-273.
- 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.
- Garcia-Matas, S., Gutierrez-Cuesta, J., Coto-Montes, A., Rubio-Acero, R., Diez-Vives, C., Camins, A., Pallas, M., Sanfeliu, C. & Cristofol, R. (2008) Dysfunction of astrocytes in senescence-accelerated mice SAMP8 reduces their neuroprotective capacity. *Aging Cell*, 7, 630-640.

- Garcia Mde, L., Salazar, K., Millan, C., Rodriguez, F., Montecinos, H., Caprile, T., Silva, C., Cortes, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Aguayo, L.G., Olate, J., Molina, B. & Nualart, F. (2005) Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia*, 50, 32-47.
- Garrido-Maraver, J., Cordero, M.D., Oropesa-Ávila, M., Fernández Vega, A., de la Mata, M., Delgado Pavón, A., de Miguel, M., Pérez Calero, C., Villanueva Paz, M., Cotán, D. & Sánchez-Alcázar, J.A. (2014) Coenzyme Q₁₀ Therapy. *Molecular Syndromology*, 5, 187-197.
- Georgousopoulou, E.N., Panagiotakos, D.B., Mellor, D.D. & Naumovski, N. (2017) Tocotrienols, health and ageing: A systematic review. *Maturitas*, 95, 55-60.
- Ghosh, S., Ghosh, S. & Sil, P.C. (2019) Role of nanostructures in improvising oral medicine. *Toxicol Rep*, 6, 358-368.
- Gibaldi, M., Lee, M., Desai, A. & Pharmacists, A.S.o.H.-S. (2007) Gibaldi's Drug Delivery Systems in Pharmaceutical Care. American Society of Health-System Pharmacists.
- Gillberg, L., Orskov, A.D., Liu, M., Harslof, L.B.S., Jones, P.A. & Gronbaek, K. (2018) Vitamin C - A new player in regulation of the cancer epigenome. *Semin Cancer Biol*, 51, 59-67.
- Glish, G.L. & Vachet, R.W. (2003) The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 140-150.
- Gohil, K., Godzdzank, R., O'Roark, E., Schock, B.C., Kaini, R.R., Packer, L., Cross, C.E. & Traber, M.G. (2004) Alpha-tocopherol transfer protein deficiency in mice causes multi-organ deregulation of gene networks and behavioral deficits with age. *Ann N Y Acad Sci*, 1031, 109-126.
- Gohil, K., Schock, B.C., Chakraborty, A.A., Terasawa, Y., Raber, J., Farese, R.V., Jr., Packer, L., Cross, C.E. & Traber, M.G. (2003) Gene expression profile of oxidant stress and neurodegeneration in transgenic mice deficient in alpha-tocopherol transfer protein. *Free Radic Biol Med*, 35, 1343-1354.
- Gómez, D.G. (2010) FLUJOS CON SUPERFICIES LIBRES. ELECTROSPRAY Y GENERACION DE BURBUJAS. Universidad Politécnica de Madrid.
- Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Niot, I. & Reboul, E. (2014) Cluster-determinant 36 (CD36) impacts on vitamin E postprandial response. *Mol Nutr Food Res*, 58, 2297-2306.
- Gong, Y., Wu, Y., Zheng, C., Fan, L., Xiong, F. & Zhu, J. (2012) An excellent delivery system for improving the oral bioavailability of natural vitamin E in rats. *AAPS PharmSciTech*, 13, 961-966.

- Gonzalez-Fuentes, J., Selva, J., Moya, C., Castro-Vazquez, L., Lozano, M.V., Marcos, P., Plaza-Oliver, M., Rodriguez-Robledo, V., Santander-Ortega, M.J., Villaseca-Gonzalez, N. & Arroyo-Jimenez, M.M. (2018) Neuroprotective Natural Molecules, From Food to Brain. *Front Neurosci*, 12, 721.
- Goti, D., Balazs, Z., Panzenboeck, U., Hrzenjak, A., Reicher, H., Wagner, E., Zechner, R., Malle, E. & Sattler, W. (2002) Effects of lipoprotein lipase on uptake and transcytosis of low density lipoprotein (LDL) and LDL-associated alpha-tocopherol in a porcine in vitro blood-brain barrier model. *J Biol Chem*, 277, 28537-28544.
- Goti, D., Hammer, A., Galla, H.J., Malle, E. & Sattler, W. (2000) Uptake of lipoprotein-associated alpha-tocopherol by primary porcine brain capillary endothelial cells. *J Neurochem*, 74, 1374-1383.
- Goti, D., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Frank, S., van der Westhuyzen, D.R., Malle, E. & Sattler, W. (2001) Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J Neurochem*, 76, 498-508.
- Goto, S. (2015) The Biological Mechanisms of Aging: A Historical and Critical Overview *Aging Mechanisms*, pp. 3-27.
- Grady, C.L., Maisog, J.M., Horwitz, B., Ungerleider, L.G., Mentis, M.J., Salerno, J.A., Pietrini, P., Wagner, E. & Haxby, J.V. (1994) Age-related changes in cortical blood flow activation during visual processing of faces and location. *J Neurosci*, 14, 1450-1462.
- Granger, M. & Eck, P. (2018) Dietary Vitamin C in Human Health. *Adv Food Nutr Res*, 83, 281-310.
- Gross, J.H. (2017) *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer International Publishing.
- Groten, J., Venkatraman, A. & Mertelsmann, R. (2018) Modeling and Simulating Carcinogenesis *Precision Medicine*, pp. 277-295.
- Hacquebard, M. & Carpentier, Y.A. (2005) Vitamin E: absorption, plasma transport and cell uptake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 8, 133-138.
- Haddad, M. & Sharma, S. (2020) *Physiology, Lung StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Hadley, E.C., Lakatta, E.G., Morrison-Bogorad, M., Warner, H.R. & Hodes, R.J. (2005) The future of aging therapies. *Cell*, 120, 557-567.
- Hao, Z., Parker, B., Knapp, M. & Yu, L. (2005) Simultaneous quantification of α -tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094, 83-90.

- Harada, C.N., Natelson Love, M.C. & Triebel, K.L. (2013) Normal cognitive aging. *Clin Geriatr Med*, 29, 737-752.
- Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345, 458-460.
- Harman, D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300.
- Harris, D.C. (2018) *Análisis químico cuantitativo*. Reverte.
- Harrison, F.E. (2012) A critical review of vitamin C for the prevention of age-related cognitive decline and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 29, 711-726.
- Harrison, F.E., Bowman, G.L. & Polidori, M.C. (2014) Ascorbic acid and the brain: rationale for the use against cognitive decline. *Nutrients*, 6, 1752-1781.
- Harrison, F.E., Green, R.J., Dawes, S.M. & May, J.M. (2010) Vitamin C distribution and retention in the mouse brain. *Brain Res*, 1348, 181-186.
- Harrison, F.E. & May, J.M. (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med*, 46, 719-730.
- Hart, R.W. & Setlow, R.B. (1974) Correlation Between Deoxyribonucleic Acid Excision-Repair and Life-Span in a Number of Mammalian Species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, 2169-2173.
- Hatanaka, J., Chikamori, H., Sato, H., Uchida, S., Debari, K., Onoue, S. & Yamada, S. (2010) Physicochemical and pharmacological characterization of alpha-tocopherol-loaded nano-emulsion system. *International journal of pharmaceutics*, 396, 188-193.
- Hathcock, J.N., Azzi, A., Blumberg, J., Bray, T., Dickinson, A., Frei, B., Jialal, I., Johnston, C.S., Kelly, F.J., Kraemer, K., Packer, L., Parthasarathy, S., Sies, H. & Traber, M.G. (2005) Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *Am J Clin Nutr*, 81, 736-745.
- Hayek, M.G., Taylor, S.F., Bender, B.S., Han, S.N., Meydani, M., Smith, D.E., Eghtesada, S. & Meydani, S.N. (1997) Vitamin E supplementation decreases lung virus titers in mice infected with influenza. *J Infect Dis*, 176, 273-276.
- Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614-636.
- Hensley, K., Benaksas, E.J., Bolli, R., Comp, P., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q.N., Stoddard, M.F., Wallis, G., Williamson, K.S., West, M., Wechter, W.J. & Floyd, R.A. (2004) New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and

- carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*, 36, 1-15.
- Herranz, N. & Gil, J. (2018) Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*, 128, 1238-1246.
- Heudi, O., Trisconi, M.-J. & Blake, C.-J. (2004) Simultaneous quantification of Vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1022, 115-123.
- Himmelsbach, M. (2012) 10 years of MS instrumental developments--impact on LC-MS/MS in clinical chemistry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 883-884, 3-17.
- Hinchliffe, E., Rudge, J. & Reed, P. (2016) A novel high-throughput method for supported liquid extraction of retinol and alpha-tocopherol from human serum and simultaneous quantitation by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*, 53, 434-445.
- Hosomi, A., Goto, K., Kondo, H., Iwatsubo, T., Yokota, T., Ogawa, M., Arita, M., Aoki, J., Arai, H. & Inoue, K. (1998) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci Lett*, 256, 159-162.
- Hsu, C.Y., Wang, P.W., Alalaiwe, A., Lin, Z.C. & Fang, J.Y. (2019) Use of Lipid Nanocarriers to Improve Oral Delivery of Vitamins. *Nutrients*, 11.
- Huang, Y., Mu, J., Qi, L., Ge, W., Fang, X., Song, Y., Yuan, Y. & Zheng, S. (2020) Diverse fragment lengths dismiss size selection for serum cell-free DNA: a comparative study of serum and plasma samples. *Clin Chem Lab Med*.
- Igarashi, O., Yonekawa, Y. & Fujiyama-Fujihara, Y. (1991) Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 37, 359-369.
- Iribarne, J.V. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *The Journal of Chemical Physics*, 64.
- Ito, K. (2013) Frontiers of model animals for neuroscience: two prosperous aging model animals for promoting neuroscience research. *Exp Anim*, 62, 275-280.
- Jafari, S.M. & McClements, D.J. (2018) *Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization*. Elsevier Science.
- Jain, K.K. (2008) Drug delivery systems - an overview. *Methods Mol Biol*, 437, 1-50.
- Jaiswal, M., Dudhe, R. & Sharma, P.K. (2015) Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, 5, 123-127.

- Jeanes, Y.M., Hall, W.L., Ellard, S., Lee, E. & Lodge, J.K. (2004) The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *Br J Nutr*, 92, 575-579.
- Jensen, S.K. & Lauridsen, C. (2007) α -Tocopherol Stereoisomers Vitamin E, pp. 281-308.
- Jerkovic, L., Voegelé, A.F., Chwatal, S., Kronenberg, F., Radcliffe, C.M., Wormald, M.R., Lobentanz, E.M., Ezeh, B., Eller, P., Dejori, N., Dieplinger, B., Lottspeich, F., Sattler, W., Uhr, M., Mechtler, K., Dwek, R.A., Rudd, P.M., Baier, G. & Dieplinger, H. (2005) Afamin is a novel human vitamin E-binding glycoprotein characterization and in vitro expression. *J Proteome Res*, 4, 889-899.
- Jiang, Q. (2014) Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic Biol Med*, 72, 76-90.
- Jiang, Q. (2019) Natural forms of vitamin E and metabolites-regulation of cancer cell death and underlying mechanisms. *IUBMB Life*, 71, 495-506.
- Jin, G., Horinouchi, R., Sagawa, T., Orimo, N., Kubo, H., Yoshimura, S., Fujisawa, A., Kashiba, M. & Yamamoto, Y. (2008) Coenzyme Q10-Binding/Transfer Protein Saposin B also Binds gamma-Tocopherol. *J Clin Biochem Nutr*, 43, 95-100.
- Johnson, E.J., Vishwanathan, R., Johnson, M.A., Hausman, D.B., Davey, A., Scott, T.M., Green, R.C., Miller, L.S., Gearing, M., Woodard, J., Nelson, P.T., Chung, H.Y., Schalch, W., Wittwer, J. & Poon, L.W. (2013) Relationship between Serum and Brain Carotenoids, alpha-Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. *J Aging Res*, 2013, 951786.
- Johnson, F.B., Sinclair, D.A. & Guarente, L. (1999) *Molecular Biology of Aging*. Cell, 96, 291-302.
- Kaempf-Rotzoll, D.E., Traber, M.G. & Arai, H. (2003) Vitamin E and transfer proteins. *Curr Opin Lipidol*, 14, 249-254.
- Kalra, A. & Tuma, F. (2020) *Physiology, Liver StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Kappus, H. (1992) Tolerance and safety of vitamin E: A toxicological position report. *Free Radical Biology and Medicine*, 13, 55-74.
- Karazniewicz-Lada, M., Glowka, A., Komosa, A., Kruszyna, L., Graczyk-Szuster, A., Lesiak, M., Sowinska, D. & Przyslawski, J. (2018) Analysis of retinol, alpha-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in plasma of patients with cardiovascular disease by HPLC-MS/MS method. *Biomed Chromatogr*, e4278.

- Karaźniewicz-Łada, M., Głównka, A., Komosa, A., Kruszyna, Ł., Graczyk-Szuster, A., Lesiak, M., Sowińska, D. & Przysławski, J. (2018) Analysis of retinol, α -tocopherol, 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in plasma of patients with cardiovascular disease by HPLC-MS/MS method. *Biomedical Chromatography*, 32.
- Kayden, H.J. & Traber, M.G. (1993) Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*, 34, 343-358.
- Kebarle, P. & Verkerk, U.H. (2009) Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev*, 28, 898-917.
- Khadangi, F. & Azzi, A. (2019) Vitamin E - The Next 100 Years. *IUBMB Life*, 71, 411-415.
- Khalife, R., Grieco, A., Khamisa, K., Tinmouh, A., McCudden, C. & Saidenberg, E. (2019) Scurvy, an old story in a new time: The hematologist's experience. *Blood Cells Mol Dis*, 76, 40-44.
- Khamis, M.M., Adamko, D.J. & El-Aneed, A. (2019) Strategies and Challenges in Method Development and Validation for the Absolute Quantification of Endogenous Biomarker Metabolites Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev*.
- Kim, J.-S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M.R. & Yokomori, K.J.T.J.o.c.b. (2005) Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *170*, 341-347.
- Kiyose, C., Saito, K., Yachi, R., Muto, C. & Igarashi, O. (2015) Changes in the concentrations of vitamin E analogs and their metabolites in rat liver and kidney after oral administration. *J Clin Biochem Nutr*, 56, 143-148.
- Kocot, J., Luchowska-Kocot, D., Kielczykowska, M., Musik, I. & Kurzepa, J. (2017) Does Vitamin C Influence Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders? *Nutrients*, 9.
- Koks, S., Dogan, S., Tuna, B.G., Gonzalez-Navarro, H., Potter, P. & Vandenbroucke, R.E. (2016) Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mechanisms of ageing and development*, 160, 41-53.
- Korcok, J., Yan, R., Siushansian, R., Dixon, S.J. & Wilson, J.X. (2000) Sodium-ascorbate cotransport controls intracellular ascorbate concentration in primary astrocyte cultures expressing the SVCT2 transporter. *Brain Research*, 881, 144-151.
- Kramer, J.K.G., Blais, L., Fouchard, R.C., Melnyk, R.A. & Kallury, K.M.R. (1997) A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by high-performance liquid chromatography using a normal-phase diol column. *Lipids*, 32, 323-330.

- Kratzer, I., Bernhart, E., Wintersperger, A., Hammer, A., Walzl, S., Malle, E., Sperk, G., Wietzorrek, G., Dieplinger, H. & Sattler, W. (2009) Afamin is synthesized by cerebrovascular endothelial cells and mediates alpha-tocopherol transport across an in vitro model of the blood-brain barrier. *J Neurochem*, 108, 707-718.
- Krcmova, L., Urbanek, L., Solichova, D., Kasparova, M., Vlckova, H., Melichar, B., Sobotka, L. & Solich, P. (2009) HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *Journal of separation science*, 32, 2804-2811.
- Kruger, I. (2004) Enhanced fidelity for rejoining radiation-induced DNA double-strand breaks in the G2 phase of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*, 32, 2677-2684.
- Kubasik, N.P. & Sine, H.E. (1978) Results for serum and plasma compared in 15 selected radioassays. *Clin Chem*, 24, 137-139.
- Kucerova, B., Krcmova, L., Solichova, D., Plisek, J. & Solich, P. (2013) Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of separation science*, 36, 2223-2230.
- Kumar, M., Bishnoi, R.S., Shukla, A.K. & Jain, C.P. (2019) Techniques for Formulation of Nanoemulsion Drug Delivery System: A Review. *Prev Nutr Food Sci*, 24, 225-234.
- La Fata, G., van Vliet, N., Barnhoorn, S., Brandt, R.M.C., Etheve, S., Chenal, E., Grunenwald, C., Seifert, N., Weber, P., Hoeijmakers, J.H.J., Mohajeri, M.H. & Vermeij, W.P. (2017) Vitamin E Supplementation Reduces Cellular Loss in the Brain of a Premature Aging Mouse Model. *J Prev Alzheimers Dis*, 4, 226-235.
- Ladenson, J.H., Tsai, L.M., Michael, J.M., Kessler, G. & Joist, J.H. (1974) Serum versus heparinized plasma for eighteen common chemistry tests: is serum the appropriate specimen? *Am J Clin Pathol*, 62, 545-552.
- Lagartos, M.J. (2013) Cambios en las subpoblaciones de neuronas gabaérgicas del hipocampo en modelos murinos de envejecimiento prematuro (samp8) y envejecimiento retardado (pol u). Universidad de Castilla-La Mancha.
- Lambkin, I. & Pinilla, C. (2002) Targeting approaches to oral drug delivery. *Expert Opin Biol Ther*, 2, 67-73.
- Lane, C.A., Hardy, J. & Schott, J.M. (2018) Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 25, 59-70.

- Lanina, S.A., Toledo, P., Sampels, S., Kamal-Eldin, A. & Jastrebova, J.A. (2007) Comparison of reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 1157, 159-170.
- Lashkari, S., Krogh Jensen, S. & Bernes, G. (2019) Biodiscrimination of alpha-tocopherol stereoisomers in plasma and tissues of lambs fed different proportions of all-rac-alpha-tocopheryl acetate and RRR-alpha-tocopheryl acetate^{1,2}. *J Anim Sci*, 97, 1222-1233.
- Lauridsen, C., Leonard, S.W., Griffin, D.A., Liebler, D.C., McClure, T.D. & Traber, M.G. (2001) Quantitative analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples. *Analytical biochemistry*, 289, 89-95.
- Lee, P. & Ulatowski, L.M. (2019) Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life*, 71, 424-429.
- Lemaire-Ewing, S., Desrumaux, C., Neel, D. & Lagrost, L. (2010) Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: Is alpha-tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Mol Nutr Food Res*, 54, 631-640.
- Leonard, S.W., Terasawa, Y., Farese, R.V., Jr. & Traber, M.G. (2002) Incorporation of deuterated RRR- or all-rac-alpha-tocopherol in plasma and tissues of alpha-tocopherol transfer protein--null mice. *Am J Clin Nutr*, 75, 555-560.
- Leung, K.S. & Fong, B.M. (2014) LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem*, 406, 2289-2301.
- Li, G., Cheng, H., Zhang, X., Shang, X., Xie, H., Zhang, X., Yu, J. & Han, J. (2013) Hippocampal neuron loss is correlated with cognitive deficits in SAMP8 mice. *Neurol Sci*, 34, 963-969.
- Li, L., Zhong, S., Shen, X., Li, Q., Xu, W., Tao, Y. & Yin, H. (2019) Recent development on liquid chromatography-mass spectrometry analysis of oxidized lipids. *Free Radic Biol Med*, 144, 16-34.
- Li, X., Huang, J. & May, J.M. (2003) Ascorbic acid spares α -tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 656-661.
- Liang, Y. & Zhou, T. (2019) Recent advances of online coupling of sample preparation techniques with ultra high performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal of separation science*, 42, 226-242.
- Lieber, M.R. (2006) The polymerases for V(D)J recombination. *Immunity*, 25, 7-9.

- Lim, Y., Schock, B.C., Gohil, K., Leonard, S.W., Packer, L., Cross, C.E. & Traber, M.G. (2004) Gene-nutrient interactions exemplified by the alpha-tocopherol content of tissues from alpha-tocopherol transfer protein-null mice fed different dietary vitamin E concentrations. *Ann N Y Acad Sci*, 1031, 328-329.
- Lim, Y. & Traber, M.G. (2007) Alpha-Tocopherol Transfer Protein (alpha-TTP): Insights from Alpha-Tocopherol Transfer Protein Knockout Mice. *Nutr Res Pract*, 1, 247-253.
- Lipsky, M.S. & King, M. (2015) Biological theories of aging. *Dis Mon*, 61, 460-466.
- Liu, H., Yang, Y., Xia, Y., Zhu, W., Leak, R.K., Wei, Z., Wang, J. & Hu, X. (2017) Aging of cerebral white matter. *Ageing Res Rev*, 34, 64-76.
- Liu, L., Aa, J., Wang, G., Yan, B., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, C., Cao, B., Shi, J., Li, M., Zheng, T., Zheng, Y., Hao, G., Zhou, F., Sun, J. & Wu, Z. (2010) Differences in metabolite profile between blood plasma and serum. *Analytical biochemistry*, 406, 105-112.
- Lodge, J.K. (2005) Vitamin E bioavailability in humans. *J Plant Physiol*, 162, 790-796.
- Lodge, J.K., Hall, W.L., Jeanes, Y.M. & Proteggente, A.R. (2004) Physiological factors influencing vitamin E biokinetics. *Ann N Y Acad Sci*, 1031, 60-73.
- Logan, S., Owen, D., Chen, S., Chen, W.J., Ungvari, Z., Farley, J., Csiszar, A., Sharpe, A., Loos, M., Koopmans, B., Richardson, A. & Sonntag, W.E. (2018) Simultaneous assessment of cognitive function, circadian rhythm, and spontaneous activity in aging mice. *Geroscience*, 40, 123-137.
- Lucas, D., Delgado-Garcia, J.M., Escudero, B., Albo, C., Aza, A., Acin-Perez, R., Torres, Y., Moreno, P., Enriquez, J.A., Samper, E., Blanco, L., Fairen, A., Bernad, A. & Gruart, A. (2013) Increased learning and brain long-term potentiation in aged mice lacking DNA polymerase mu. *PLoS One*, 8, e53243.
- Lucas, D., Escudero, B., Ligos, J.M., Segovia, J.C., Estrada, J.C., Terrados, G., Blanco, L., Samper, E. & Bernad, A. (2009) Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair. *PLoS Genet*, 5, e1000389.
- Lucas, D., Lain de Lera, T., Gonzalez, M.A., Ruiz, J.F., Dominguez, O., Casanova, J.C., Martinez, A.C., Blanco, L. & Bernad, A. (2005) Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts. *European journal of immunology*, 35, 1601-1611.
- Luqu, C.L., Iglesias, M. & Rodríguez, R. (2006) Introducción a las técnicas analíticas aplicadas a la determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos y elementos químicos presentes en el medio ambiente.

- Lykkesfeldt, J., Michels, A.J. & Frei, B. (2014) Vitamin C. *Adv Nutr*, 5, 16-18.
- Maass, A., Berron, D., Libby, L.A., Ranganath, C. & Duzel, E. (2015) Functional subregions of the human entorhinal cortex. *Elife*, 4.
- Magistretti, P.J. (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*, 209, 2304-2311.
- Maldonado, K.A. & Alsayouri, K. (2020) *Physiology, Brain StatPearls*, Treasure Island (FL).
- Mandal, A.S., Biswas, N., Karim, K.M., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M. & Kuotsu, K. (2010) Drug delivery system based on chronobiology--A review. *J Control Release*, 147, 314-325.
- Manor, D. & Morley, S. (2007) The α -Tocopherol Transfer Protein Vitamin E, pp. 45-65.
- Marcos, P., Arroyo-Jimenez, M.M., Lozano, G., Gonzalez-Fuentes, J., Lagartos-Donate, M.J., Aguilar, L.A. & Covenas, R. (2013) Mapping of tyrosine hydroxylase in the diencephalon of alpaca (*Lama pacos*) and co-distribution with somatostatin-28 (1-12). *Journal of chemical neuroanatomy*, 50-51, 66-74.
- Marcos, P., Corio, M., Dubourg, P. & Tramu, G. (1996) Reciprocal synaptic connections between neurotensin- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the mediobasal hypothalamus of the guinea pig. *Brain Research*, 715, 63-70.
- Marcos, P., Gonzalez-Fuentes, J., Castro-Vazquez, L., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J., Rodriguez-Robledo, V., Villaseca-Gonzalez, N. & Arroyo-Jimenez, M.M. (2018) Vitamin transporters in mice brain with aging. *J Anat*, 232, 699-715.
- Mardones, P. & Rigotti, A. (2004) Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *J Nutr Biochem*, 15, 252-260.
- Mardones, P., Strobel, P., Miranda, S., Leighton, F., Quinones, V., Amigo, L., Rozowski, J., Krieger, M. & Rigotti, A. (2002) Alpha-tocopherol metabolism is abnormal in scavenger receptor class B type I (SR-BI)-deficient mice. *J Nutr*, 132, 443-449.
- Marengoni, A., Angleman, S., Melis, R., Mangialasche, F., Karp, A., Garmen, A., Meinow, B. & Fratiglioni, L. (2011) Aging with multimorbidity: a systematic review of the literature. *Ageing Res Rev*, 10, 430-439.
- Marko, M.G., Ahmed, T., Bunnell, S.C., Wu, D., Chung, H., Huber, B.T. & Meydani, S.N. (2007) Age-associated decline in effective immune synapse formation of CD4(+) T cells is reversed by vitamin E supplementation. *J Immunol*, 178, 1443-1449.

- Martín Gómez, M. & Ballesteros González, M. (Year) Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, City.
- Mathew, J. & Varacallo, M. (2020) Physiology, Blood Plasma StatPearls, Treasure Island (FL).
- Matsuo, K., Watanabe, T. & Takenaka, A. (2019) Effect of dietary vitamin E on oxidative stress-related gene-mediated differences in anxiety-like behavior in inbred strains of mice. *Physiol Behav*, 207, 64-72.
- Matthiesen, R. & Bunkenborg, J. (2013) Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol*, 1007, 1-45.
- Matuszewski, B.K. (2006) Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 830, 293-300.
- May, J.M. (2012) Vitamin C transport and its role in the central nervous system. *Subcell Biochem*, 56, 85-103.
- May, J.M. & Harrison, F.E. (2013) Role of vitamin C in the function of the vascular endothelium. *Antioxid Redox Signal*, 19, 2068-2083.
- Mazlan, M., Then, S.-M., Mat Top, G. & Zurinah Wan Ngah, W. (2006) Comparative effects of α -tocopherol and γ -tocotrienol against hydrogen peroxide induced apoptosis on primary-cultured astrocytes. *Journal of the Neurological Sciences*, 243, 5-12.
- McCormick, M.A. & Promislow, D.E.L. (2018) Recent Advances in the Systems Biology of Aging. *Antioxid Redox Signal*, 29, 973-984.
- Medina, J. & Gupta, V. (2020) Vitamin E StatPearls, Treasure Island (FL).
- Medvedev, Z.A. (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 65, 375-398.
- Micali, G., Lanuzza, F. & Currò, P. (1993) Analysis of tocopherols in margarine by on-line HPLC-HRGC coupling. *Journal of High Resolution Chromatography*, 16, 536-538.
- Mikkelsen, S.R. & Cortón, E. (2011) Química bioanalítica: métodos y teoría analítica para el laboratorio de biología molecular, farmacia y bioquímica. Eudeba.
- Mocchegiani, E., Costarelli, L., Giacconi, R., Malavolta, M., Basso, A., Piacenza, F., Ostan, R., Cevenini, E., Gonos, E.S., Franceschi, C. & Monti, D. (2014) Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev*, 14, 81-101.

- Mock, J.T., Chaudhari, K., Sidhu, A. & Sumien, N. (2017) The influence of vitamins E and C and exercise on brain aging. *Experimental gerontology*, 94, 69-72.
- Moore, A.N.J. & Ingold, K.U. (1997) α -Tocopheryl Quinone is Converted into Vitamin E in Man. *Free Radical Biology and Medicine*, 22, 931-934.
- Morillas, P., Terra, A., Uribe, C., Mastromonaco, G., Prieto, J. & Torres, M.J.E.E.P., Primera edición Española (2016) *Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados: Eurolab España.*
- Morley, J.E., Armbrecht, H.J., Farr, S.A. & Kumar, V.B. (2012) The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 650-656.
- Morozova, E.A., Anufrieva, N.V., Davydov, D.Z., Komarova, M.V., Dyakov, I.N., Rodionov, A.N., Demidkina, T.V. & Pokrovsky, V.S. (2017) Plasma methionine depletion and pharmacokinetic properties in mice of methionine gamma-lyase from *Citrobacter freundii*, *Clostridium tetani* and *Clostridium sporogenes*. *Biomed Pharmacother*, 88, 978-984.
- Muller, D.P.R. (2010) Vitamin E and neurological function. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 710-718.
- Mun, G.H., Kim, M.J., Lee, J.H., Kim, H.J., Chung, Y.H., Chung, Y.B., Kang, J.S., Hwang, Y.I., Oh, S.H., Kim, J.G., Hwang, D.H., Shin, D.H. & Lee, W.J. (2006) Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res*, 83, 919-928.
- Nakajima, K. (2004) Direct effects of high concentrations of dimethylsulfonylpropionate, vitamin E and ferulic acid on the senility of aged senescence-accelerated mouse (SAMP8). *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 50, 231-237.
- Nanasi, N., Veres, G., Cseh, E.K., Szentirmai, M., Martos, D., Sumegi, E., Hadady, L., Klivenyi, P., Vecsei, L. & Zadori, D. (2018) The detection of age-, gender-, and region-specific changes in mouse brain tocopherol levels via the application of different validated HPLC methods. *Neurochem Res*, 43, 2081-2091.
- Nguyen, T.X., Huang, L., Gauthier, M., Yang, G. & Wang, Q. (2016) Recent advances in liposome surface modification for oral drug delivery. *Nanomedicine (Lond)*, 11, 1169-1185.
- Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. & Ramsden, D.A. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell*, 19, 357-366.

- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., Enver, T., Bell, J.I., Slijepcevic, P., Goodnow, C.C., Jeggo, P.A. & Cornall, R.J. (2007) DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*, 447, 686-690.
- Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. & Gotoh, N. (1995) Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr*, 62, 1322S-1326S.
- Nikolaidis, M.G., Kerksick, C.M., Lamprecht, M. & McAnulty, S.R. (2012) Does vitamin C and E supplementation impair the favorable adaptations of regular exercise? *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 707941.
- Nomura, Y. & Okuma, Y. (1999) Age-related defects in lifespan and learning ability in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging*, 20, 111-115.
- Novotny, J.A., Fadel, J.G., Holstege, D.M., Furr, H.C. & Clifford, A.J. (2012) This kinetic, bioavailability, and metabolism study of RRR-alpha-tocopherol in healthy adults suggests lower intake requirements than previous estimates. *J Nutr*, 142, 2105-2111.
- 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., Salazar, K., Oyarce, K., Cisternas, P., Jara, N., Silva-Alvarez, C., Pastor, P., Martinez, F., Garcia, A., Garcia-Robles Mde, L. & Tapia, J.C. (2012) Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology. *Biol Res*, 45, 243-256.
- Oizumi, H., Kuriyama, N., Imamura, S., Tabuchi, M., Omiya, Y., Mizoguchi, K. & Kobayashi, H. (2019) Influence of aging on the behavioral phenotypes of C57BL/6J mice after social defeat. *PLoS One*, 14, e0222076.
- Oke, A.F., May, L. & Adams, R.N. (1987) Ascorbic acid distribution patterns in human brain. A comparison with nonhuman mammalian species. *Ann N Y Acad Sci*, 498, 1-12.
- Orgel, L.E. (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 49, 517-521.
- Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Ben Hamida, M., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.L. & Koenig, M. (1995) Ataxia with isolated vitamin E deficiency is caused by mutations in the alpha-tocopherol transfer protein. *Nat Genet*, 9, 141-145.
- Oyarce, K., Silva-Alvarez, C., Ferrada, L., Martinez, F., Salazar, K. & Nualart, F. (2018) SVCT2 Is Expressed by Cerebellar Precursor Cells, Which Differentiate into Neurons in Response to Ascorbic Acid. *Mol Neurobiol*, 55, 1136-1149.

- Padayatty, S.J. & Levine, M. (2016) Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*, 22, 463-493.
- Pallauf, K., Bendall, J.K., Scheiermann, C., Watschinger, K., Hoffmann, J., Roeder, T. & Rimbach, G. (2013) Vitamin C and lifespan in model organisms. *Food Chem Toxicol*, 58, 255-263.
- Pangeni, R., Panthi, V.K., Yoon, I.S. & Park, J.W. (2018) Preparation, Characterization, and In Vivo Evaluation of an Oral Multiple Nanoemulsive System for Co-Delivery of Pemetrexed and Quercetin. *Pharmaceutics*, 10.
- Park, D.C. & Reuter-Lorenz, P. (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*, 60, 173-196.
- Parrish, D.B. (1980) Determination of vitamin E in foods--a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 13, 161-187.
- Parthasarathi, S., Muthukumar, S.P. & Anandharamakrishnan, C. (2016) The influence of droplet size on the stability, in vivo digestion, and oral bioavailability of vitamin E emulsions. *Food Funct*, 7, 2294-2302.
- Patel, V., Rink, C., Khanna, S. & Sen, C.K. (2011) Tocotrienols: the lesser known form of natural vitamin E. *Indian J Exp Biol*, 49, 732-738.
- Pathak, K. & Raghuvanshi, S. (2015) Oral bioavailability: issues and solutions via nanoformulations. *Clin Pharmacokinet*, 54, 325-357.
- Pawlowska, E., Szczepanska, J. & Blasiak, J. (2019) Pro- and Antioxidant Effects of Vitamin C in Cancer in correspondence to Its Dietary and Pharmacological Concentrations. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 7286737.
- Peirson, S.N., Brown, L.A., Potheary, C.A., Benson, L.A. & Fisk, A.S. (2018) Light and the laboratory mouse. *J Neurosci Methods*, 300, 26-36.
- Pérez Díaz, J., Abellán García, A., Aceituno Nieto, P. & Ramiro Fariñas, D. (2020) Un perfil de las personas mayores en España, 2020. Indicadores estadísticos básicos. *Informes Envejecimiento en red*, 25.
- Petursdottir, A.L., Farr, S.A., Morley, J.E., Banks, W.A. & Skuladottir, G.V. (2007) Lipid peroxidation in brain during aging in the senescence-accelerated mouse (SAM). *Neurobiol Aging*, 28, 1170-1178.
- Plapied, L., Duhem, N., des Rieux, A. & Prétat, V. (2011) Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, 228-237.
- Plaza-Oliver, M., Baranda, J.F., Rodriguez Robledo, V., Castro-Vazquez, L., Gonzalez-Fuentes, J., Marcos, P., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J. & Arroyo-Jimenez,

- M.M. (2015) Design of the interface of edible nanoemulsions to modulate the bioaccessibility of neuroprotective antioxidants. *International journal of pharmaceutics*, 490, 209-218.
- Plebani, M., Banfi, G., Bernardini, S., Bondanini, F., Conti, L., Dorizzi, R., Ferrara, F.E., Mancini, R. & Trenti, T. (2020) Serum or plasma? An old question looking for new answers. *Clin Chem Lab Med*, 58, 178-187.
- Podda, M. & Grundmann-Kollmann, M. (2001) Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clin Exp Dermatol*, 26, 578-582.
- Polidori, M.C. (2003) Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. *J Postgrad Med*, 49, 229-235.
- Prados-Torres, A., Del Cura-Gonzalez, I., Prados-Torres, J.D., Leiva-Fernandez, F., Lopez-Rodriguez, J.A., Calderon-Larranaga, A. & Muth, C. (2017) [Multimorbidity in general practice and the Ariadne principles. A person-centred approach]. *Aten Primaria*, 49, 300-307.
- Prasad, S., Gupta, S.C. & Tyagi, A.K. (2017) Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Letters*, 387, 95-105.
- Pryor, J.M., Waters, C.A., Aza, A., Asagoshi, K., Strom, C., Mieczkowski, P.A., Blanco, L. & Ramsden, D.A. (2015) Essential role for polymerase specialization in cellular nonhomologous end joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, E4537-4545.
- Qiu, S., Li, L., Weeber, E.J. & May, J.M. (2007) Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res*, 85, 1046-1056.
- Ramis, M.R., Sarubbo, F., Terrasa, J.L., Moranta, D., Aparicio, S., Miralles, A. & Esteban, S. (2016) Chronic alpha-Tocopherol Increases Central Monoamines Synthesis and Improves Cognitive and Motor Abilities in Old Rats. *Rejuvenation research*, 19, 159-171.
- Ramsden, D.A. & Asagoshi, K. (2012) DNA polymerases in nonhomologous end joining: are there any benefits to standing out from the crowd? *Environ Mol Mutagen*, 53, 741-751.
- Rattan, S.I. & Singh, R. (2009) Progress & prospects: gene therapy in aging. *Gene Ther*, 16, 3-9.
- Rebec, G.V. & Pierce, R.C. (1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol*, 43, 537-565.
- Reboul, E. (2017) Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants (Basel)*, 6.

- Reboul, E. (2019) Vitamin E intestinal absorption: Regulation of membrane transport across the enterocyte. *IUBMB Life*, 71, 416-423.
- Reboul, E., Klein, A., Bietrix, F., Gleize, B., Malezet-Desmoulins, C., Schneider, M., Margotat, A., Lagrost, L., Collet, X. & Borel, P. (2006) Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem*, 281, 4739-4745.
- Reinholz, J., Landfester, K. & Mailander, V. (2018) The challenges of oral drug delivery via nanocarriers. *Drug Deliv*, 25, 1694-1705.
- Rentel, C., Strohschein, S., Albert, K. & Bayer, E. (1998) Silver-Plated Vitamins: A Method of Detecting Tocopherols and Carotenoids in LC/ESI-MS Coupling. *Analytical Chemistry*, 70, 4394-4400.
- Reuhs, B.L. (2017) High-Performance Liquid Chromatography. In Nielsen, S.S. (ed) *Food Analysis*. Springer International Publishing, Cham, pp. 213-226.
- Rice, M.E. (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 23, 209-216.
- Rice, M.E. & Russo-Menna, I. (1997) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*, 82, 1213-1223.
- Richheimer, S.L., Kent, M.C. & Bernart, M.W. (1994) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method using a pentafluorophenyl bonded phase for analysis of tocopherols. *Journal of Chromatography A*, 677, 75-80.
- Rigotti, A. (2007) Absorption, transport, and tissue delivery of vitamin E. *Mol Aspects Med*, 28, 423-436.
- Robards, K., Jackson, P.E. & Haddad, P.A. (2012) *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. Elsevier Science.
- Robledo, V.R. (2005) *Nuevos metodos para el analisis de antidepresivos mediante tecnicas analiticas de separación en. Universidad de Castilla-La Mancha*.
- Rogers, E.J., Rice, S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A. & Romanczyk, L.J. (1993) Identification and quantitation of γ -oryzanol components and simultaneous assessment of tocols in rice bran oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 301-307.
- Rui, Y., Cheng, J., Qin, L., Shan, C., Chang, J., Wang, G. & Wan, Z. (2017) Effects of vitamin D and resveratrol on metabolic associated markers in liver and adipose tissue from SAMP8 mice. *Experimental gerontology*, 93, 16-28.

- Rupérez, F.J., Barbas, C., Castro, M. & Herrera, E. (1999) Determination of α -tocopherol and α -tocopheryl acetate in diets of experimental animals. *Journal of Chromatography A*, 839, 93-99.
- Ruperez, F.J., Mach, M. & Barbas, C. (2004) Direct liquid chromatography method for retinol, alpha- and gamma-tocopherols in rat plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 800, 225-230.
- Rupérez, F.J., Martín, D., Herrera, E. & Barbas, C. (2001) Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935, 45-69.
- Salazar, K., Martinez, F., Perez-Martin, M., Cifuentes, M., Trigueros, L., Ferrada, L., Espinoza, F., Saldivia, N., Bertinat, R., Forman, K., Oviedo, M.J., Lopez-Gambero, A.J., Bonansco, C., Bongarzone, E.R. & Nualart, F. (2018) SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Mol Neurobiol*, 55, 5439-5452.
- Salthouse, T.A. (2010) Selective review of cognitive aging. *J Int Neuropsychol Soc*, 16, 754-760.
- Salvia-Trujillo, L., Soliva-Fortuny, R., Rojas-Grau, M.A., McClements, D.J. & Martin-Belloso, O. (2017) Edible Nanoemulsions as Carriers of Active Ingredients: A Review. *Annu Rev Food Sci Technol*, 8, 439-466.
- Santander-Ortega, M.J., Plaza-Oliver, M., Rodriguez-Robledo, V., Castro-Vazquez, L., Villaseca-Gonzalez, N., Gonzalez-Fuentes, J., Cano, E.L., Marcos, P., Lozano, M.V. & Arroyo-Jimenez, M.M. (2017) PEGylated Nanoemulsions for Oral Delivery: Role of the Inner Core on the Final Fate of the Formulation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 33, 4269-4279.
- Sarzanini, C., Mentasti, E., Vincenti, M., Nerva, M. & Gaido, F. (1993) Determination of plasma tocopherols by high-performance liquid chromatography with coulometric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 620, 268-272.
- Satomura, Y., Kimura, M. & Itokawa, Y. (1992) Simultaneous determination of retinol and tocopherols by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 625, 372-376.
- Sawda, C., Moussa, C. & Turner, R.S. (2017) Resveratrol for Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403, 142-149.
- Schmit, J.A., Henry, R.A., Williams, R.C. & Dieckman, J.F. (1971) Applications of High Speed Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 9, 645-651.
- Schmolz, L., Birringer, M., Lorkowski, S. & Wallert, M. (2016) Complexity of vitamin E metabolism. *World J Biol Chem*, 7, 14-43.

- Schneider, C. (2005) Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res*, 49, 7-30.
- Schonknecht, P., Pantel, J., Kruse, A. & Schroder, J. (2005) Prevalence and natural course of aging-associated cognitive decline in a population-based sample of young-old subjects. *Am J Psychiatry*, 162, 2071-2077.
- Schüep, W. & Rettenmaier, R. (1994) [25] Analysis of vitamin E homologs in plasma and tissue: High-performance liquid chromatography Oxygen Radicals in Biological Systems Part D, pp. 294-302.
- Schwartz, J.L. (1996) The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: their effects on tumor cell growth. *J Nutr*, 126, 1221S-1227S.
- Semeraro, A., Altieri, I., Patriarca, M. & Menditto, A. (2009) Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: An application to the simultaneous determination of retinol and α -tocopherol in human serum by HPLC. *Journal of Chromatography B*, 877, 1209-1215.
- Sen, C.K., Khanna, S., Rink, C. & Roy, S. (2007) Tocotrienols: The Emerging Face of Natural Vitamin E Vitamin E, pp. 203-261.
- Sen, P., Shah, P.P., Nativio, R. & Berger, S.L. (2016) Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166, 822-839.
- Sergiev, P.V., Dontsova, O.A. & Berezkin, G.V. (2015) Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Naturae*, 7, 9-18.
- Shahbazi, M.-A. & A. Santos, H. (2012) Improving Oral Absorption Via Drug-Loaded Nanocarriers: Absorption Mechanisms, Intestinal Models and Rational Fabrication. *Current Drug Metabolism*, 14, 28-56.
- Shichiri, M., Takanezawa, Y., Rotzoll, D.E., Yoshida, Y., Kokubu, T., Ueda, K., Tamai, H. & Arai, H. (2010) ATP-binding cassette transporter A1 is involved in hepatic alpha-tocopherol secretion. *J Nutr Biochem*, 21, 451-456.
- Shichiri, M., Yoshida, Y., Ishida, N., Hagihara, Y., Iwahashi, H., Tamai, H. & Niki, E. (2011) alpha-Tocopherol suppresses lipid peroxidation and behavioral and cognitive impairments in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med*, 50, 1801-1811.
- Shimizu, R., Kitade, M., Kobayashi, T., Hori, S. & Watanabe, A. (2015) Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling for reduction of hepatic apolipoprotein B mRNA and plasma total cholesterol after administration of antisense oligonucleotide in mice. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 42, 67-77.

- Shoji, H., Takao, K., Hattori, S. & Miyakawa, T. (2016) Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Mol Brain*, 9, 11.
- Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E.J., Dacquin, R., Djebali, S., Estabel, J., Graw, J., Ingham, N.J., Jackson, I.J., Lengeling, A., Mandillo, S., Marvel, J., Meziane, H., Preitner, F., Puk, O., Roux, M., Adams, D.J., Atkins, S., Ayadi, A., Becker, L., Blake, A., Brooker, D., Cater, H., Champy, M.F., Combe, R., Danecek, P., di Fenza, A., Gates, H., Gerdin, A.K., Golini, E., Hancock, J.M., Hans, W., Holter, S.M., Hough, T., Jurdic, P., Keane, T.M., Morgan, H., Muller, W., Neff, F., Nicholson, G., Pasche, B., Roberson, L.A., Rozman, J., Sanderson, M., Santos, L., Selloum, M., Shannon, C., Southwell, A., Tocchini-Valentini, G.P., Vancollie, V.E., Westerberg, H., Wurst, W., Zi, M., Yalcin, B., Ramirez-Solis, R., Steel, K.P., Mallon, A.M., de Angelis, M.H., Hérault, Y. & Brown, S.D. (2013) A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol*, 14, R82.
- Singh, P.P., Demmitt, B.A., Nath, R.D. & Brunet, A. (2019) The Genetics of Aging: A Vertebrate Perspective. *Cell*, 177, 200-220.
- Singh, Y., Meher, J.G., Raval, K., Khan, F.A., Chaurasia, M., Jain, N.K. & Chourasia, M.K. (2017) Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Control Release*, 252, 28-49.
- Siushansian, R. & Wilson, J.X. (2002) Ascorbate Transport and Intracellular Concentration in Cerebral Astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 65, 41-49.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A. & Gómez, M.C.M. (2000) *Principios de análisis instrumental*. McGraw-Hill.
- Skoog, D.A., West, D.M. & Holler, F.J. (1997) *Fundamentos de química analítica*. Reverté.
- Smith, J.S. & Thakur, R.A. (2017) Mass Spectrometry. In Nielsen, S.S. (ed) *Food Analysis*. Springer International Publishing, Cham, pp. 165-181.
- Snyder, J.M., Hagan, C.E., Bolon, B. & Keene, C.D. (2018) Nervous System Comparative Anatomy and Histology, pp. 403-444.
- Song, H.K. & Hwang, D.Y. (2017) Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory animal research*, 33, 119-123.
- Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., Miller, G.F., Kwon, O., Levine, M., Guttentag, S.H. & Nussbaum, R.L. (2002) Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med*, 8, 514-517.

- Sotler, R., Poljsak, B., Dahmane, R., Jukic, T., Pavan Jukic, D., Rotim, C., Trebse, P. & Starc, A. (2019) Prooxidant Activities of Antioxidants and Their Impact on Health. *Acta Clin Croat*, 58, 726-736.
- Squire, L.R. & Zola, S.M. (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13515-13522.
- Stipursky, J., Romao, L., Tortelli, V., Neto, V.M. & Gomes, F.C. (2011) Neuron-glia signaling: Implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci*, 89, 524-531.
- Strohschein, S., Rentel, C., Lacker, T., Bayer, E. & Albert, K. (1999) Separation and Identification of Tocotrienol Isomers by HPLC-MS and HPLC-NMR Coupling. *Analytical Chemistry*, 71, 1780-1785.
- Stylos, E., Chatziathanasiadou, M.V., Syriopoulou, A. & Tzakos, A.G. (2017) Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) based bioavailability determination of the major classes of phytochemicals. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1047, 15-38.
- Sun, D., Wei, X., Xue, X., Fang, Z., Ren, M., Lou, H. & Zhang, X. (2014) Enhanced oral absorption and therapeutic effect of acetylpuerarin based on D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate nanoemulsions. *Int J Nanomedicine*, 9, 3413-3423.
- Sunkin, S.M., Ng, L., Lau, C., Dolbeare, T., Gilbert, T.L., Thompson, C.L., Hawrylycz, M. & Dang, C.J.N.a.r. (2012) Allen Brain Atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. 41, D996-D1008.
- Suzuki, W.A. & Eichenbaum, H. (2000) The neurophysiology of memory. *Ann N Y Acad Sci*, 911, 175-191.
- Svirbely, J.L. & Szent-Györgyi, A.J.B.J. (1932) The chemical nature of vitamin C. 26, 865-870.
- Svirbely, J.L. & Szent-Györgyi, A.J.B.J. (1933) The chemical nature of vitamin C. 27, 279.
- Szent-Gyorgyi, A. (1928) Observations on the function of peroxidase systems and the chemistry of the adrenal cortex: Description of a new carbohydrate derivative. *Biochem J*, 22, 1387-1409.
- Szilard, L. (1959) On the Nature of the Aging Process. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 45, 30-45.
- Takahashi, K., Takisawa, S., Shimokado, K., Kono, N., Arai, H. & Ishigami, A. (2017) Age-related changes of vitamin E: alpha-tocopherol levels in plasma and various tissues of mice and hepatic alpha-tocopherol transfer protein. *Eur J Nutr*, 56, 1317-1327.

- Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. & Yamamuro, T. (1981) A new murine model of accelerated senescence. *Mechanisms of ageing and development*, 17, 183-194.
- Tan, B. & Brzuskiwicz, L. (1989) Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 180, 368-373.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P. & Sulaiman Rahman, H. (2018) Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Front Pharmacol*, 9, 1162.
- Tangney, C.C., Driskell, J.A. & McNair, H.M. (1979) Separation of vitamin E isomers by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 172, 513-515.
- Tardiolo, G., Bramanti, P. & Mazzon, E. (2018) Overview on the Effects of N-Acetylcysteine in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 23.
- Thiele, J.J., Traber, M.G. & Packer, L. (1998) Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation. *J Invest Dermatol*, 110, 756-761.
- Thiele, J.J., Weber, S.U. & Packer, L. (1999) Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *J Invest Dermatol*, 113, 1006-1010.
- Thomson, B.A. & Iribarne, J.V. (1979) Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *The Journal of Chemical Physics*, 71, 4451-4463.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. & Bannerjee, S.K. (2012) Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig*, 2, 2-11.
- Tomobe, K. & Nomura, Y. (2009) Neurochemistry, neuropathology, and heredity in SAMP8: a mouse model of senescence. *Neurochem Res*, 34, 660-669.
- Toyada-Ono, Y., Maeda, M., Nakao, M., Yoshimura, M., Sugiura-Tomimori, N., Fukami, H., Nishioka, H., Miyashita, Y. & Kojo, S. (2005) A novel vitamin C analog, 2-O-(beta-D-Glucopyranosyl)ascorbic acid: examination of enzymatic synthesis and biological activity. *J Biosci Bioeng*, 99, 361-365.
- Toyoda-Ono, Y., Maeda, M., Nakao, M., Yoshimura, M., Sugiura-Tomimori, N. & Fukami, H. (2004) 2-O-(beta-D-Glucopyranosyl)ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from Lycium fruit. *J Agric Food Chem*, 52, 2092-2096.

- Traber, M.G. (2004) Vitamin E, nuclear receptors and xenobiotic metabolism. *Arch Biochem Biophys*, 423, 6-11.
- Traber, M.G. (2005) Vitamin E regulation. *Curr Opin Gastroenterol*, 21, 223-227.
- Traber, M.G. (2013) Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res*, 54, 2295-2306.
- Traber, M.G. (2014) Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. *Adv Nutr*, 5, 503-514.
- Traber, M.G. & Atkinson, J. (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med*, 43, 4-15.
- Traber, M.G., Burton, G.W. & Hamilton, R.L. (2004) Vitamin E trafficking. *Ann N Y Acad Sci*, 1031, 1-12.
- Trevisan, K., Cristina-Pereira, R., Silva-Amaral, D. & Aversi-Ferreira, T.A. (2019) Theories of Aging and the Prevalence of Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*, 2019, 9171424.
- Troen, B.R. (2003) The biology of aging. *Mt Sinai J Med*, 70, 3-22.
- Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G. & Cappiello, A. (2011) An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 30, 491-509.
- Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.-Z., Wang, Y., Brubaker, R.F. & Hediger, M.A. (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399, 70-75.
- Tucker, J.M. & Townsend, D.M. (2005) Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomed Pharmacother*, 59, 380-387.
- Tysnes, O.B. & Storstein, A. (2017) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 124, 901-905.
- Uges, D.R. (1988) Plasma or serum in therapeutic drug monitoring and clinical toxicology. *Pharm Weekbl Sci*, 10, 185-188.
- Ulatowski, L., Dreussi, C., Noy, N., Barnholtz-Sloan, J., Klein, E. & Manor, D. (2012) Expression of the alpha-tocopherol transfer protein gene is regulated by oxidative stress and common single-nucleotide polymorphisms. *Free Radic Biol Med*, 53, 2318-2326.
- Ulatowski, L. & Manor, D. (2013) Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annu Rev Nutr*, 33, 87-103.

- Ulatowski, L., Parker, R., Warriar, G., Sultana, R., Butterfield, D.A. & Manor, D. (2014) Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience*, 260, 120-129.
- Ulatowski, L.M. & Manor, D. (2015) Vitamin E and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*, 84, 78-83.
- Vaiserman, A., De Falco, E., Koliada, A., Maslova, O. & Balistreri, C.R. (2019) Anti-ageing gene therapy: Not so far away? *Ageing Res Rev*, 56, 100977.
- Valdés, F. (2006) Vitamina C. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 97, 557-568.
- van den Ouweland, J.M. & Kema, I.P. (2012) The role of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 883-884, 18-32.
- van der Lugt, B., Rusli, F., Lute, C., Lamprakis, A., Salazar, E., Boekschoten, M.V., Hooiveld, G.J., Muller, M., Vervoort, J., Kersten, S., Belzer, C., Kok, D.E.G. & Steegenga, W.T. (2018) Integrative analysis of gut microbiota composition, host colonic gene expression and intraluminal metabolites in aging C57BL/6J mice. *Aging (Albany NY)*, 10, 930-950.
- Van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., De Swaef, T., Steppe, K. & De Brabander, H. (2012a) U-HPLC-MS/MS To Quantify Liposoluble Antioxidants in Red-Ripe Tomatoes, Grown under Different Salt Stress Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 566-573.
- Van Meulebroek, L., Vanhaecke, L., De Swaef, T., Steppe, K. & De Brabander, H. (2012b) U-HPLC-MS/MS to quantify liposoluble antioxidants in red-ripe tomatoes, grown under different salt stress levels. *J Agric Food Chem*, 60, 566-573.
- Van Niekerk, P.J. (1973) The direct determination of free tocopherols in plant oils by liquid-solid chromatography. *Analytical biochemistry*, 52, 533-537.
- Vance, J.E. & Hayashi, H. (2010) Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 806-818.
- Vatassery, G.T., Angerhofer, C.K. & Knox, C.A. (1984) Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J Neurochem*, 43, 409-412.
- Vatassery, G.T., Quach, H.T., Smith, W.E., Santacruz, K.S. & Roy, S. (2007) Apolipoprotein e deficiency leads to altered brain uptake of alpha tocopherol injected into lateral cerebral ventricles. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 797-803.

- Vaule, H., Leonard, S.W. & Traber, M.G. (2004) Vitamin E delivery to human skin: studies using deuterated α -tocopherol measured by APCI LC-MS. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 456-463.
- Verrax, J. & Calderon, P.B. (2008) The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochem Pharmacol*, 76, 1644-1652.
- Viana, M., Barbas, C., Castro, M., Herrera, E. & Bonet, B. (1999) Alpha-Tocopherol Concentration in Fetal and Maternal Tissues of Pregnant Rats Supplemented with Alpha-Tocopherol. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 43, 107-112.
- Vijg, J. (2000) Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 447, 117-135.
- Villaseca-Gonzalez, N., Robledo, V.R., Castro-Vazquez, L., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J., Gonzalez-Fuentes, J., Marcos, P. & Mar Arroyo-Jimenez, M.D. (2018) Ultrafast determination of vitamin E using LC-ESI-MS/MS for preclinical development of new nutraceutical formulations. *Bioanalysis*, 10, 215-227.
- Violet, P.C., Ebeunuwa, I.C., Wang, Y., Niyyati, M., Padayatty, S.J., Head, B., Wilkins, K., Chung, S., Thakur, V., Ulatowski, L., Atkinson, J., Ghelfi, M., Smith, S., Tu, H., Bobe, G., Liu, C.Y., Herion, D.W., Shamburek, R.D., Manor, D., Traber, M.G. & Levine, M. (2020) Vitamin E sequestration by liver fat in humans. *JCI Insight*, 5.
- Vogeser, M. & Seger, C. (2008) A decade of HPLC-MS/MS in the routine clinical laboratory--goals for further developments. *Clin Biochem*, 41, 649-662.
- Wahyuni, W.T. & Jinno, K. (1988) Separation of tocopherols on various chemically bonded phases in microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 448, 398-403.
- Wang, F., Chen, H. & Sun, X. (2009) Age-related spatial cognitive impairment is correlated with a decrease in ChAT in the cerebral cortex, hippocampus and forebrain of SAMP8 mice. *Neurosci Lett*, 454, 212-217.
- Wang, Q., Song, X., Zhang, F. & Liu, Y. (2008) Determination of 5-fluorouracil in serum microsamples by a high-performance liquid chromatographic method and its application to pharmacokinetic studies in rats. *J Chromatogr Sci*, 46, 450-453.
- Wang, S., Cyronak, M. & Yang, E. (2007) Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 43, 701-707.

- Waniek, S., di Giuseppe, R., Esatbeyoglu, T., Plachta-Danielzik, S., Ratjen, I., Jacobs, G., Nöthlings, U., Koch, M., Schlesinger, S., Rimbach, G. & Lieb, W. (2017) Vitamin E (α - and γ -Tocopherol) Levels in the Community: Distribution, Clinical and Biochemical Correlates, and Association with Dietary Patterns. *Nutrients*, 10.
- Watson, C., Paxinos, G. & Puelles, L. (2012) *The Mouse Nervous System*. Elsevier Science.
- Weinert, B.T. & Timiras, P.S. (2003) Invited review: Theories of aging. *J Appl Physiol* (1985), 95, 1706-1716.
- Welsch, U. & Sobotta, J. (2008) *Histología*. Ed. Médica Panamericana.
- Weterings, E. & van Gent, D.C. (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)*, 3, 1425-1435.
- Williams, R.C., Schmit, J.A. & Henry, R.A. (1972) Quantitative Analysis of the Fat-Soluble Vitamins by High-Speed Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 10, 494-501.
- Wilson, J.X. (2005) Regulation of Vitamin C Transport. *Annual Review of Nutrition*, 25, 105-125.
- Woods, J.R., Jr., Plessinger, M.A. & Miller, R.K. (2001) Vitamins C and E: missing links in preventing preterm premature rupture of membranes? *Am J Obstet Gynecol*, 185, 5-10.
- Wu, J.H. & Croft, K.D. (2007) Vitamin E metabolism. *Mol Aspects Med*, 28, 437-452.
- Yagi, H., Katoh, S., Akiguchi, I. & Takeda, T. (1988) Age-related deterioration of ability of acquisition in memory and learning in senescence accelerated mouse: SAM-P/8 as an animal model of disturbances in recent memory. *Brain Research*, 474, 86-93.
- Yamanashi, Y., Takada, T., Kurauchi, R., Tanaka, Y., Komine, T. & Suzuki, H. (2017) Transporters for the Intestinal Absorption of Cholesterol, Vitamin E, and Vitamin K. *J Atheroscler Thromb*, 24, 347-359.
- Yan, J., Studer, L. & McKay, R.D.G. (2009) Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *Journal of Neurochemistry*, 76, 307-311.
- Yang, Y. & McClements, D.J. (2013) Vitamin E bioaccessibility: influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified alpha-tocopherol acetate. *Food Chem*, 141, 473-481.
- Yang, Y., Xiao, H. & McClements, D.J. (2017) Impact of Lipid Phase on the Bioavailability of Vitamin E in Emulsion-Based Delivery Systems: Relative

- Importance of Bioaccessibility, Absorption, and Transformation. *J Agric Food Chem*, 65, 3946-3955.
- Yokota, T., Igarashi, K., Uchihara, T., Jishage, K., Tomita, H., Inaba, A., Li, Y., Arita, M., Suzuki, H., Mizusawa, H. & Arai, H. (2001) Delayed-onset ataxia in mice lacking alpha-tocopherol transfer protein: model for neuronal degeneration caused by chronic oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 15185-15190.
- Yoshida, Y., Itoh, N., Hayakawa, M., Habuchi, Y., Saito, Y., Tsukamoto, Y., Cynshi, O., Jishage, K., Arai, H. & Niki, E. (2010) The role of alpha-tocopherol in motor hypofunction with aging in alpha-tocopherol transfer protein knockout mice as assessed by oxidative stress biomarkers. *J Nutr Biochem*, 21, 66-76.
- Zamboni, W.C., Strychor, S., Joseph, E., Parise, R.A., Egorin, M.J. & Eiseman, J.L. (2008) Tumor, tissue, and plasma pharmacokinetic studies and antitumor response studies of docetaxel in combination with 9-nitrocamptothecin in mice bearing SKOV-3 human ovarian xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*, 62, 417-426.
- Zhang, Y.V., Wei, B., Zhu, Y., Zhang, Y. & Bluth, M.H. (2016) Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: An Emerging Technology in the Toxicology Laboratory. *Clin Lab Med*, 36, 635-661.
- Zhang, Z., Liu, X., Zhang, X., Liu, J., Hao, Y., Yang, X. & Wang, Y. (2011) Comparative evaluation of the antioxidant effects of the natural vitamin C analog 2-O-beta-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from Goji berry fruit. *Arch Pharm Res*, 34, 801-810.
- Zingg, J.M. (2007) Vitamin E: an overview of major research directions. *Mol Aspects Med*, 28, 400-422.
- Zingg, J.M. & Azzi, A. (2004) Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr Med Chem*, 11, 1113-1133.

PUBLICACIONES

- Marcos, P., Gonzalez-Fuentes, J., Castro-Vazquez, L., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J., Rodriguez-Robledo, V., Villaseca-Gonzalez, N. & Arroyo-Jimenez, M.M. (2018) Vitamin transporters in mice brain with aging. *J Anat*, **232**, 699-715.
- Villaseca-Gonzalez, N., Robledo, V.R., Castro-Vazquez, L., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J., Gonzalez-Fuentes, J., Marcos, P. & Mar Arroyo-Jimenez, M.D. (2018) Ultrafast determination of vitamin E using LC-ESI-MS/MS for preclinical development of new nutraceutical formulations. *Bioanalysis*, **10**, 215-227.
- Villaseca-Gonzalez, N., Gonzalez-Fuentes, J., Robledo, V.R., Lozano, M.V., Santander-Ortega, M.J., Plaza-Oliver, M., Selva-Clemente, J., Castro-Vazquez, L., Marcos, P. & Mar Arroyo-Jimenez, M.D. Kinetic and distribution of nanoemulsified alpha-tocopherol in aging mouse models (en preparación).

ANEXOS

ANEXO 1: Terminología y parámetros cromatográficos

- **Altura, anchura y área del pico.** La altura del pico corresponde a la distancia entre la cima del mismo y la línea base. La anchura es la distancia comprendida entre las dos líneas de subida y bajada del pico que discurre en paralelo a la línea base. El área del pico está limitada por la curva y la anchura del mismo.
- **Elución isocrática o de gradiente.** Durante la separación, la circulación de la fase móvil puede ser isocrática, en la cual, la composición de la fase móvil y su flujo son constantes, mientras que en la de gradiente, tanto la composición como el flujo de la fase móvil pueden variar de forma reproducible.
- **Derivatización,** es un proceso por el cual se obtiene un producto del analito que se quiere determinar. El objetivo es obtener un analito derivado del original que pueda mejorar los inconvenientes que plantea en el análisis cromatográfico el analito inicial. Estos inconvenientes pueden ser una baja sensibilidad, selectividad, estabilidad o una separación ineficaz (Baghdady & Schug, 2016). Es un proceso alternativo que puede implicar mayor error, pues durante el proceso se pueden formar otros subproductos que interfieran en el análisis.

Dentro de los parámetros habituales que se emplean en cromatografía podemos encontrar aquellos que hacen referencia al comportamiento cromatográfico de los analitos:

- **Volumen de retención (V_R),** se trata del volumen necesario de la fase móvil para que un analito sea eluido.
- **Volumen muerto (V_0),** es el volumen de fase móvil inicial que se encuentra dentro del sistema cromatográfico y que no interacciona con la fase estacionaria.
- **Tiempo de retención (t_R),** es el tiempo que va desde que se produce la inyección del analito hasta que se detecta el punto máximo de su pico en el detector.
- **Coefficiente de distribución (K_D),** se define como el cociente de la concentración molar del analito en la fase estacionaria entre la de la

misma, pero en la fase móvil. Cuanto mayor sea el coeficiente, mayor será la afinidad del analito por la fase estacionaria y, por tanto, el t_R será mayor.

- **Factor de capacidad o de retención (K')**, es la relación entre el tiempo que pasa un analito en la fase estacionaria respecto al tiempo que pasa en la fase móvil.
- **Selectividad (α)**, es un parámetro que relaciona los tiempos de retención de dos compuestos, de manera que nos indica si la separación entre ellos permite diferenciarlos.
- **Modo SCAN**, consiste en un barrido de masas para un intervalo de masas m/z .
- **Modo SIM**, se lleva a cabo la monotorización selectiva de iones con una determinada m/z .

Y, por otro lado, podemos encontrar aquellos parámetros que están relacionados con la eficiencia de la columna y la resolución:

- **Número de platos teóricos (N)**, es un parámetro que nos da información acerca del número de segmentos o platos teóricos en los cuales se produce un equilibrio de reparto del analito, o compuesto de interés, entre la fase estacionaria y la fase móvil. Las columnas con un número de platos teóricos elevado son más eficientes.
- **Altura equivalente de plato teórico (H)**, se trata del cociente de la longitud de la columna entre el número de platos teóricos, de manera que se pueda comparar la eficacia de columnas diferentes independientemente de su longitud.
- **Resolución cromatográfica (R_s)**, indica el grado en que dos picos contiguos se separan. Cuanto mayor es la resolución, mejor es la separación entre dos picos de dos compuestos diferentes.

Vitamin transporters in mice brain with aging

P. Marcos, J. González-Fuentes, L. Castro-Vázquez, M. V. Lozano, M. J. Santander-Ortega, V. Rodríguez-Robledo, N. Villaseca-González and M. M. Arroyo-Jiménez

Cellular Neuroanatomy and Molecular Chemistry of Central Nervous System, Faculty of Pharmacy and Faculty of Medicine, University of Castilla-La Mancha, CRIB (Centro Regional de Investigaciones Biomédicas), Albacete, Spain

Abstract

Its high metabolic rate and high polyunsaturated fatty acid content make the brain very sensitive to oxidative damage. In the brain, neuronal metabolism occurs at a very high rate and generates considerable amounts of reactive oxygen species and free radicals, which accumulate inside neurons, leading to altered cellular homeostasis and integrity and eventually irreversible damage and cell death. A misbalance in redox metabolism and the subsequent neurodegeneration increase throughout the course of normal aging, leading to several age-related changes in learning and memory as well as motor functions. The neuroprotective function of antioxidants is crucial to maintain good brain homeostasis and adequate neuronal functions. Vitamins E and C are two important antioxidants that are taken up by brain cells via the specific carriers α TTP and SVCT2, respectively. The aim of this study was to use immunohistochemistry to determine the distribution pattern of these vitamin transporters in the brain in a mouse model that shows fewer signs of brain aging and a higher resistance to oxidative damage. Both carriers were distributed widely throughout the entire brain in a pattern that remained similar in 4-, 12-, 18- and 24-month-old mice. In general, α TTP and SVCT2 were located in the same regions, but they seemed to have complementary distribution patterns. Double-labeled cell bodies were detected only in the inferior colliculus, entorhinal cortex, dorsal *subiculum*, and several cortical areas. In addition, the presence of α TTP and SVCT2 in neurons was analyzed using double immunohistochemistry for NeuN and the results showed that α TTP but not SVCT2 was present in Bergmann's glia. The presence of these transporters in brain regions implicated in learning, memory and motor control provides an anatomical basis that may explain the higher resistance of this animal model to brain oxidative stress, which is associated with better motor performance and learning abilities in old age.

Key words: aging; antioxidants; oxidative damage; transporters; vitamin C; vitamin E.

Introduction

Ageing is a biologically complex process that involves many changes in live organisms. One feature that is phylogenetically conserved in aging is the induction of stress response pathways (Haigis & Yankner, 2010). Some of the most important alterations occur in learning, memory and motor performance (Yeoman et al. 2012). The phenotypic changes that occur during aging reflect morphological and physiological changes in the brain. For example, aging has been

associated with an increase in neuroinflammatory processes and the generation of reactive oxygen species (ROS) (Harman, 1972; Bishop et al. 2010; Haigis & Yankner, 2010; Venkateshappa et al. 2012; Yeoman et al. 2012). The natural activity of the neuroprotective system that combats the effects of ROS declines during aging, leading to an imbalance between damage and repair. Consequently, the levels of oxidative stress increase, and the excessive accumulation of ROS in combination with a reduction in mitochondrial function and respiratory metabolism result in neuronal damage. In addition, changes in synaptic physiology may contribute to alterations in neuronal connectivity and higher order integration (Bishop et al. 2010).

The preservation of good antioxidant mechanisms during aging is crucial to avoid aged-related oxidation. Two compounds with excellent antioxidant properties are vitamin E (VitE) and vitamin C (VitC). VitE is the most important lipid-soluble antioxidant (for review, see Brigelius-Flohe, 2006;

Correspondence

P. Marcos and M. M. Arroyo-Jiménez, Cellular Neuroanatomy and Molecular Chemistry of Central Nervous System, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas-University of Castilla-La Mancha, Avenida de Almansa 14, 02006 Albacete, Spain. E: Pilar.Marcos@uclm.es (P.M.) and E: Mariamar.Arroyo@uclm.es (M.M.A.-J.)

Accepted for publication 5 December 2017

Mocchegiani et al. 2014). VitE, and especially its α -tocopherol isoform, is a ROS scavenger that functions in membranes (Gohil et al. 2004; Ulatowski et al. 2014), where it also exhibits many non-antioxidant properties, including the inhibition of inflammatory signaling and the regulation of normal glial cell functions, adult hippocampal neurogenesis (Cecchini et al. 2003) and genetic functions (Brigelius-Flohe, 2006; Mocchegiani et al. 2014; Selvaraju et al. 2014). Of all of the VitE isomers, organisms preferentially retain RRR- α -tocopherol (Brigelius-Flohe, 2006) because it is selectively recognized by the α -tocopherol transfer protein (α TTP). VitE is taken up from food and stored in the liver, where α TTP selectively binds the RRR- α isoform (probably internalizing it via an endocytic process, Qian et al. 2004) and subsequently incorporates it into plasma lipoproteins and distributes it to other tissues, including the brain (Spector & Johanson, 2007; Mocchegiani et al. 2014). VitE transfer to neurons by simple diffusion occurs at a relatively low rate (Marin et al. 2014) that does not allow enough nutrients to be delivered to brain cells (Spector & Johanson, 2007). The amount of VitE in the brain (and specifically α -tocopherol) is highly regulated by an efficient homeostatic system that ensures that the correct levels of this neuroprotective nutrient are supplied to the brain by a carrier system (Martin et al. 1999; Manor & Morley, 2007; Spector & Johanson, 2007). The results of some studies have shown that the ability of the brain to uptake α -tocopherol is limited (Martin et al. 1999; Baxter et al. 2012) because of the regulatory effects exerted by α TTP. Alterations in α TTP have been shown to cause locomotion disorders as well as anxiety and loss of memory functions with age (Gohil et al. 2004). In humans, a deficiency or mutation in this transporter can lead to a pathology known as AVED (ataxia associated with vitamin E deficiency, see (Copp et al. 1999; Gohil et al. 2004; Marin et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014; Spector & Johanson, 2007)). All disorders associated with alterations in α TTP are ameliorated by treatment with high doses of VitE (Copp et al. 1999; Gohil et al. 2004; Brigelius-Flohe, 2006; Spector & Johanson, 2007; Mocchegiani et al. 2014; Ulatowski et al. 2014). Surprisingly, despite the fact that a large number of studies have indicated that α TTP is important for the proper internalization of VitE into the central nervous system and the fact that this antioxidant is not homogeneously distributed in cerebral tissues (Martin et al. 1999), no previous studies have provided a detailed description of the distribution of α TTP in the mammalian brain.

VitC is a water-soluble antioxidant, physiologically present as an ascorbate anion (Rice, 2000; Hansen et al. 2014; Harrison et al. 2014; Covenas et al. 2015). VitC is involved in numerous functions, including its role as a co-enzyme in noradrenalin synthesis and an agent in glutamate- and dopamine-mediated transmission (Rebec & Pierce, 1994; Covenas et al. 2011; Covenas et al. 2015), liberation of gonadotropins (Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015)

or neuronal maturation and myelin formation (Hansen et al. 2014). However, its best known function is its neuroprotective effect against the excessive accumulation of ROS (Rice, 2000; Harrison & May, 2009; Harrison et al. 2010, 2014). Because it operates as an electron donor, ascorbate can decrease excessive and neurotoxic levels of glutamate via a heteroexchange mechanism (Rice, 2000; Qiu et al. 2007). Similar to VitE, brain levels of VitC are homeostatically regulated and preferentially retained in the brain at the expense of its presence in other organs (Rice, 2000; Harrison & May, 2009; Harrison et al. 2010, 2014). The homeostatic regulation of VitC in the brain is considered a highly efficient process because it is very difficult to induce VitC deficiency in adult mammals even under conditions of dietary deficiency (for review see Spector & Johanson, 2007). The access of VitC to the brain parenchyma involves a two-step mechanism. First, it travels from the blood to the cerebrospinal fluid (CSF), then it travels from the CSF into brain cells (Harrison & May, 2009). Ascorbate can enter into cells in one of two forms. In its oxidized form, dehydroascorbic acid, VitC can use the glucose transporters present on cell membranes, and this process does not consume energy. Alternatively, the reduced form of VitC uses the saturable and sodium-dependent VitC transporter 2 (SVCT2), which requires a concentration gradient and energy consumption (Mun et al. 2006). This latter transporter is present in the choroid plexus epithelium and specialized tanocytes (Harrison & May, 2009). In the brain, SVCT2 is present on neurons but not on glial cells (Rice, 2000; Castro et al. 2001; Garcia Mde et al. 2005; Mun et al. 2006; Harrison & May, 2009; Harrison et al. 2010, 2014; Hansen et al. 2014), and neurons can therefore preferentially uptake ascorbate via active transport. As in the case for α TTP, SVCT2 is saturable by extracellular ascorbate, and this mode of entry of VitC into neurons is therefore limited (Qiu et al. 2007; Harrison & May, 2009). VitC can act synergistically with VitE because ascorbate can recycle the oxidated form of α -tocopherol (α -tocopheroxyl radical) back to α -tocopherol (Rice, 2000; Harrison & May, 2009; Harrison et al. 2010).

The effect of VitC on brain functions has been studied using a variety of approaches. The distribution patterns of VitC and SVCT2 in the brain have been reported in several mammalian species (Rice, 2000; Castro et al. 2001; Garcia Mde et al. 2005; Mun et al. 2006; Harrison & May, 2009; Mangas et al. 2009; Harrison et al. 2010, 2014; Covenas et al. 2011; Hansen et al. 2014; Covenas et al. 2015). Moreover, several animal models have been developed to study the effects of VitC deprivation or SVCT2 mutation (for review, see Harrison et al. 2014), and in some of these models, the combined effects of VitC and VitE deprivation have been explored. Studies performed in guinea pigs with moderate VitE deficiency showed that these animals were healthy despite the fact that α -tocopherol levels were decreased in the brain and plasma. Interestingly, when VitC

was removed from the diet of these animals, most of them developed progressive paralysis within 5–6 days and subsequently died within 24 h. Finally, administering ascorbate and VitE to aged mice improved their performance in memory tasks (Harrison & May, 2009).

VitE and VitC are transported into cells by separate carriers present throughout the BBB or choroid plexus, and the two vitamins are accumulated in brain cells via separate and specialized systems (Spector & Johanson, 2007). These two antioxidants perform many beneficial functions in the brain, and it is widely believed that they act synergistically. However, the antioxidant properties of these vitamins can change with aging, resulting in an imbalance in the brain redox state. Several studies have reported that deficient antioxidant activity leads to an increase in oxidative stress and cognitive decline (Hansen et al. 2014; Harrison et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014). Other authors have proposed that the age-dependent changes in vitamin levels reflects maturation rather than aging (Lykkesfeldt & Moos, 2005). Moreover, although the neuroprotective properties of VitE family members and VitC are clear, the numerous relevant studies available in the literature, most of which have focused on aging in humans, describe contradictory results (Hansen et al. 2014; Harrison et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014). It has been suggested that the inconclusive nature of these studies results from difficulties in selecting proper controls, partially because of a number of allelic differences that can affect vitamin metabolism (Mocchegiani et al. 2014). Hence, for this study, we chose a genetically stable mouse strain in which we age-matched the knockout mice.

In this study, we compared the distribution patterns of the vitamin transporters α TTP and SVCT2 in the brains of mice lacking DNA polymerase μ . This animal model is characterized by delayed brain aging, increased liver regenerative capacity, increased resistance to apoptosis, preserved motor function (Escudero et al. 2014) and improved learning capabilities and long-term potentiation during aging (Lucas et al. 2009).

The goals of this study were the following: (i) to use immunohistochemistry to map in detail the distribution patterns of α TTP and SVCT2 during aging in the brains of these animals; (ii) to use double-labeling methods to analyze the anatomical relationships between the two carriers; and (iii) to use double immunohistochemistry with neuronal nuclear antigen (NeuN), a marker of neurons, and glial fibrillary acid protein (GFAP), a marker of astrocytes, to determine whether each transporter is present in neurons or glial cells.

Methods

Sixty male mice were used in this study. They were separated into 12 groups ($n = 5$ in each group) by age and genotype, which was confirmed in each mouse using PCR. The following ages were used: 4, 12, 18 and 24 months old. The following genotypes were used:

wild type (wt); polymerase μ (Pol $\mu^{-/-}$) knock-out (KO), which resulted in animals that were highly resistant to aging processes, and heterozygote (+/-). The process used to generate Pol $\mu^{-/-}$ mice and their wt counterpart has been previously described. The genetic background included mixed 129/SVxBALB/c and wt littermates as well as C57BL/6J and FVB/N mice (Lucas et al. 2009).

All animals were housed under standard conditions for humidity, light and temperature, and provided free access to food and tap water. The animals were handled according to Spanish laws concerning animal welfare (RD 233/88, MAPA). This study was approved by the Ethical Committee for Animal Research of Castilla-La Mancha University (PR-2016-05-13).

The mice were anesthetized using an intraperitoneal injection of ketamine (75 mg kg^{-1}) and xylazine (10 mg kg^{-1}), and then transcardially perfused with cold saline solution and 4% paraformaldehyde. The brains were dissected from the skull, post-fixed in the same fixative for 24 h and then cut using a freezing microtome at $50 \mu\text{m}$. Each brain was split in half and cut coronally (left hemisphere) and sagittally (right hemisphere). Every fifth section was immediately mounted on a gelatine-coated slide for Nissl staining.

Other sections were processed for immunohistochemical (IHC) detection of vitamin transporters (SVCT2 and α TTP), GFAP (RRID: AB_10013382) or NeuN (RRID: AB_2651140) (single detection) or for double immunolabeling for SVCT2- α TTP, SVCT2-GFAP, α TTP-GFAP, SVCT2-NeuN or α TTP-NeuN.

The free-floating IHC protocol used during this study to perform single- and double-labeling was similar to methods previously described by our group (Marcos et al. 2013; Cebada-Sanchez et al. 2014). Single IHC reactions were performed after peroxidase activity was reduced using methanol and hydrogen peroxide (2 : 1). The sections were then extensively rinsed in Tris buffer saline (TBS) 0.1 M (pH 7.6). Blocking buffer containing 1% horse serum, 0.3% Triton X-100 was used to dilute each of the antibodies used for IHC. The sections were then incubated for 5 min in blocking buffer plus 0.5% bovine serum albumin. They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies that were diluted as follows: 1/100 for the vitamin transporters, 1/300 for NeuN, and 1/200 for GFAP (Supporting Information Table S1). After the sections were rinsed in TBS 0.1 M (pH 7.6) and blocking buffer, they were incubated at room temperature for 90 min with the appropriate biotinylated secondary antibodies (anti-goat or anti-rabbit), which were diluted 1/2000, and then with peroxidase-conjugated streptavidin (diluted 1/2000) for 90 min. The color reactions were then developed using the 3,3'-diaminobenzidine (DAB) method. The progress of reaction was monitored under a light microscope.

Two methods were used to perform the double-immunolabeling experiments. For SVCT2/ α TTP, because both primary antibodies were raised in the same species, we first performed IHC to detect SVCT2 (developed using DAB) and then performed the immunoreaction to detect α TTP on the same sections (developed using a previously described 4-chloro-1-naphtol method, Marcos et al. 2013). This same methodology was used to double-label cells for SVCT2/GFAP, α TTP/GFAP, SVCT2/NeuN and α TTP/NeuN. To confirm the results obtained using primary antibodies raised in different species, a double immunofluorescence protocol was performed. In these cases, the incubation with the primary antibodies was performed at 4°C for 48 h. Secondary biotinylated antibodies and streptavidin coupled to Alexa 488 were used to detect the vitamin transporters, and donkey anti-rabbit coupled to Alexa 568 secondary antibodies were used to detect GFAP or NeuN.

The primary goat anti- α TTP antibody (α TTP (C-14), RRID: AB_2651137; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) used in this study is an

affinity-purified polyclonal antibody that was raised against a peptide that maps to the C-terminus of human α TTP. The goat anti-SVCT2 antibody (SVCT2 (S-19), RRID: AB_661205; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) is an affinity-purified antibody that was raised against a peptide that maps near the N-terminus of rat SVCT2. The usual controls were performed to assure the specificity of both primary antibodies. No labeling was observed when brain sections were incubated with pre-immune serum. No immunoreactions were observed when anti-rat or anti-rabbit secondary antibodies were used. When the first antibody was preabsorbed, no immunostaining was detected (Supporting Information Fig. S1).

Sections were mounted on gelatin-coated slides, dehydrated (for DAB-reacted sections) and coverslipped using DPX. DAB/chloronaphthol-reacted sections were coverslipped in a mixture of glycerol/phosphate buffer (3 : 1), and fluorescent sections were coverslipped with DABCO.

All results were analyzed using a Nikon Eclipse 80-i microscope equipped with appropriate filters. Immunofluorescence was also examined using a LSM 710 Zeiss confocal microscope. 'The Mouse brain in stereotaxic coordinates' (Franklin & Paxinos, 2008) was used as a reference for mapping. Adobe PHOTOSHOP software was used to adjust only the contrast and brightness of the pictures shown in this article.

Results

The distribution of immunoreactivity (IR) in both cell bodies and fibers was analyzed throughout whole mouse brains separately for the two vitamin transporters. A similar distribution pattern was observed between the vitamin transporters at each studied age and in each genotype, and no variation in mapping was noted between the groups.

α TTP is more widely distributed than SVCT2, and many fiber tracts were α TTP-IR-positive but not SVCT2-IR-positive. For both transporters, cortical areas displayed only pericellular immunoreactivity, whereas in other brain regions, immunolabeling was clearly observed in cell bodies.

α TTP

Distribution of α TTP

α TTP-IR was distributed throughout the entire rostrocaudal length of the brain (Table 1). IR-positive cell bodies were especially abundant in the core of the *accumbens*, the piriform cortex, the ventral pallidum (Fig. 1A and B), the lateral division of the bed nucleus of the *stria terminalis*, the *globus pallidus*, the entopeduncular nucleus, the reticular nucleus of the thalamus (Fig. 1B), the dorsal *subiculum*, the *postsubiculum* and *parasubiculum*, and the medial entorhinal cortex. In the brainstem, numerous positive cell bodies were observed in the red nucleus and paratrochlear nucleus, the external cortex and central nucleus of the inferior colliculus, the ventral and dorsal nuclei of the lateral lemniscus, the tegmental nucleus, the mesencephalic trigeminal nucleus, the reticulotegmental nucleus of the pons, the deep and intermediate gray layers of the superior colliculus, and the facial nucleus.

Table 1 Results of immunostaining for both vitamin transporters classified by anatomical regions.

Cortical region	α TTP	SVCT2
AuC	–	+
Cg	+	+
FrA	+	+
IC	–	+
MC	+	+
OC	+	+
Pir	+	+
PoC	–	+
PrL	–	+
RSC	+	+
SC	+	+
VC	+	+
Telencephalic regions	α TTP	SVCT2
AcN	+	+
DTT	–	+
LSN	+	–
OB	+	+
st	+	–
STLD	+	–
Tu	–	+
VTT	–	+
Basal ganglia	α TTP	SVCT2
CPu	–	+
GP	+	–
VP	+	–
En	+	–
Amygdaloid complex	α TTP	SVCT2
AA	–	+
ACo	–	+
AHiAL	+	+
BL	+	+
BM	–	+
Ce	+	–
LAN	–	+
PMCo	–	+
Hippocampal formation	α TTP	SVCT2
DS	+	+
EC	+	+
Hip	+	+
MF	+	–
PaS	+	–
Post	+	–
PrS	+	–
VS	+	+
Fx	+	–

(continued)

α TTP-IR was also found in the neuropil of the external plexiform layer of the olfactory bulb and the piriform cortex, lateral septal nucleus, core of the *accumbens*,

Table 1. (continued)

Diencephalon	α TTP	SVCT2
Thalamus		
AVTN	–	+
AMTN	–	+
DLG	–	+
LDT	–	+
LPT	–	+
PG	+	–
Po	–	+
Rt	+	–
Hypothalamus		
StHy	+	–
MPA	+	–
MPO	+	–
VLPO	+	–
Subthalamus		
ZI	+	+
Brainstem	α TTP	SVCT2
Midbrain		
3n	+	–
BIC	+	+
CIC	+	+
cp	+	–
DLL	+	–
DpG	+	+
ECIC	+	+
InG	+	–
InWH	–	+
IPN	–	+
LL	+	–
Me5	+	–
Mo5	+	–
NST	+	–
Pa4	+	–
PAG	–	+
R	+	–
Sag	+	–
SN	+	+
Pons		
7N	+	–
7n	+	–
DC	+	–
TZ	–	+
PnC	–	+
RtTg	+	–
tz	+	–
VLL	+	+
Medulla oblongata		
IRt	–	+
Sp	+	–
sp5	+	–
Ve	+	–

Table 1. (continued)

Cerebellum	α TTP	SVCT2
CoP	+	–

The distribution of both vitamin transporters with each classified according to anatomical region. –: absence, +: presence.

3n, oculomotor nerve; 7N, facial nucleus; AA, anterior amygdaloid area; ac, anterior commissure; AcN, Accumbens nucleus; ACo, anterior cortical amygdaloid area; AHiAL, amygdalohippocampal area; AuC, auditory cortex; AMTN, anteromedial thalamic nucleus; AVTN, anteroventral thalamic nucleus; BIC, nucleus of Brachium of the inferior colliculus; BL, basolateral amygdaloid nucleus; BM, basomedial amygdaloid nucleus; CA1, Cornu Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); CA3, Cornu Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); Ce, central amygdaloid nucleus; Cg, cingulate cortex; CIC, central nucleus of the inferior colliculus; CoP, cerebellum, layer of Purkinje cells; cp, cerebral peduncle; CPU, caudate and putamen (striatum); DC, dorsal cochlear nucleus; DG, dentate gyrus; DLG, dorsal lateral geniculate nucleus; DLL, dorsal nucleus of the lateral lemniscus; DpG, deep gray layer of the superior colliculus; DS, dorsal subiculum; DTT, dorsal tenia tecta; EC, entorhinal cortex; ECIC, external cortex of the inferior colliculus; eml, external medullary lamina; En, entopeduncular nucleus; FrA, frontal association cortex; fmj, forceps major of the corpus callosum; gl, granular layer; GP, globus pallidus; hf, hippocampal fissure; Hip, hippocampus (dentate gyrus and Ammon's horn); IC, insular cortex; len, intermediate endopiriform claustrum; IGL, intergeniculate leaflet; ic, internal capsule; InG, intermediate gray layer of superior colliculus; InWH, intermediate white layer of the superior colliculus; IPN, interpeduncular nucleus; IRT, intermediate reticular nucleus; LAN, lateral amygdaloid nucleus; LDT, laterodorsal thalamic nucleus; LL, lateral lemniscus; LPLR, lateral posterior thalamic nucleus, laterorostral part; LPT, lateral posterior thalamic nucleus; LSN, lateral septal nucleus; LV, lateral ventricle; MC, motor cortex; Me5, mesencephalic trigeminal nucleus; MEC, medial entorhinal cortex; mf, mossy fibers; ml, molecular layer; MPA, medial preoptic area; Mo5, Motor root of the trigeminal nerve; MPO, medial preoptic nucleus; MVPO, medioventral periolivary nucleus; NST, nigrostriatal tract; OB, olfactory bulb; OC, orbital cortex; opt, optic tract; Pa4, paratrochlear nucleus; PAG, periaqueductal gray substance; Pa5, parasubiculum; PG, pregeniculate nucleus; pl, polymorphic layer; PMCo, posteromedial cortical amygdaloid area; Pn, pontine nuclei; PnC, pontine reticular nucleus; Po, posterior thalamic nuclear group; PoC, postrhinal cortex; Post, postsubiculum; Pr5, principal sensory trigeminal nucleus; PrCnF, precuneiform area; PrL, prelimbic cortex; PrS, presubiculum; py, pyramidal tract; pyl, pyramidal layer; R, red nucleus; RSC, retrosplenial cortex; Rt, reticular nucleus; RtTg, reticulotegmental nucleus of the pons; rs, rubrospinal tract; RSGc, retrosplenial granular cortex, c region; S1BF, primary somatosensory cortex, barrel field; Sag, sagulum nucleus; SC, somatosensory cortex; scc, splenium of the corpus callosum; SN, substantia nigra; Sp, spinal trigeminal nucleus; sp5, spinal trigeminal tract; StHy, striohypothalamic nucleus; sl, stratum lucidum; slm, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; SPO, superior paraolivary nucleus; sr, stratum radiatum; st, stria terminalis; STLD, bed nucleus of the stria terminalis, lateral division; SubG, superficial gray layer of the superior colliculus; tfp, transverse fibers of the pons; Tu, olfactory tubercle; TZ, nucleus of the trapezoid body; tz, trapezoid body; VC, visual cortex; Ve, vestibular nucleus; VL, ventrolateral nucleus of the thalamus; VLL, ventral nucleus of the lateral lemniscus; VLPO, ventrolateral pre-optic nucleus; VP, ventral pallidum; VPL, ventral posterolateral thalamic nucleus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus; VS, ventral subiculum; VTT, ventral tenia tecta; ZI, zona incerta.

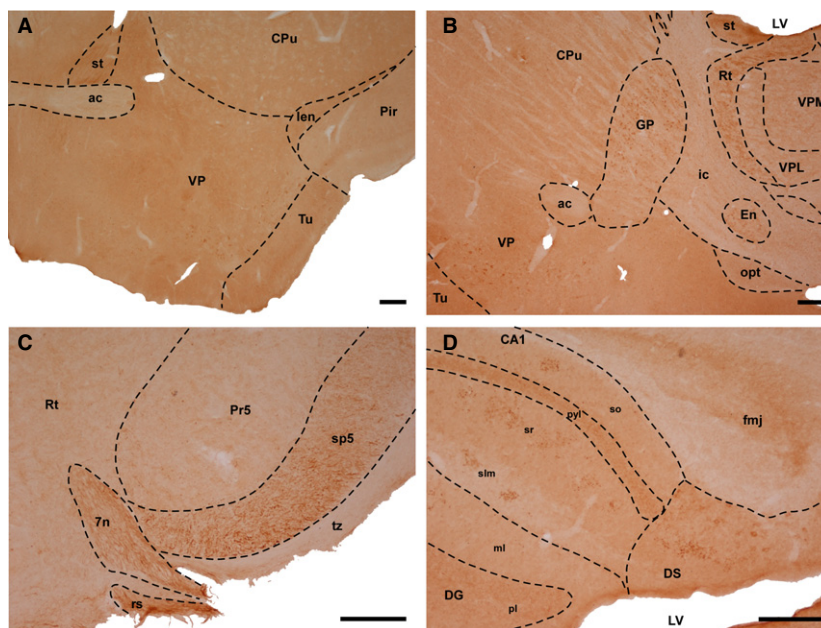


Fig. 1 Immunohistochemistry for α TTP. (A) Coronal section at the level of the anterior commissure (wt, 4 months old). (B) Sagittal section showing thalamic nuclei and the basal ganglia (wt, 12 months old). (C) Coronal section of the brainstem (wt, 24 months old). (D) Sagittal section including different components of the hippocampal formation (wt, 12 months old). Scale bar: 200 μ m. 7n, facial nucleus; ac, Anterior commissure; CA1, Cornu Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); CPu, caudate and Putamen (striatum); DG, dentate gyrus; DS, dorsal subiculum; En, entopeduncular nucleus; fmj, forceps major of the corpus callosum; GP, globus pallidus; len, intermediate endopiriform claustrum; ic, internal capsule; LV, lateral ventricle; ml, molecular layer; opt, optic tract; Pir, piriform cortex; pl, polymorphic layer; Pr5, principal sensory trigeminal nucleus; pyl, pyramidal layer; Rt, reticular nucleus; rs, rubrospinal tract; sIm, stratum lacunosum-moleculare; so, stratum oriens; sp5, spinal trigeminal tract; sr, stratum radiatum; st, stria terminalis; Tu, olfactory tubercle; tz, trapezoid body; VP, ventral pallidum; VPL, ventral posterolateral thalamic nucleus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus.

lateral division of the bed nucleus of the *stria terminalis*, nigrostriatal tract, fornix, entopeduncular nucleus, dorsal hippocampal commissure, cerebral peduncle, *substantia nigra*, dorsal entorhinal cortex, pyramidal cell layer of the hippocampus, *postsubiculum* and dorsal cochlear nucleus.

Fiber tracts, including the *stria terminalis* and cingulum, the mossy fibres of the hippocampus and the lateral lemniscus, spinal trigeminal tract and trapezoid body (Fig. 1C), as well as motor cranial nerves, including the oculomotor and facial nerves (Fig. 1C) and the motor root of the trigeminal nerve, displayed strong immunoreactivity for α TTP. These fibers were longitudinal, although in some processes dot-like puncta were also detected, including in the *strata radiatum* and *lacunosum moleculare* of the hippocampus, where they were mainly located in CA1 (Fig. 1D), and the piriform cortex and Purkinje cell layer of the cerebellum.

In cortical regions, α TTP-IR was only visualized in the pericellular area. The strongest cortical labeling was observed in the deep layers of the motor cortex, the retrosplenial granular and dysgranular cortices, and the primary somatosensory cortex in the barrel fields. Other cortical areas, such as the lateral orbital, frontal association cortex, secondary

visual, cingulate or primary somatosensory cortex, had a less pericellular profile of α TTP-IR.

Double-labeling of α TTP/GFAP and α TTP/NeuN

An analysis of sections that were double-immunolabeled for α TTP and GFAP revealed that this transporter was not located in glial cells (Fig. 2A and B). However, images from confocal microscopy showed that some of the dot-like accumulations of α TTP-IR were located in the Purkinje cell layer of the cerebellum, in which GFAP was also observed. This suggests that α TTP is present in Bergmann glial cells (Fig. 2C and D). In contrast, virtually all of the cell bodies with α TTP-IR contained NeuN-positive nuclei, demonstrating that α TTP is located in neurons (Fig. 3A–F).

SVCT2

Distribution of SVCT2

SVCT2-IR-positive cell bodies were widely distributed in the brain of these mouse models (Table 1), with the highest expression found in the thalamic nuclei (Fig. 4A), striatum (Fig. 4B), cortex and hippocampus (Fig. 4C and D). Although SVCT2-IR labeling was widely distributed in the thalamic nuclei, the strongest labeling was found in the

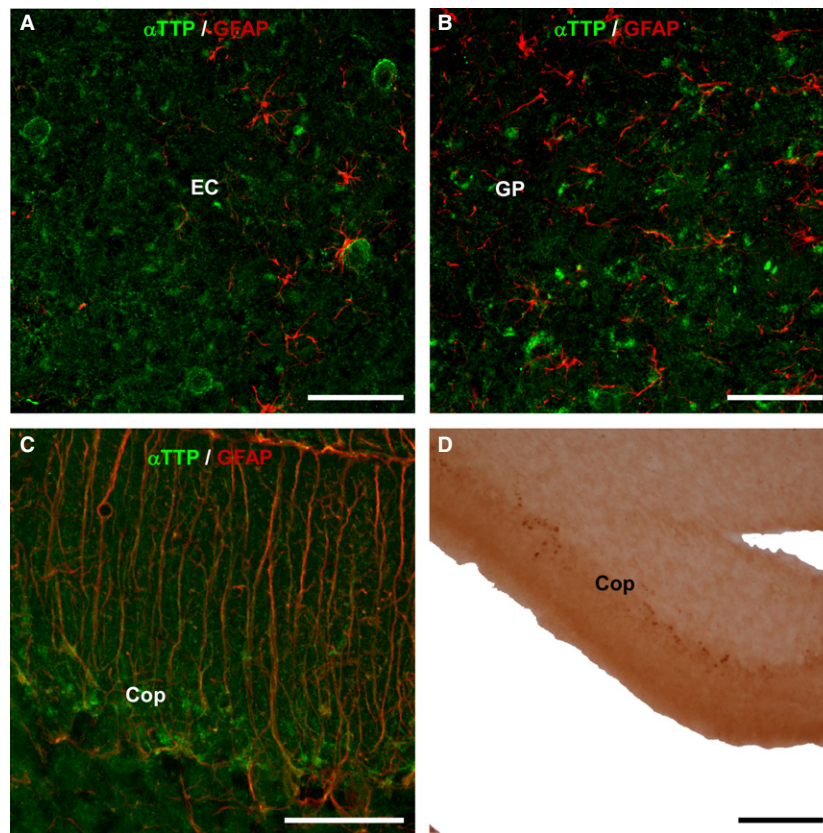


Fig. 2 Double immunohistochemistry for GFAP/ α TTP. The images were obtained using laser confocal microscopy and show double immunohistochemistry for GFAP (red) and α TTP (green) in 24-month-old KO mice. (A) Sagittal section showing the entorhinal cortex (EC). (B) Globus pallidus. (C) The Purkinje cell layer of the cerebellum contained some double-labeled cells that might represent Bergmann's glia. Otherwise, no double labeling was detected. (D) Coronal section of the cerebellum showing single labeling for α TTP (18 months old, heterozygote). Thick points can be observed in the layer of Purkinje cells. Scale bars: 50 μ m (A, B, C), 100 μ m (D). CoP, cerebellum, layer of Purkinje cells; EC, entorhinal cortex; GP, globus pallidus.

dorsomedial part of the laterodorsal thalamic nucleus, the mediodorsal and laterodorsal parts of the lateral posterior thalamic nucleus, the anteroventral and anteromedial thalamic nuclei, the posterior thalamic nuclear group, and the dorsal lateral geniculate nucleus (Fig. 4A). All hippocampal fields contained cell bodies with SVCT2-IR. Specifically, all layers of the dentate gyrus (mainly in the subgranular area) (Fig. 4C) and all CAs (mostly *stratum oriens* and the pyramidal layer) contained SVCT2-IR. The dorsal and ventral subiculum also exhibited strong SVCT2-IR. The entire rostro-caudal extent of the striatum (including the caudate and putamen) contained a homogeneous distribution of cell bodies with SVCT2-IR.

As was the case for α TTP, small grouped dots of SVCT2-IR were observed in specific locations within the mouse brain. These structures were especially evident in the *strata radiatum* and *lacunosum moleculare* of CA fields (Fig. 4D), although some of them were observed in the *stratum oriens* of CA1. These dot-like structures were also detected in the piriform cortex, surrounding the lateral olfactory tract, in the olfactory tubercle and the anterior olfactory area, and dorsal to the rhinal fissure.

In the cortex, as for α TTP, structures with pericellular SVCT2-IR were observed. The areas with the strongest labeling were the retrosplenial cortex (mainly the granular part) and the cingulate, motor, orbital and frontal association cortices. In the somatosensory, visual and auditory cortices, the expression of SVCT2 seemed to be stronger in the superficial and deep layers and weaker in intermediate layers.

Double-labeling for SVCT2/GFAP and SVCT2/NeuN

The analysis of double-immunolabeling for SVCT2 and GFAP showed that SVCT2 was not detected in astrocytes (Fig. 5A–D). In contrast, double-immunohistochemistry for SVCT2 and NeuN showed that SVCT2 is located in neurons (Fig. 6A–F).

Double-immunohistochemistry for α TTP/SVCT2

Individual mapping of α TTP and SVCT2 suggested that, in general, they have complementary distribution patterns in the mouse brain. This complementarity was clearly evident in some regions. For example, SVCT2-positive cell bodies

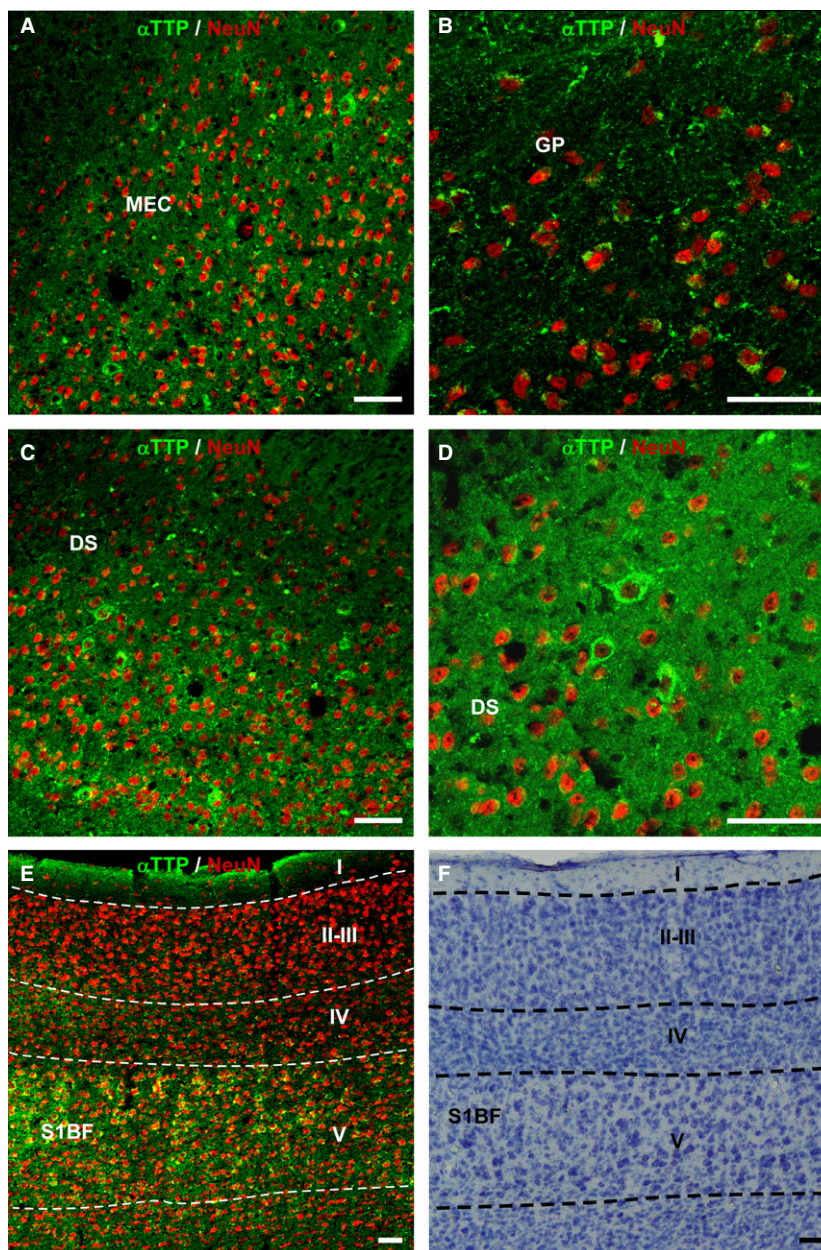


Fig. 3 Double labeling for α TTP (green) and NeuN (red) in 24-month-old heterozygote mice. (A) Sagittal section containing the medial entorhinal cortex. (B) Globus pallidus. (C) Dorsal subiculum. (D) Same region as that shown in (C) but at a higher magnification. (E) Somatosensory cortex, including the barrel fields. Cell bodies containing the transporter are also shown that were immunoreactive for NeuN. (F) Nissl-staining in a section adjacent to (E). Scale bar: 50 μ m. I-V, cortical layers; DS, dorsal subiculum; GP, globus pallidus; MEC, medial entorhinal cortex; S1BF, primary somatosensory cortex, barrel, field.

were detected in the hippocampus (Fig. 7A), whereas α TTP-IR was observed mostly in mossy fibers but in only a few cell bodies (Fig. 7B, C). While both transporters were detected in the basal ganglia, SVCT2 was also found in the striatum, and α TTP was also found in the *globus pallidus* and entopeduncular nucleus. In the auditory system, SVCT2 was present in the neurons of the nucleus of the trapezoid body, whereas the trapezoid body itself displayed immunoreactivity for α TTP (Fig. 7D). In the thalamus, α TTP was found only

in the neurons of the reticular nucleus, but the SVCT2 transporter was not. However, the remaining thalamic nuclei contained SVCT2-IR neurons.

Some degree of colocalization was observed in the inferior colliculus (Fig. 7E), dorsal *subiculum* and medial entorhinal cortex, and the deep layers of several cortical areas. Both vitamin transporters were detected in these regions, and sequential immunohistochemistry performed using the chromogens DAB and chloronaphthol showed

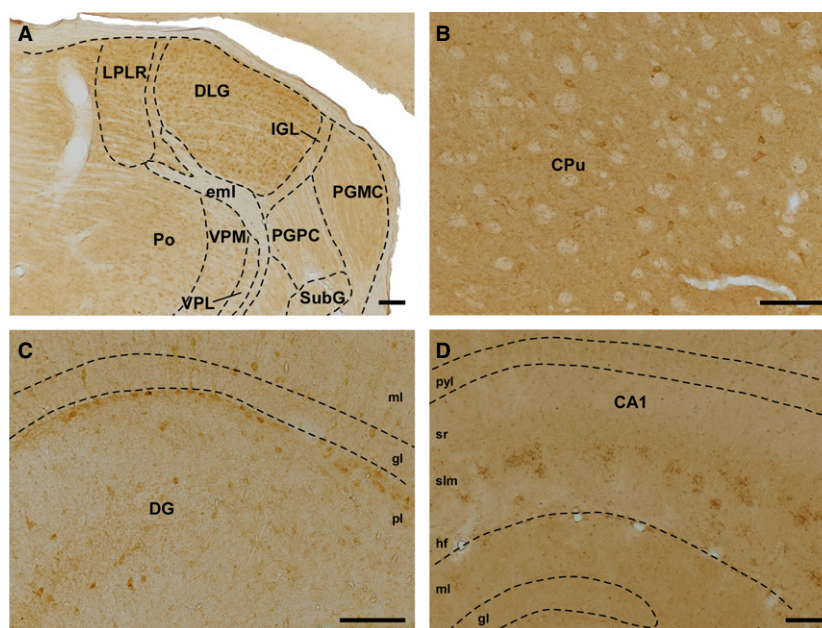


Fig. 4 Immunolabeling for SVCT2. (A) Coronal section of thalamic nuclei (wt, 18 months old). (B) Immunoreactivity for SVCT2 in the caudate and putamen (wt, 4 months old). (C) Sagittal section showing the different layers of the dentate gyrus, in which cell bodies are located mainly in the polymorphic layer (wt, 4 months old). (D) Sagittal section of CA1, in which thick SVCT2-positive profiles arranged in clusters are located in the stratum lacunosum moleculare (24 months old, KO). Scale bar: 100 μ m. CA1, Cornus Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); CPu, caudate putamen; DG, dentate gyrus; DLG, dorsal lateral geniculate nucleus; eml, external medullary lamina; gl, granular layer; hf, hippocampal fissure; IGL, intergeniculate leaflet; LPLR, lateral posterior thalamic nucleus; ml, molecular layer; PGMC, pregeniculate nucleus, magnocellular part; PGPC, pregeniculate nucleus, parvocellular part; pl, polymorphic layer; Po, posterior thalamic nuclear group; pyl, pyramidal layer; slm, stratum lacunosum-moleculare; sr, stratum radiatum; SubG, superficial gray layer of the superior colliculus; VPL, ventral posterolateral thalamic nucleus; VPM, ventral posteromedial thalamic nucleus.

that some pericellular structures were clearly double-labeled (Fig. 7F).

Discussion

α TTP and/or SVCT2 are transporters that play fundamental roles in the internalization of VitE and VitC in the CNS. We analyzed their neuroanatomical distribution patterns across different ages and genotypes of a mouse model of aging. The results showed that α TTP and/or SVCT2 immunoreactivity was similar across the different animal groups, supporting the physiological actions of these vitamins in the CNS.

Distribution of α TTP

To our knowledge, this is the first detailed mapping of IHC-detected α TTP in the rodent brain. α TTP has been detected in the rat brain using other techniques, such as Northern blot, RT-PCR and *in situ* hybridization (Hosomi et al. 1998). The results of *in situ* hybridization showed that the mRNA for α TTP is expressed only in the cerebellar cortex, probably in Bergmann glial cells (Hosomi et al. 1998), and the results obtained in the present work using confocal microscopy and double-immunohistochemistry for α TTP/GFAP support this notion (Fig. 2C). Bergmann

glial cells are important for Purkinje cell metabolism, and Ulatowski et al. (2014) demonstrated that VitE is essential for optimal Purkinje cell functions. Our findings provide a neuroanatomical basis for how VitE might be supplied to Purkinje neurons (Copp et al. 1999; Brigelius-Flohe, 2006; Patel et al. 2011; Johnson et al. 2013; Marin et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014; Ulatowski et al. 2014). Moreover, Northern blot analysis showed that α TTP is expressed in the cerebral cortex at very low levels (Hosomi et al. 1998), and in the present study we also detected this transporter in cortical regions as well as in many other regions of the mouse brain.

IHC has been used to detect α TTP in human brains to compare controls and patients with Alzheimer's disease, Down syndrome, and AVED (Copp et al. 1999). In normal human brains, no immunostaining was found. However, patients with each of these three pathologies showed immunoreactivity for α TTP in the soma and dendrites of Purkinje cells. In addition, some pyramidal neurons in CA2 were α TTP-positive in patients with Alzheimer's disease or Down syndrome. Our results are not in agreement with those of Copp et al. (1999) because we observed a wider and different distribution pattern for α TTP. However, this could be because of differences in species and/or methodologies.

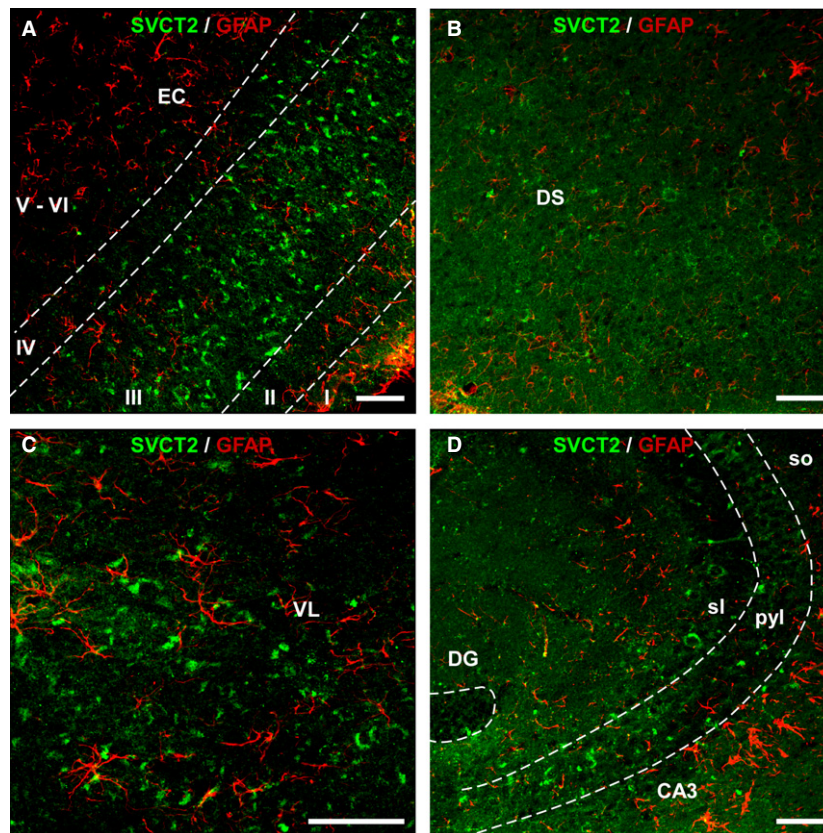


Fig. 5 Double immunohistochemistry for SVCT2 and GFAP. Images were obtained using laser confocal microscopy and show co-localization between SVCT2 (green) and GFAP (red) in 24-month-old wt mice. (A) Sagittal section showing the entorhinal cortex. (B) Dorsal subiculum. (C) Ventrolateral nucleus of the thalamus. (D) CA3 field of the hippocampal formation. No double labeling was found. Scale bar: 50 μ m. I-VI, cortical layers; CA3, Cornus Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); DG, dentate gyrus; DS, dorsal subiculum; EC, entorhinal cortex; pyl, pyramidal layer; sl, stratum lucidum; so, stratum oriens; VL, ventrolateral nucleus of the thalamus.

Other approaches have focused primarily on the analysis of vitamin concentrations (mainly α -tocopherol) in plasma and a variety of tissues, including the brain. In rats, Vatasery et al. (1984) reported that the highest concentration of α -tocopherol was found in the gray matter of the frontal cortex, followed by the thalamus and pons. Lower concentrations were detected in the medulla, caudate/putamen and hypothalamus, and the spinal cord and cerebellum exhibited the lowest levels. However, the authors noted that the cerebellum is a particularly active metabolizer of VitE because it showed high levels of α -tocopherol uptake. Hence, the vitamin concentration found in a particular cerebral region does not necessarily match its uptake level. The restricted distribution of α TTP that was observed in the cerebellum in the present study also supports this notion.

It has been previously reported that VitE plays a double role as both an antioxidant against brain oxidative stress and an anti-inflammatory agent against the inflammation associated with the pathogenesis of dementia and other neurodegenerative diseases (Mocchegiani et al. 2014). Moreover, mice deficient in α TTP exhibit anxiety and deficits in memory as they age (Gohil et al. 2004), suggesting

that the limbic system, and mainly the hippocampus, is affected by the depletion of VitE. In the present study, we detected α TTP in memory-related brain regions and their connections, supporting the role of VitE as a lipid-soluble antioxidant that protects lipids and membranes from oxidative damage (Brigelius-Flohe, 2006) since this transporter was observed not only in neurons but also in fiber tracts. Specifically, dot-like IR for α TTP was observed in the thick fibers of the *strata radiatum* and *lacunosum-moleculare* as well as in the mossy fibers that travel from the dentate gyrus to CA3 (Tables 1 and 2). This projection is an important component of the hippocampal circuit, which is essential for good memory functions. In addition, other brain regions that are also implicated in learning and memory processes, such the entorhinal cortex (which is the starting point of the perforant pathway to the dentate gyrus), exhibited strong α TTP immunostaining.

Other authors (Johnson et al. 2013) have detected α -tocopherol in many cortical areas in humans, and the results of our study provide a more detailed description of the distribution of α TTP in different cortical layers and its wider distribution throughout the cortex. The distribution of cortical

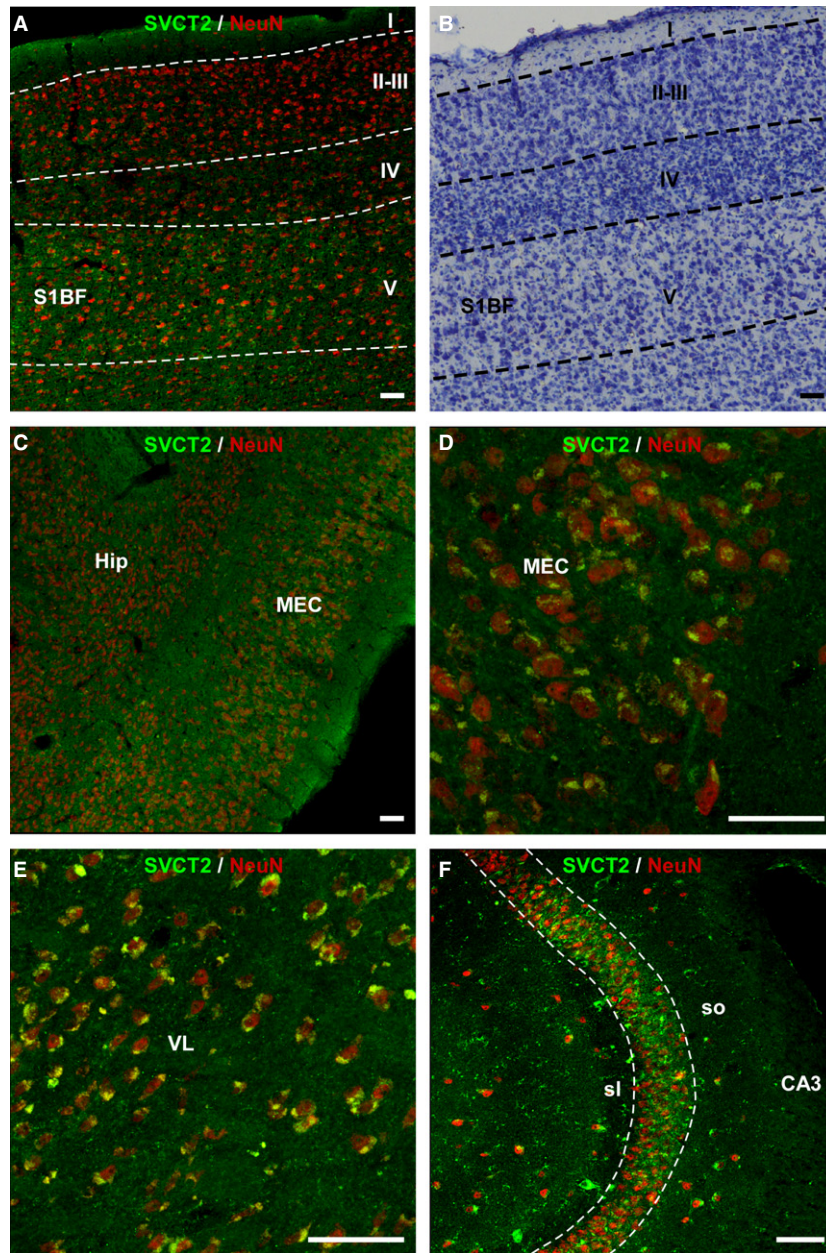


Fig. 6 Double-immunolabeling for SVCT2 (green) and NeuN (red) in 18-month-old heterozygote mice. (A) Somatosensory cortex including the barrel fields. (B) Nissl-stained section adjacent to the section shown in (A). (C) Sagittal section showing the medial entorhinal cortex. (d) Higher magnification of the image shown in (C). (E) Ventrolateral nucleus of the thalamus. (F) The CA3 field of the hippocampal formation. Cell bodies with SVCT2-immunoreactivity also contained NeuN. Scale bar: 50 μ m. I-V, cortical layers; CA3, Cornus Ammonis, Ammon's horn (field of the hippocampus); Hip, hippocampus; MEC, medial entorhinal cortex; sl, stratum lucidum; so, stratum oriens; VL, ventrolateral nucleus of the thalamus.

immunolabeling was different from that in other brain areas because it was pericellular and not cytoplasmatic. This may help to balance excessive glutamate concentrations, which can be neurotoxic and lead to neurodegeneration and were observed in extracellular spaces. This finding is in agreement with previous studies that reported that VitE plays a prophylactic role in preventing glutamate-induced injury and cell death (Rati Selvaraju et al. 2014).

Distribution of SVCT2

The distribution of the VitC transporter SVCT2 was previously mapped in the rat brain using immunohistochemistry (Mun et al. 2006). In addition, SVCT2 has been detected in embryonic mouse neurons (Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015) and in mouse hypothalamic glial cells (Garcia Mde et al. 2005). The results obtained in the present study

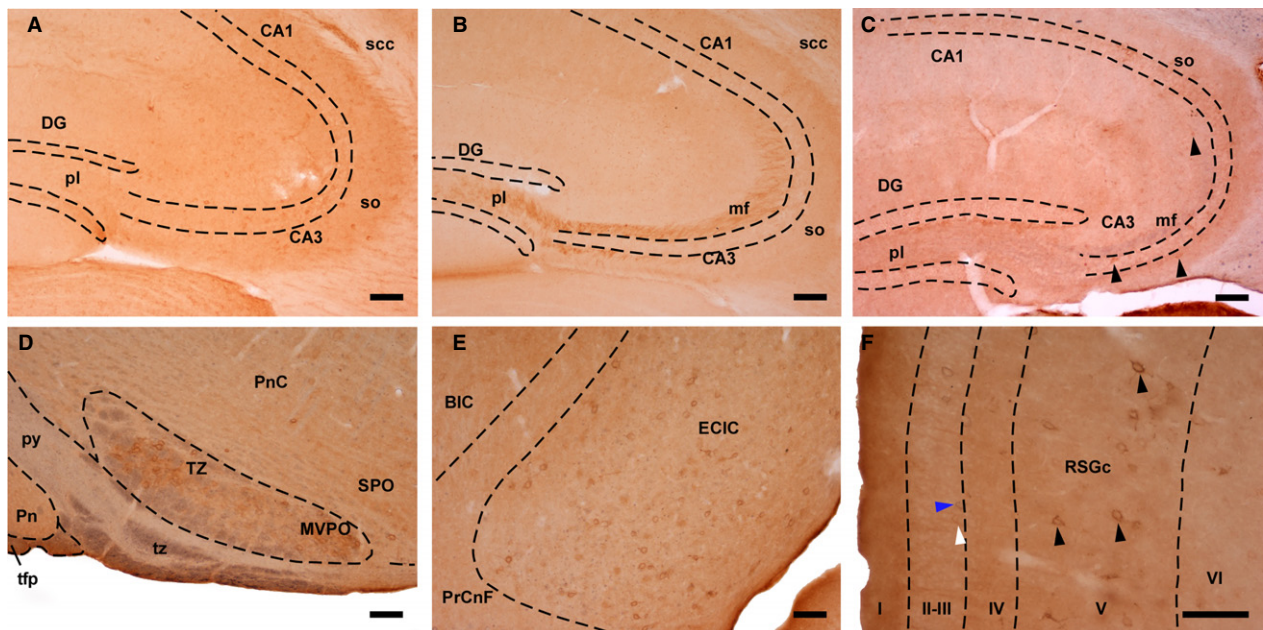


Fig. 7 Double-immunostaining for SVCT2 and α TTP. (A) SVCT2-immunoreactive profiles in the hippocampal formation (heterozygote, 4 months old). (B) Mossy fibers displayed TTP α -immunoreactivity (wt, 24 months old). (C) Coronal section of the hippocampus, in which SVCT2 (brown precipitate) and α TTP (blue color) were observed (wt, 24 months old). Arrowheads: SVCT2-positive neurons. (D) Sagittal section of the brainstem displaying the trapezoid body (tz), which was positive for α TTP (blue color), and the nucleus of the trapezoid body (TZ), which contained SVCT2-immunoreactive (brown precipitate) neurons (heterozygote, 4 months old). (E) Sagittal section of the inferior colliculus showing neurons exhibiting double immunostaining (wt, 24 months old). (F) Coronal section of the granular part of the retrosplenial cortex, in which pericellular immunostaining for SVCT2 (white arrowhead) and α TTP (blue arrowhead) as well as double-labeled cells (black arrowheads) were observed (wt, 24 months). Scale bar: 100 μ m. I-VI, cortical layers; BIC, nucleus of the brachium of the inferior colliculus; CA1 and CA3, Cornus Ammonis, Ammon's horn (fields of the hippocampus); DG, dentate gyrus; ECIC, external cortex of the inferior colliculus; mf, mossy fibers; MVPO, medioventral periolivary nucleus; pl, Polymorphic layer; Pn, pontine nuclei; PnC, pontine reticular nucleus; PrCnF, precuneiform area; py, pyramidal tract; RSGc, retrosplenial granular cortex, c region; scc, splenium of the corpus callosum; so, stratum oriens; SPO, superior paraolivary nucleus; tpf, transverse fibers of the pons; TZ, nucleus of the trapezoid body; tz, trapezoid body.

agree with these and other previous studies (Rice, 2000; Harrison & May, 2009; Harrison et al. 2010) showing that SVCT2 is present in neurons but not in astrocytes. Garcia Mde et al. (2005) restricted their analysis to the hypothalamus, and they did find that SVCT2 was present in GFAP-positive tanycytes. Although this finding is not totally in line with our results, both studies detected SVCT2 in the GFAP-negative ependymal cells of the ventricles. Because it has been suggested that tanycytes are not enough to carry a vitamin from the cerebrospinal fluid to the brain interstitium, the presence of SVCT2 in these cells supports the notion that this transporter plays a role in the uptake of VitC by choroid plexus cells (for review, see Harrison & May, 2009).

The distribution pattern of SVCT2 in the rat brain was described by Mun et al. (2006) but we found that it was different in the mouse brain. In the rat brain, only cell bodies were positive for SVCT2, whereas we observed SVCT2-IR in cellular processes and cell bodies. Mun et al. (2006) did not find immunolabeling in striatum, nucleus *accumbens* or any thalamic nucleus, whereas we found that in mice, these regions displayed strong immunolabeling. Conversely, no

immunoreactivity was observed in the hypothalamus or the cerebellum in the present study, whereas intense SVCT2-IR was observed in many hypothalamic nuclei and in the Purkinje cell layer in the rat. Similar results were obtained by Oyarce et al. (2017) in mouse Purkinje cells. Finally, in both species, strong immunostaining was observed in neurons of cortex and hippocampus, although the patterns were not perfectly aligned.

Thus, the distribution of SVCT2 varies across brain regions, and some authors have suggested that the distribution of VitC mirrors the distribution of its transporter (see Harrison et al. 2010). However, Harrison et al. (2010) reported that the level of VitC in a tissue does not always depend on the level of SVCT2. This mismatch is potentially explained by which of the two possible mechanisms is used to internalize ascorbate into neurons. SVCT2-mediated transport is the main route used by neurons (Garcia-Krauss et al. 2016); however, when HPLC is used to measure VitC levels in brain extracts, the results include all VitC that is obtained via both mechanisms (Harrison et al. 2010). Thus, a higher level of VitC than SVCT2 is expected. Furthermore, because SVCT2 was absent from astrocytes (Castro et al. 2001; Garcia Mde

Table 2 Results of immunostaining for both vitamin transporters classified by functional regions.

Limbic system	α TTP	SVCT2
Cg	+	+
PrL	+	+
RSC	+	+
DS	+	+
EC	+	+
Hip	+	+
MF	+	-
PaS	+	-
Post	+	-
PrS	+	-
VS	+	+
AA	-	+
ACo	-	+
AHiAL	+	+
BL	+	+
BM	-	+
Ce	+	-
LAN	-	+
PMCo	-	+
AcN	+	+
LSN	+	-
ST	+	-
STLD	+	-
AVTN	-	+
AMTN	-	+
Fx	+	-
Visual system	α TTP	SVCT2
DLG	-	+
LPT	-	+
PG	+	-
VC	+	+
Motor functions	α TTP	SVCT2
MC	+	+
CPu	-	+
GP	+	-
VP	+	-
En	+	-
ZI	+	+
3n	+	-
Me5	+	-
Mo5	+	-
NST	+	-
Pa4	+	-
R	+	-
SN	+	+
7N	+	-
7n	+	-
PnC	-	+
RtTg	+	-
CoP	+	-
cp	+	-

(continued)

Table 2. (continued)

Hormonal control	α TTP	SVCT2	
StHy	+	-	
MPA	+	-	
MPO	+	-	
Auditory system	α TTP	SVCT2	
AuC	-	+	
BIC	+	+	
CIC	+	+	
DLL	+	-	
ECIC	+	+	
DC	+	-	
TZ	-	+	
LL	+	-	
tz	+	-	
VLL	+	+	
Sag	+	-	
Somatosensorial	α TTP	SVCT2	
SC	+	+	
Po	-	+	
Rt	+	-	
InG	+	-	
InWH	-	+	
Sp	+	-	
sp5	+	-	
Ve	+	-	
Olfactory system	α TTP	SVCT2	
DTT	-	+	
OB	+	+	
Tu	-	+	
VTT	-	+	
Pir	+	+	
Other functions	α TTP	SVCT2	Function
FrA	+	+	Associative learning, stimulus integration
OC	+	+	Motivation, social behavior
PoC	-	+	Memory, spacial navigation
DpG	+	+	Multiple sensorial-eye movement
IPN	-	+	REM sleep
PAG	-	+	Pain modulation
IRt	-	+	Motor, sleep, pain modulation, CVC regulation
VLPO	+	-	Non-REM sleep

The distribution of both vitamin transporters with each classified according to functional region. -, absence, +, presence. See abbreviations in footnotes to Table 1.

et al. 2005; Harrison et al. 2010; Harrison & May, 2009; present study), the level of VitC should be higher in areas with a high concentration of neurons, such as the cortex or hippocampus. Numerous studies have focused on describing the distribution and/or concentration of VitC and/or ascorbate anion in the mammalian brain, including humans (Oke et al. 1987). For example, a previous study using immunohistochemistry in the macaque monkey found that the only cell bodies containing VitC were located in the primary somatosensory cortex (Coveñas et al. 2011), whereas in a immunohistochemical study carried out in children, VitC was observed in several brainstem regions (Covenas et al. 2015). Our results are partially in agreement with these reports, although the distribution of SVCT2 described in the present study does not totally match the pattern described for VitC in children's brainstem. Differences in the level of VitC across brain regions are related to which cell types are located within each area. For example, in multiple species, brain ascorbate levels increase linearly as neuronal density increases in adult cerebral cortex (Rice, 2000). This finding is consistent with the fact that oxidative metabolism occurs at a higher rate in neurons than in glial cells, and in agreement with the results of previous studies of the distribution and retention of VitC in the mouse brain (Harrison et al. 2010). This is also in agreement with the results obtained in the present study, in which we found that SVCT2 is present in regions with a high neuronal density, such is the cortex, thalamus, striatum and hippocampus.

Double immunohistochemistry for α TTP/SVCT2

In general, both vitamin transporters are present in similar brain regions. They are widely distributed in limbic structures, and the visual and auditory systems contain numerous areas that express one or both of these transporters. However, α TTP was more widely expressed than SVCT2 in motor and somatosensory regions and was the only one that was detected in the hypothalamic nuclei that are associated with hormonal control (Table 2). Additionally, SVCT2 was more widely distributed than α TTP in olfactory structures and in regions implicated in functions including REM sleep, pain modulation, and spatial navigation (Table 2).

The results obtained in the present study show that there was a complementary distribution pattern between these vitamin transporters in some brain areas. In the basal ganglia, SVCT2 was detected in the striatum, and α TTP was detected in the *globus pallidus*. In the auditory pathway, α TTP was observed in the trapezoid body, whereas SVCT2 was found in the nucleus of the trapezoid body. In addition, some brain regions, such as the inferior colliculus, entorhinal cortex, dorsal *subiculum* and cortex, contain neurons that were double-labeled for α TTP and SVCT2. These separate but coincident distribution patterns could be a morphological reflection of interactions between the two vitamins. VitC works synergistically with VitE to protect

neurons against the oxidative stress damage caused by free radicals (Rice, 2000; Harrison et al. 2010). In the mouse cerebral cortex, lower levels of VitC are clearly associated with higher levels of lipid peroxidation products (Harrison et al. 2010). Interestingly, VitC can intercept free radicals in the aqueous phase before they attack lipids (Harrison et al. 2014), and VitE is the first line of defence against the peroxidation of lipid membranes (Brigelius-Flohe, 2006; Patel et al. 2011; Mocchegiani et al. 2014). The antioxidant activity of α -tocopherol prevents the uncontrolled propagation of lipid peroxidation and produces a tocopheroxyl radical, which requires ascorbate to be regenerated back to reduced tocopherol (for review, see Dolu et al. 2015; Mocchegiani et al. 2014). In cortical regions, both transporters were pericellularly localized, suggesting that they are important in regulating the homeostasis of the extracellular compartment. The level of vitamins in the extracellular fluid is important for regulating synaptic communication, and in this sense, ascorbate may be a potential candidate extracellular neuromodulator (Rebec & Pierce, 1994; Rice, 2000).

Animal model and aging

Because allelic variations can alter the efficiency of the metabolic pathways that regulate vitamin storage and removal (Baxter et al. 2012; Harrison et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014), the genetic background of a model system is important. In fact, there is increasing interest in studies that explore the influence of gene expression on these two vitamins (Brigelius-Flohe, 2006; Harrison et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014; Oyarce et al. 2017). During aging, the expression of genes involved in stress-response pathways increases. However, not all genes exhibit altered expression in the same way in all organisms. In the aging mouse brain, no age-related changes in expression have been found in genes implicated in inhibitory interneuron function or in myelin-related or glial genes, all of which are altered in humans during aging (for review, see Bishop et al. 2010).

According to the 'free radical theory of aging' developed by Harman in 1956 (Harman, 1972; Haigis & Yankner, 2010; Yeoman et al. 2012), a common feature of all organisms is that oxidative stress increases with aging. However, more recently it has been reported that this increase is not the principle determinant of the aging process, and it seems that altered redox-sensitive signaling pathways are more important for CNS aging (Yeoman et al. 2012). Hence, Pol $\mu^{-/-}$ mice, which exhibit fewer signs of brain aging and higher resistance to oxidative damage (Lucas et al. 2009; Escudero et al. 2014), are an excellent animal model for studying the distribution patterns of these two important antioxidant transporters. The data currently available for this animal model indicate that the Pol $\mu^{-/-}$ phenotype is strongly dependent on oxidative stress levels, shows a more efficient mitochondrial function, a lower level of apoptosis

in the liver and brain, and above-normal genomic stability (Escudero et al. 2014). In addition, Pol $\mu^{-/-}$ mice provide advantages related to the two most important age-associated changes, which are learning and memory functions, and motor performance. Significantly better sensorimotor coordination was observed in the rota-rod test in mice lacking DNA polymerase μ than in controls, even at older ages, and the KO mice maintained the ability to learn at older ages, whereas the wild-type mice did not (Lucas et al. 2009). Our results provide an anatomical basis for these behaviors. The distribution pattern observed for each vitamin transporter was constant across the genetic groups and between groups with different ages. This ability to maintain the antioxidant levels during aging may support the maintenance of the above described capacities in older mice. Some characteristics have been previously reported to be unchanged in this animal model. For example, there was no difference in the mossy fibers (in which we detected α TTP) traveling from the dentate gyrus to CA3 between 4-month-old wild-type and Pol $\mu^{-/-}$ mice (Lucas et al. 2009). On the other hand, the consistency in these distribution patterns could be related to the animals' age. In guinea pigs and rats (Lykkesfeldt & Moos, 2005), the reduction in VitC status that occurs with age begins early in life and is a phenomenon that is associated with maturation rather than aging. In these species, VitC concentrations significantly declined in young animals (i.e. those under 6 months of age in guinea pigs and under 3 months in rats), but there was no further significant decline in older animals, suggesting that degenerative oxidation processes might begin earlier than is presently acknowledged. A similar pattern was observed in α TTP-deficient mice, which lose their synapses early but in older ages exhibit minimal differences with matched-age wild-type animals (Gohil et al. 2004). This was also the case in the present study, but further studies are required because we did not include animals younger than 4 months old.

Another age-related feature, neuroinflammation and subsequent astrogliosis, was not detected in our studies. The sizes and shapes of astrocytes remained the same across all of the experimental groups, and there was no apparent difference in glial density. The preservation of glial cells during aging also contributed to the maintenance of brain functions in this animal model (Lucas et al. 2009). These results support previous data demonstrating that α -tocopherol and α TTP are required for the normal functions of glial cells (Gohil et al. 2004).

Functional correlation: antioxidant activity

The effects of antioxidants on learning have been widely reported in the literature and it is currently thought that antioxidant nutrients exert beneficial effects by preventing neurodegeneration and dementia (Rice, 2000; Hansen et al. 2014; Harrison et al. 2014; Mocchegiani et al. 2014; Dolu

et al. 2015; Warner et al. 2015). In aged mice, the administration of ascorbate in combination with VitE improved performance on a passive avoidance task (for review, see Harrison & May, 2009). Our results provide anatomical support for these data because we found that these two vitamin transporters are present in the hippocampus and other regions of the hippocampal formation, such as the entorhinal cortex and the dorsal *subiculum*.

On the other hand, it seems that the administration of high doses of these vitamins did not produce remarkable effects except in cases of previous deficiency (Brigelius-Flohe, 2006; Harrison & May, 2009; Figueroa-Mendez & Rivas-Arancibia, 2015). Because the two transporters of these vitamins are saturable, treatment with high doses of these vitamins results in a plateau in their concentration in the brain. Although the results of studies exploring the benefits that vitamin supplementation provides to learning and memory functions and motor performance in normal subjects have been inconclusive, it is widely reported that a deficit in VitE or VitC causes harmful effects, mainly because the loss of their neuroprotective effects results in massive neuronal death. These deficits also lead to an increase in oxidative stress that is not homogeneously distributed throughout the brain, suggesting that some regions are more resistant to this type of stress. Thus, a region containing VitE and/or VitC transporters could be more resistant to oxidation, neurotoxicity and further neuronal death. Our results indicate that each of these vitamin transporters has a widespread and constant distribution pattern. Furthermore, double-labeling experiments showed that the neuronal profiles of these transporters overlap in regions with high neuronal density and a high metabolic rate, where antioxidant substances are especially important.

Conclusions

Our results show that α TTP and SVCT2 are widely distributed throughout the entire brain in wt, heterozygous and Pol $\mu^{-/-}$ mice. These distribution patterns remain similar with age. The presence of these transporters in regions implicated in learning and memory as well as in motor control may explain the maintenance of these abilities that is observed in these animals when they reach old age. Vitamins E and C may be taken up into neurons by their respective carriers, whereupon they exert their antioxidant properties in addition to performing other physiological functions. Our results provide an anatomical basis that may help to explain their higher resistance to brain oxidative stress, which allows them to achieve better motor performance and learning abilities in old age.

Acknowledgements

This work was supported by Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Spain (grants PEII-2014-003 and PEII-2014-040-P) and

University of Castilla-La Mancha (UCLM, Spain) grants. We extend many thanks to D. Lucas and A. Bernad for providing the Pol μ mice, to M. J. Lagartos and M. Íñiguez de Onzoño for performing the PCR analysis, and J. R. Marín Tebar for his technical assistance with confocal microscopy.

Conflict of interest

None.

Author contributions

P. Marcos: concept/design, acquisition of data, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. J. González-Fuentes: concept/design, acquisition of data, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. L. Castro-Vázquez: data interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. M. V. Lozano: data interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. M. J. Santander-Ortega: data interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. V. Rodríguez-Robledo: data interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. N. Villaseca-González: data interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article. M. M. Arroyo-Jiménez: concept/design, data analysis and interpretation, drafting of the manuscript, critical revision of the manuscript, approval of the article.

Non-author contributors: D. Lucas and A. Bernad: provided the Pol μ mice. M. J. Lagartos and M. Íñiguez de Onzoño: PCR analysis. J. R. Marín Tebar: technical assistance with confocal microscopy.

References

- Baxter LL, Marugan JJ, Xiao J, et al. (2012) Plasma and tissue concentrations of alpha-tocopherol and delta-tocopherol following high dose dietary supplementation in mice. *Nutrients* **4**, 467–490.
- Bishop NA, Lu T, Yankner BA (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature* **464**, 529–535.
- Brigelius-Flohe R (2006) Bioactivity of vitamin E. *Nutr Res Rev* **19**, 174–186.
- Castro M, Caprile T, Astuya A, et al. (2001) High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem* **78**, 815–823.
- Cebada-Sanchez S, Insausti R, Gonzalez-Fuentes J, et al. (2014) Distribution of peptidergic populations in the human dentate gyrus (somatostatin [SOM-28, SOM-12] and neuropeptide Y [NPY]) during postnatal development. *Cell Tissue Res* **358**, 25–41.
- Cecchini T, Ciaroni S, Ferri P, et al. (2003) Alpha-tocopherol, an exogenous factor of adult hippocampal neurogenesis regulation. *J Neurosci Res* **73**, 447–455.
- Copp RP, Wisniewski T, Hentati F, et al. (1999) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in the brains of patients with ataxia with vitamin E deficiency and other oxidative stress related neurodegenerative disorders. *Brain Res* **822**, 80–87.
- Covenas R, Gonzalez-Fuentes J, Rivas-Infante E, et al. (2015) Developmental study of vitamin C distribution in children's brainstems by immunohistochemistry. *Ann Anat* **201**, 65–78.
- Coveñas R, Mangas A, Bodet D, et al. (2011) Vitamin C in the monkey brain. In: *Vitamin C: Nutrition, Side Effects and Supplements*. (ed. Jackson CME), pp. 275–288: Nova Science.
- Dolu N, Khan A, Dokutan S (2015) Effect of vitamin E administration on learning of the young male rats. *J Exp Neurosci* **9**, 81–85.
- Escudero B, Lucas D, Albo C, et al. (2014) Pol μ deficiency increases resistance to oxidative damage and delays liver aging. *PLoS ONE* **9**, e93074.
- Figuroa-Mendez R, Rivas-Arancibia S (2015) Vitamin C in health and disease: its role in the metabolism of cells and redox state in the brain. *Front Physiol* **6**, 397.
- Franklin KBJ, Paxinos G (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam; Oxford: Elsevier.
- Garcia Mde L, Salazar K, Millan C, et al. (2005) Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia* **50**, 32–47.
- Garcia-Krauss A, Ferrada L, Astuya A, et al. (2016) Dehydroascorbic acid promotes cell death in neurons under oxidative stress: a protective role for astrocytes. *Mol Neurobiol* **53**, 5847–5863.
- Gohil K, Godzdanker R, O'Roark E, et al. (2004) Alpha-tocopherol transfer protein deficiency in mice causes multi-organ deregulation of gene networks and behavioral deficits with age. *Ann N Y Acad Sci* **1031**, 109–126.
- Haigis MC, Yankner BA (2010) The aging stress response. *Mol Cell* **40**, 333–344.
- Hansen SN, Tveden-Nyborg P, Lykkesfeldt J (2014) Does vitamin C deficiency affect cognitive development and function? *Nutrients* **6**, 3818–3846.
- Harman D (1972) Free radical theory of aging: dietary implications. *Am J Clin Nutr* **25**, 839–843.
- Harrison FE, May JM (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* **46**, 719–730.
- Harrison FE, Green RJ, Dawes SM, et al. (2010) Vitamin C distribution and retention in the mouse brain. *Brain Res* **1348**, 181–186.
- Harrison FE, Bowman GL, Polidori MC (2014) Ascorbic acid and the brain: rationale for the use against cognitive decline. *Nutrients* **6**, 1752–1781.
- Hosomi A, Goto K, Kondo H, et al. (1998) Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *Neurosci Lett* **256**, 159–162.
- Johnson EJ, Vishwanathan R, Johnson MA, et al. (2013) Relationship between serum and brain carotenoids, alpha-tocopherol, and retinol concentrations and cognitive performance in the oldest old from the georgia centenarian study. *J Aging Res* **2013**, 951786.
- Lucas D, Escudero B, Ligos JM, et al. (2009) Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair. *PLoS Genet* **5**, e1000389.
- Lykkesfeldt J, Moos T (2005) Age-dependent change in Vitamin C status: a phenomenon of maturation rather than of ageing. *Mech Ageing Dev* **126**, 892–898.

- Mangas A, Covenas R, Bodet D, et al.** (2009) Vitamins in the monkey brain: An immunocytochemical study. *J Chem Neuroanat* **38**, 1–8.
- Manor D, Morley S** (2007) The alpha-tocopherol transfer protein. *Vitam Horm* **76**, 45–65.
- Marcos P, Arroyo-Jimenez MM, Lozano G, et al.** (2013) Mapping of tyrosine hydroxylase in the diencephalon of alpaca (*Lama pacos*) and co-distribution with somatostatin-28 (1-12). *J Chem Neuroanat* **50–51**, 66–74.
- Marin T, Contreras P, Castro JF, et al.** (2014) Vitamin E dietary supplementation improves neurological symptoms and decreases c-Abl/p73 activation in Niemann-Pick C mice. *Nutrients* **6**, 3000–3017.
- Martin A, Janigian D, Shukitt-Hale B, et al.** (1999) Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Res* **845**, 50–59.
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, et al.** (2014) Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev* **14**, 81–101.
- Mun GH, Kim MJ, Lee JH, et al.** (2006) Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res* **83**, 919–928.
- Oke AF, May L, Adams RN** (1987) Ascorbic acid distribution patterns in human brain. A comparison with nonhuman mammalian species. *Ann N Y Acad Sci* **498**, 1–12.
- Oyarce K, Silva-Alvarez C, Ferrada L, et al.** (2017) SVCT2 is expressed by cerebellar precursor cells, which differentiate into neurons in response to ascorbic acid. *Mol Neurobiol* **54**, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0366-5>
- Patel V, Rink C, Khanna S, et al.** (2011) Tocotrienols: the lesser known form of natural vitamin E. *Indian J Exp Biol* **49**, 732–738.
- Qian J, Wilson K, Nava P, et al.** (2004) Intracellular localization of alpha-tocopherol transfer protein and alpha-tocopherol. *Ann N Y Acad Sci* **1031**, 330–331.
- Qiu S, Li L, Weeber EJ, et al.** (2007) Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res* **85**, 1046–1056.
- Rati Selvaraju T, Khaza'ai H, Vidyadaran S, et al.** (2014) Cytoprotective effect of tocotrienol-rich fraction and alpha-tocopherol vitamin E isoforms against glutamate-induced cell death in neuronal cells. *Int J Vitam Nutr Res* **84**, 140–151.
- Rebec GV, Pierce RC** (1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Prog Neurobiol* **43**, 537–565.
- Rice ME** (2000) Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* **23**, 209–216.
- Selvaraju TR, Khaza'ai H, Vidyadaran S, et al.** (2014) The neuroprotective effects of tocotrienol rich fraction and alpha tocopherol against glutamate injury in astrocytes. *Bosn J Basic Med Sci* **14**, 195–204.
- Spector R, Johanson CE** (2007) Vitamin transport and homeostasis in mammalian brain: focus on Vitamins B and E. *J Neurochem* **103**, 425–438.
- Ulatowski L, Parker R, Warriar G, et al.** (2014) Vitamin E is essential for Purkinje neuron integrity. *Neuroscience* **260**, 120–129.
- Vatassery GT, Angerhofer CK, Knox CA** (1984) Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J Neurochem* **43**, 409–412.
- Venkateshappa C, Harish G, Mythri RB, et al.** (2012) Increased oxidative damage and decreased antioxidant function in aging human substantia nigra compared to striatum: implications for Parkinson's disease. *Neurochem Res* **37**, 358–369.
- Warner TA, Kang JQ, Kennard JA, et al.** (2015) Low brain ascorbic acid increases susceptibility to seizures in mouse models of decreased brain ascorbic acid transport and Alzheimer's disease. *Epilepsy Res* **110**, 20–25.
- Yeoman M, Scutt G, Faragher R** (2012) Insights into CNS ageing from animal models of senescence. *Nat Rev Neurosci* **13**, 435–445.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Control of primary antibodies.

Table S1. Antibodies used in this study.

For reprint orders, please contact: reprints@future-science.com

Ultrafast determination of vitamin E using LC–ESI–MS/MS for preclinical development of new nutraceutical formulations

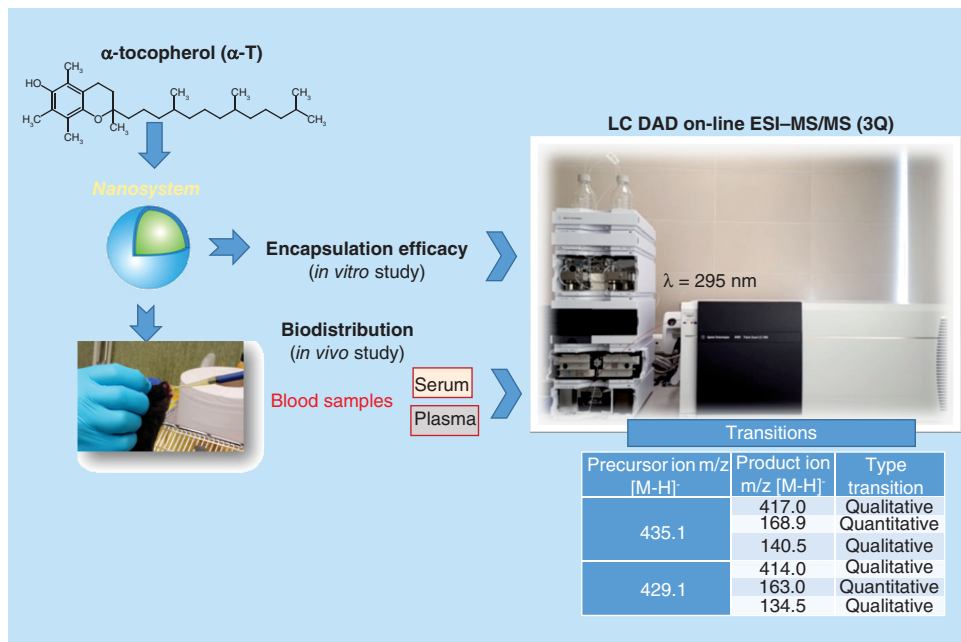
Noemi Villaseca-González¹, Virginia Rodríguez Robledo^{*1}, Lucía Castro-Vázquez¹, María Victoria Lozano¹, Manuel J Santander-Ortega¹, Joaquín González-Fuentes¹, Pilar Marcos¹ & María del Mar Arroyo-Jiménez¹

¹Faculty of Pharmacy, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

* Author for correspondence: virginia.robledo@uclm.es

Aim: We proposed a rapid and high quality method to determine α -tocopherol (α -T) in different biopharmaceutical samples using liquid chromatography-diode array detector on-line ESI–MS/MS. **Materials & methods:** A working standard solution of α -T and internal standard, phenyl-5,7-dimethyl-d6- α -tocopherol, were used for optimization and validation of the method. Levels of α -T in nanoemulsions, serum and plasma samples were evaluated. **Results & conclusion:** Precision (1% for retention time, 5% for peak area and 3% for relative peak area), linearity range (among 0.625–20.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$), LOD and LOQ, accuracy and matrix effect were studied. The validated chromatographic method is presented as valuable analytical tool for the determination of α -tocopherol in loaded drug delivery systems and in biodistribution levels in blood samples.

Graphical abstract:



First draft submitted: 22 May 2017; Accepted for publication: 10 November 2017; Published online: 15 January 2018

Keywords: LC–MS • preclinical development • vitamin E

α -tocopherol (α -T), usually known as vitamin E, is a phenolic, amphipathic and lipid-soluble compound that is easily oxidized when exposed to heat, light or alkaline conditions [1,2]. The chemical structure of this compound contains a polar chromanol ring and a hydrophobic 16-carbon side chain (Supplementary Figure 1). The number and position of methyl groups in the chromanol ring leads to the different components of the vitamin E family, which are four tocopherols and four tocotrienols (α -, β -, γ - and δ -) [3,4]. Scientific studies proving superior biological activity of natural α -T compared with other tocopherols and tocotrienols [2,5] in the classical fertility-restoration assay [3]. In addition, α -T is the main tocopherol in the blood and tissues despite its lower presence in diets compared with γ -T [6]. This could be due to the poor recognition of the others forms of vitamin E by the specific transfer proteins (α -TTP) [7].

The protection of polyunsaturated lipids from oxidation, exerted by the powerful antioxidant activity of α -T, is important in the biological activities of the molecule [8,9]. Indeed, several observational cohort studies have pointed out that vitamin E may play a role in reducing the risk of cancer [10], cardiovascular [11] and neurodegenerative diseases [12]. Thus, adequate determination of serum or plasma levels of antioxidant compounds such as α -T is highly desirable for the development of new therapeutic approaches for these diseases [13]. In order to achieve so, it is clearly useful to develop a fast, reproducible and accurate analytical methodology for obtaining qualitative and quantitative information about the targeted molecule in different matrices. This method would also contribute greatly to the preclinical progress, both *in vitro* and *in vivo*, of new drug delivery platforms based on antioxidants.

Instrumental separation techniques have been the most frequently used procedures for the determination of medium and small molecules in any complex samples, for example, food, and synthetic or biological matrices (fluids and tissues). The power of hybrid or symbiotic analytical technique (chromatography or electrophoresis coupling spectroscopy detector) is to join the advantages of both constituent techniques supported by an appropriate interface [14–16]. MS is the most powerful detection approach, in terms of sensitivity and selectivity. These types of detectors provide additional information about molecular weight and isotopic or fragmentation patterns for the unmistakable identification of analytes in complex matrices such as biological fluids or tissues samples. Nowadays, researches still rely on analytical method by HPLC using UV–vis or fluorescent detection for their routine determination of tocopherols in plasma, serum or several tissues [17–21], in spite of poor and ambiguous information offered by optical detectors [22,23]. Often, the results obtained by using spectrophotometric detectors include much interference from the biological matrix in the results [24,25]. Subsequently, UV–vis and fluorescent detection for internal quality control (QC) procedures that accomplish the national and international standards are scarcely used [26].

The last generation of mass spectrometers and the highly efficient LC systems have improved the resolution, sensitivity and reproducibility of the determinations in a short time [27,28], mostly in complex biological samples. ESI is the most common ionization source used for coupling LC–MS, obtaining a hyphenated technique that combines the advantages of both LC and MS instruments. However, this ionization process has a limitation in nonpolar substances, since most of them cannot be ionized or show low efficiency in their ionization process. This is because apolar compounds lack a site for protonation or deprotonation, typically in positive mode [29,30]. An original method published by Rentel *et al.* [29] for the determination of tocopherols and carotenoids using LC/ESI–MS bypassed this limitation by adding silver ions in order to improve the ionization step. As explained before, nonpolar compounds cannot be conveniently ionized using standard ESI, but the $\text{Ag}^{(+)}$ -carotenoid and $\text{Ag}^{(+)}$ -tocopherol adducts formed are better candidates for MS determination. Coordinated ion spray MS is a method for improving the ionization efficiency of nonpolar compounds by adding metal ions to the electrospray solvent. Al-Talla *et al.* applied this procedure for the determination of vitamin E derivatives in serum [30].

Reversed phase (RP) LC–MS with electrospray (ESI) and APCI in positive and negative mode for the analysis of tocopherols in food samples (sunflower oil and milk) has been successfully applied [31]. These authors exposed that both ESI and APCI in negative ion mode only produced deprotonated pseudo-molecular ions of target compounds, yielding higher sensitivity in negative ion mode than APCI or ESI did in positive ion mode. There is some other evidence about the determination of α -T in biopharmaceutical application such as botanical materials, fortified infant formulae and delivery to human skin using both normal and RP LC–APCI–MS [32–34]. In these published works, the LC separation using both an isocratic mobile phase [33,34] including high percentage of organic phase and gradient procedure [32] were carried out. Retention times (RT) for α -T of around 4 min and flow rate between 0.5 and 1.45 ml min⁻¹ were achieved in all cases.

One of the most interesting application of LC–MS is the analysis of compounds in biological samples [35]. Mottier *et al.* developed two mass spectrometric methods for the quantitative determination of α -T and its oxidation product in human plasma using GC–MS and LC–MS. The proposed methods used the corresponding isotopically labeled internal standards (IS) including a derivatization procedure for GC–MS, and multiple reaction monitoring after positive ESI for LC–MS methods. Both analytical methodologies showed long analysis times (among 10 and 16 min) for simultaneous determination of two analytes, nevertheless good results for validation parameters (accuracy, precisions and LOQ), were obtained. In this regard, vitamin E has also been determined using capillary HPLC coupled to MS in positive and NMR in restricted amounts of samples [36], LC–APCI–MS using a single quadrupole [34] in human skin, triple quadrupole [37] in plasma, NMR in gingival tissue [38] and negative ion modes using time-of-flight mass spectrometers [39] in blood components.

The correlation among the simultaneous determinations of tocopherols using LC–MS in biological samples and their effect on human health has been recently reviewed [40,41]. Innovative applications in the determination of α -T, other fat-soluble vitamins, their metabolites and derivatives are cystic fibrosis in pediatric patients [42] or cancer [43,44].

In this context, the aim of this work was to develop an ultrafast, reproducible and accurate method that allows the identification and high quality quantification of α -T for biopharmaceutical applications. The short run of this method, compared with other recent works, positions it as one of the fastest in the literature [45]. This issue is of great importance in drug development where large number of samples are continuously produced. In order to achieve so, the parameters were optimized using conventional LC instrumentation and standard ESI source without derivatization procedure, including double detection (DAD on-line ESI–MS/MS), as a powerful tool for the development of α -T-loaded drug delivery systems. These systems are pharma- or nutraceutical structures that associate active molecules and maximize their properties by protecting them from degradation or by promoting their absorption. More specifically, the encapsulation of α -T in drug delivery systems could increase its antioxidant effect by enhancing α -T blood levels. One pillar in drug development is the establishment of adequate analytical methodologies for obtaining qualitative and quantitative information about target molecules in the largest number of samples.

So the novelty point of this study is focused on proposing an analytical method that could be used as a valuable tool for the characterization of α -T for biopharmaceutical applications. In this sense, this paper contributes toward the development of analytical methodologies and proposes a viable methodology for the analysis of biopharmaceutical samples for α -T in: encapsulation efficiency studies in drug delivery systems (*in vitro*); and its biodistribution levels in pretreated serum and plasma samples (*in vivo*). These studies are relevant for the efficient development of novel α -T delivery systems because the determination of biodistribution levels is keystones in the development of new formulations.

Methods

Reagents & chemicals

DL-all-rac- α -Tocopherol and phenyl-5,7-dimethyl-d6- α -tocopherol (d6- α -T) were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA) and preserved at -20°C.

The solvents n-hexane and 2-propanol, both analytical grade and sodium dodecyl sulfate, were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile and ethanol both HPLC grade and methanol LC–MS grade were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). Butylhydroxytoluene, 99.9% of purity, was supplied by Guinama (Valencia, Spain). Milli-Q deionized water was used throughout the study. High-purity and zero-grade nitrogen were utilized for ESI source and detector (triple quadrupole).

Stock solution & QC sample preparation

A known amount of α -T and d6- α -T were dissolved in ethanol, to a final concentration of 4020 and 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectively. The standard stock solutions were stored at 4–8°C for α -T and -20°C for d6- α -T. Medium standard stock solutions of α -T and d6- α -T at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ were prepared. A mixture containing both compounds at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was used as working standard solution and freshly prepared by diluting appropriate aliquots of the previous medium standard stock solution in ethanol. All of them were stored at 4–8°C.

QC of plasma and serum commercial samples were prepared by mixing 95 μl of fetal plasma bovine and 5 μl of medium standard stock solution to obtain a concentration of 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Biological samples & pretreatment procedure

The animals used in the study were C57 mice with different genotype for expression of polymerase μ , with different ages and from both sexes. Animals were maintained under controlled temperature and humidity, with a 12-h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water, at the animal facility, Faculty of Medicine of the University of Castilla-La Mancha (Spain). Blood samples (0.8 ml approximately) were collected by cardiac puncture from the right ventricle of the heart after 6-h overday fasting and nonfasting. The mice were anesthetized using a mixture of isoflurane and oxygen before taking the sample and killed by cervical dislocation. All procedures were approved by the Ethical Committee of Animal Research of the University of Castilla-La Mancha according to Spanish law (RD 1201/2005) and European directive 2010/63/EU.

Blood mouse samples were aliquoted into two tubes, one of them was a heparinized tube and the other one was a microtube Z-Gel. After centrifugation at $453 \times g$ for 15 min, at 4°C for the microtube Z-Gel and 18°C for the heparinized tube, serum and plasma samples were obtained by collecting the supernatant of the corresponding tube. Both samples were stored in plastic vials at -20°C until the samples' pretreatment procedure.

Fetal plasma and bovine serum were obtained from Sigma-Aldrich, reconstituted with Milli-Q water according to the supplier indications and stored at -20°C before analysis.

Both commercial and experimental biological samples were treated by following protocols published previously.

General procedure to obtain biological extracts from biological samples included the following steps: optional protein denaturalization; protein precipitation or deproteinization; liquid-liquid extraction (LLE); and optional preconcentration and reconstitution of biological extract. All the phases of LLE procedure, in an effort to achieve complete extraction of the analyte in serum and plasma sample, have been carefully evaluated.

Plasma samples were analyzed using a modification of the method published by Lauridsen *et al.* [37]. Briefly, 100 μl of plasma with a known amount of IS (d6- α -T) were mixed with 250 μl of sodium dodecyl sulfate (0.1 M in water) for protein denaturalization, followed by 500 μl of ethanol for deproteinization and 1 ml of butylhydroxytoluene (0.5 g l^{-1} in n-hexane) for LLE. The n-hexane organic fraction was collected after centrifugation of the samples at $2500 \times g$ for 10 min at 4°C . This procedure was repeated twice. The total organic aliquot was evaporated with nitrogen gas. Dried samples were dissolved in 100 μl of isopropanol and the obtained extracts were injected into LC-DAD on-line ESI-MS/MS.

The treatment samples for serum fraction were modified from the method of Kucérova *et al.* [46]. In further detail, 100 μl of serum with a known amount of IS, d6- α -T was deproteinized with 100 μl of ethanol (5% methanol). Then, 500 μl of n-hexane was added and the mixture was mixed using a vortex apparatus. The n-hexane organic fraction was collected after centrifugation of the sample at $3320 \times g$ for 10 min at 4°C . This procedure was repeated twice. Hexane was evaporated with nitrogen gas to obtain dried samples which were further dissolved in 100 μl of methanol. Finally, extracts were injected into LC-DAD on-line ESI-MS/MS.

Materials & apparatus

Polytetrafluoroethylene (PTFE) membranes were provided from Agilent Technologies (CA, USA). Plastipak syringes were obtained from DD Biolab (Barcelona, Spain). Microtubes 1.1 ml Z-Gel were supplied by Sarstedt (Nümbrecht, Germany) and 2 ml K3E K3EDTA tubes purchased from Vacuette (Kremsmünster, Austria). Millipore apparatus (MA, USA) was used to obtain Milli-Q water.

LC separation was achieved by using an Agilent 1260 Infinity HPLC system, which consists of a binary pump and vacuum degasser. The injections were carried out by an Agilent autosampler and the samples were analyzed using an Agilent Technologies 6460 triple quadrupole mass spectrometer equipped with an ESI interface. The MassHunter Workstation B.07.00 software (Agilent Technologies) was used for computerized instrument control, data acquisition and analysis. Zero-grade nitrogen was produced by a nitrogen generator (PEAK Scientific, IL, USA) and high purity was supplied by Linde (Valencia, Spain).

LC-MS methodology

The samples were separated on a Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 \times 50 mm, 1.8 μm) at 40°C . The mobile phase consisted of acetonitrile and 2-propanol (50:50, v/v) and delivered at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} . The volume injection for standard solutions and biological samples was of 5 μl .

The optimum parameters for ESI source were 300°C for the dry gas temperature with a gas flow rate of 13 l min^{-1} ; the nebulizer pressure was 35 psi; capillary voltage of 4000 V and chamber/corona current of 0.26 μA .

Quantifications and detections were performed in negative ion mode with multiple reaction monitoring mode. Three transitions for each compound were selected for its monitoring.

Results & discussion

Method optimization

The chromatography mode used for the determination of α -T was an RP–LC using conventional ionization source. A mixture standard solution containing $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of target and corresponding deuterated compounds were prepared by diluting the $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ stock solutions. This solution was used throughout the optimization procedure using a double detection DAD on-line ESI–MS/MS, because this enables the obtaining of qualitative and quantitative information about the molecule in several matrices. In this work, we propose two different applications for the determination of α -T: in biological samples (serum and plasma); and in new nutraceutical formulations using MS/MS and DiodeArray (DA) detection, respectively. Using DAD, at 295 nm as the maximum wavelength, provides the most adequate detection for studying encapsulation efficacy, because a simple matrix and high concentration levels are found. Therefore, optical detection is shown as a tool to support the main detection by MS/MS due to its high selectivity.

Optimization of LC parameters using diode array on-line MS detectors

Among the chromatographic conditions, mobile phase was optimized studying the effect of type of organic solvent and its composition in the determination. Flow rate of the mobile phase, temperature of the column and injection volume, were also studied. The optimum value of each chromatography parameter was attained according to the sensitivity, peak efficacy and RT of α -T. In general terms, the higher proportion of the organic component in the mobile phase increases eluent strength and reduces RT in RP–LC. Hence, our work has studied the effect of different organic solvents (acetonitrile, methanol and 2-propanol) and mixtures of them as organic mobile phase modifiers. Although the injection volume should not have a significant influence on the relative peak area (RPA), when biological samples are used it is relevant to know the influence of this parameter on the overall analytical method, in order to find the optimum injection volume. This is because at higher injection volumes, more biological components are injected into the system and therefore, abundant interferences and biological matrix could adhere to the analytical column. Early matrix effects or dirty chromatographic and guard columns could be quickly found. An injection volume of $5.0 \mu\text{l}$ was selected as optimum value (Supplementary Figure 2). The final chromatographic conditions selected were 2-propanol and acetonitrile, 50:50 v/v as mobile phase at a flow rate of 0.4 ml min^{-1} and 40°C column temperature. The injection volume was $5.0 \mu\text{l}$ using a diode array as optical detection at 295 nm. Under these optimized chromatographic conditions, a simple and ultrafast determination (less than 0.7 min) of mixture containing α -T standard and the corresponding deuterated compound was achieved.

Optimization of ESI–MS parameters

A goal of the optimized analytical method was to propose an ultrafast, effective and easily reproducible procedure without derivatization procedure using standard ESI source. The main purpose of the optimization of ion-source parameters is to get a stable, selective and good signal when triple quadrupole detector is used. Instrumental parameters such as dry gas flow, gas temperatures and nebulizer pressure were experimentally evaluated because they have direct influence on ionization process.

First, for MS characterization of the compounds and selection of the best precursor ion, the most abundant ion in full scan mode was chosen, providing first-generation product ions in this mode. Specific precursor ion parameters such as transitions, fragmentor (V) and collision energy (eV) were automatically optimized using Optimizer (Agilent, MassHunter). At least, three transitions from precursor ion to product ion should be selected for high quality quantification and identification of each compound. The most abundant product ion in the transition is always selected for quantification, and the rest of the transitions from the same precursor ion must be used for qualitative identification.

For the compounds under study, the ionization was more stable and sensible in negative $[\text{M}-\text{H}]^-$ than positive $[\text{M} + \text{H}]^+$ mode. The three selected transitions, collision energy (CE) and fragmentor for each compounds were (m/z): for d6- α -T (a) 435.1 to the 417 with a CE of 25 eV, (b) 435.1 to the 168.9 with a CE of 28 eV and (c) 435.1 to the 140.5 with a CE of 45 eV, using a fragmentor value of 98 V in all cases. For α -T, the other three transitions were (a) 429.1 to the m/z 414 with a CE of 25 eV, (b) 429.1 to the 163 with a CE of 25 eV, (c) 429.1 to the 134.5 with a CE of 48 eV, using a fragmentor value of 100 V for the three transitions. Ratio qualifiers/quantifier values

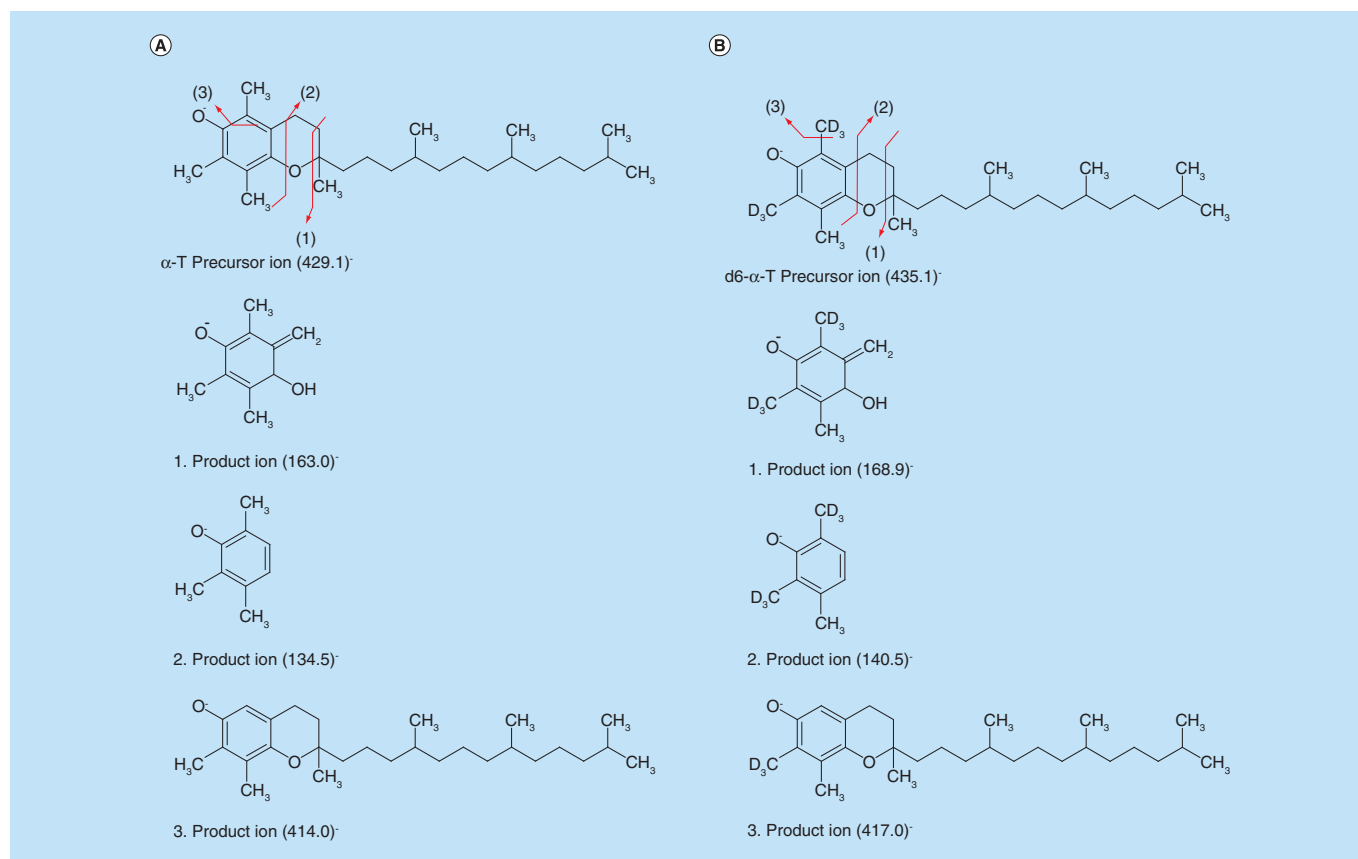


Figure 1. Analytes chemical structures and fragmentation pathways. (A) ESI-MS/MS characterization and fragmentation pathway for α -T. **(B)** ESI-MS/MS characterization and fragmentation pathway for d6- α -T. α -T: α -tocopherol.

expressed in term of relative response for d6- α -T were of 4.9 and 3.7 for (a) and (c) transitions and for α -T of 4.4 and 4.3 for (a) and (c) transitions, respectively.

The ESI-MS/MS characterizations of d6- α -T and α -T are included in Supplementary Table 1. The fragmentation pathways with the assignment of product ion masses from precursor ions are summarized in Figure 1A & B.

Another aim of the proposed analytical methodology has been to develop a simple and specific method using an ESI source [14] that avoids derivation procedure that is sometimes proposed for improving the signal for compounds that are poorly ionized by ESI [35]. For this reason, ion-source ESI parameters were optimized by evaluating the stability and the intensity of the signal, the RPA and the signal-to-noise (S/N) ratio. As it was commented above, dry gas flow, gas temperature and nebulizer pressure were studied for different ranges, within the values allowed by the equipment. Working standard solutions were used to optimize these parameters with at least five replicates.

Dry gas flow was studied in the range 5–13 l min⁻¹. It was observed that lower values (5–10 l min⁻¹) produced similar signal intensity and relative peak areas. Since 10 l min⁻¹ signal was gradually increasing, so a value of 13 l min⁻¹ was selected because it provided stable and the highest S/N.

Gas temperatures were evaluated between 250 and 350°C. From the comparison of the RPA and S/N ratio, 300°C was revealed to be the optimum temperature value. Temperature values smaller than 300°C provided unstable signal and low RPA as well as temperatures higher than 300°C.

The nebulizer pressure was studied from 10 to 60 p.s.i. The results showed great variability regarding RPA in the range proposed. The values increase from 10 to 15 p.s.i.; however, values of RPA among 15 to 25 p.s.i. decrease, and increase again between 25 and 35 p.s.i., being 35 p.s.i. the maximum value until 60 p.s.i., where values of RPA decrease. A value of 35 p.s.i. was adopted as it provided good signals and a high S/N ratio.

The optimized ESI parameters including values range are summarized in Table 1.

Table 1. ESI parameters studied and selected values.

ESI parameters	Values range	Optimum value
Flow rate (l min ⁻¹)	5–13	13
Gas temperature (°C)	250–350	300
Nebulizer pressure (psi.)	10–60	35

Table 2. Repeatability and reproducibility for retention time and peak area.

Analyte	Conc. (µg ml ⁻¹)	Intraday RSD (%), n = 8		Interday RSD (%), n = 8	
		Retention time	Peak area	Retention time	Peak area
α-tocopherol	5.00	0.45	3.87 1.35 [†]	0.56	1.50 2.74 [†]
d6-α-tocopherol	5.00	0.39	4.88	0.75	2.52

[†]Relative peak area (RPA).

Validation of proposed analytical methodology

The reliability for α-T determination was assessed by a systematic validation of the LC–DAD on-line ESI–MS/MS chromatography method which followed the US FDA guidelines for bioanalysis methods. Analytical performance parameters, such as precision, selectivity, sensitivity, linearity, recoveries and matrix effect, were all evaluated, on the extracts obtained from spiked serum and plasma bovine samples, which were purchased from Sigma-Aldrich (see the ‘Materials & methods’ section).

The developed method was validated on the signal intensity, RPA and S/N ratio from triplicate injections of working standard solution. Precision, sensitivity, LOD and LOQ, linearity, accuracy, extraction recovery and matrix effect were evaluated. Accuracy and precision required variation (RSD%) values within 15%, in case of LOQ, this value should not deviate by more than 20%.

QC was used to validate matrix effect and extraction recovery of biological samples. Three different QCs were compared with three spiked biological samples from different mice samples. QC samples are always prepared as defined in the ‘Stock solution and QC sample preparation’ section.

Precision (repeatability & reproducibility)

Precision is expressed by RSD. The precision in terms of repeatability of the optimized analytical method was estimated by replicate analysis (n = 8) using 5 µg ml⁻¹ of the working standard solution, sequentially. The reproducibility for intraday and interday was determined by sequentially injecting eight freshly prepared samples from the standard solution with a time interval of 24 and 48 h between samples, under the same conditions.

The RSD values for RT, peak area and RPAs obtained were used for the repeatability and reproducibility studies, which are shown in Table 2.

The statistical analysis used to compare both set of data was the test F-Snedecor with a confidence level of 95% and seven freedom degrees for each one. Significant differences were not found in any of the analyses.

Selectivity & LOD & LOQ

LOD and LOQ values were obtained by spiking blank plasma and serum samples and diluting them in series. Next, the extracts were processed and injected into the LC–DAD on-line MS. LOD and LOQ estimated at S/N ratios of 3:1 and at least 10:1, respectively, until the desired precision was obtained (RSD <20%). The values achieved were around 900 and 120 ng ml⁻¹ for LOD and 3.0 and 400 ng ml⁻¹ for LOQ using DAD and ESI–MS/MS respectively. Figure 2 shows an overlapped chromatogram including quantitative transitions for LOQ level in different matrices (mobile phase, serum and plasma) including blank extract.

The evaluation of the selectivity was performed by treating six aliquots of commercial blank plasma and other six of serum samples. The obtained extracts were analyzed using the optimized LC–ESI–MS/MS. The chromatograms were compared with those obtained from blank plasma and serum spiked at the LOQ concentration of each analyte (including IS). Interfering peaks at the same RT of the analyte and IS were not observed.

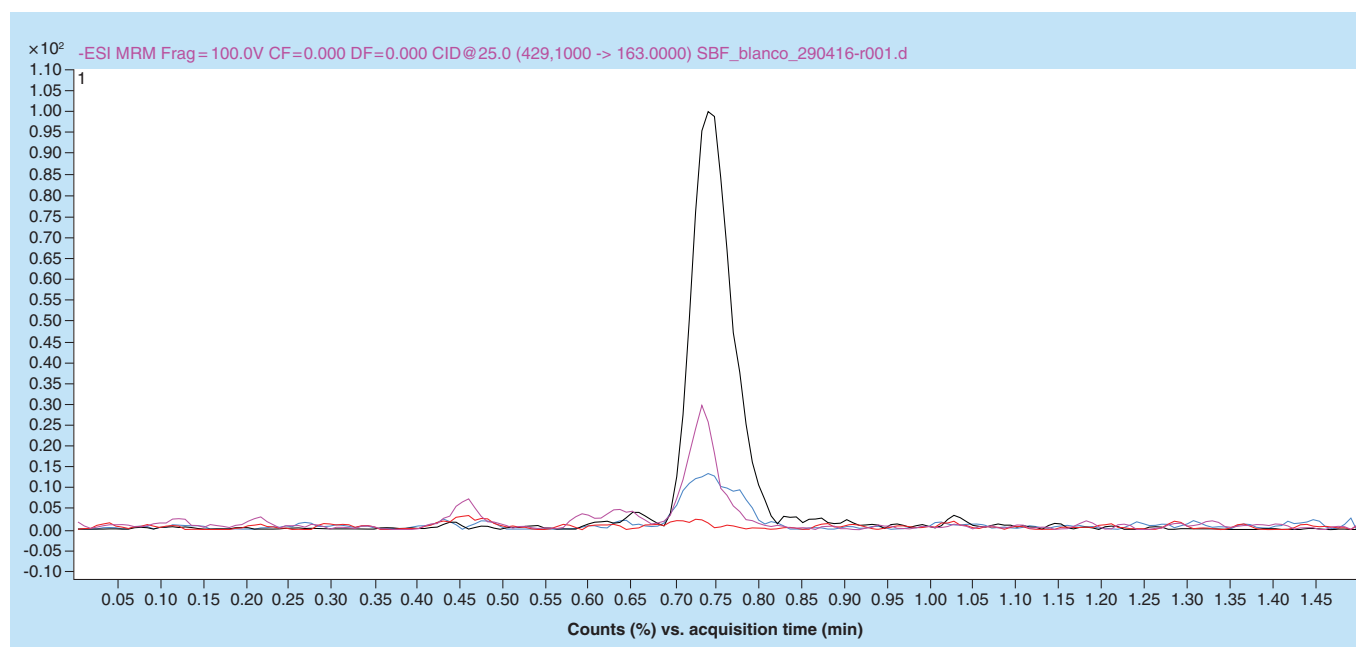


Figure 2. Overlapped chromatograms corresponding to LOQ levels of α -tocopherol (quantitative transition) in several matrices (mobile phase, serum and plasma) and blank, from highest to lowest signal, respectively.

Table 3. Calibration curves interday for different matrices using DAD and ESI-MS/MS detection.

Detector	Matrix	Conc. range ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Regression equation	Coef. correlation (σ^2)
DAD	Day 1-EtOH	3.00–200.0	$y = 108540 \times -266074$	0.9991
	Day 2-EtOH		$y = 107370 \times -199852$	0.9984
ESI-MS/MS	Day 1-EtOH	0.6125–20.00	$y = 1.1087 \times +0.0410$	0.9998
	Day 2-EtOH		$y = 1.0791 \times +0.0363^{\dagger}$	0.9993
	Day 1-plasma	0.6125–20.00	$y = 0.8199 \times +0.7050$	0.9993
	Day 2-plasma		$y = 0.7677 \times +0.6409^{\dagger}$	0.9989
	Day 1-serum	0.6125–20.00	$y = 0.8216 \times +0.3393$	0.9999
	Day 2-serum		$y = 0.6799 \times +0.5879$	0.9994

[†]Significant differences were found for significance level of 0.05.

Linearity range & calibration

An initial experiment using trolox as IS (trolox) was carried out and nonlinear regression in the selected range for the validation procedure was obtained. This led us to consider the deuterated compound as the most adequate IS for high quality validation procedure.

The linearity was assessed using calibration standard of stock working solution and commercial fetal serum and plasma samples.

Calibration standards ranging for α -T from 3.00 to 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and 0.6125 to 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (using DAD and ESI-MS/MS, respectively) including the same concentration of 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for d6- α -T, were prepared. The corresponding linear regression equations and correlation coefficients are shown in Table 3. Linearity range lower than 3.00 or 0.6125 $\mu\text{g ml}^{-1}$ was not considered because the basal concentrations both new nutraceutical formulation and real biological samples are usually higher (see the 'Application' section).

The statistical analysis to compare both set of data was the one-way ANOVA test using IBM SPSS Statistics software, version 22, assuming equal variances and a significance level of 0.05. Significant differences were found for calibration curve interday in ethanol and serum matrix, nevertheless no significant differences were found for plasma matrix. Therefore, the results suggest that making calibration curves with a certain frequency is advisable. The statistical differences founding do not respond to standard behavior therefore, it is indispensable to use QC and to make washing cycles in the analytical column using different percentages of the organic mobile phase.

Table 4. Accuracy results in post- and pre-extraction process for biological samples.

Analyte + 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of IS	Analytes spiked in postextraction samples				Analytes spiked in pre-extraction samples			
	Spiked conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Measured conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Recovery (%)	Spiked conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Measured conc. ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	RSD (%)	Recovery (%)
Serum samples								
α -Tocopherol	0.6125	0.6224	1.23	101.3	0.6125	0.6204	0.19	101.3
	2.5000	2.4903	5.26	99.6	2.5000	2.4491	1.93	98.0
	10.000	10.0085	0.54	100.1	10.000	10.2347	4.05	102.3
Plasma samples								
α -Tocopherol	0.6125	0.7219	5.38	117.9	0.6125	0.6506	1.75	106.2
	2.5000	2.6195	3.32	104.8	2.5000	2.5208	5.38	100.8
	10.000	10.1525	1.52	101.5	10.000	10.112	4.98	101.1

IS: Internal standard.

Accuracy & matrix effect

The extraction recovery (accuracy) was estimated by determining the low QC (LQC), medium QC (MQC) and high QC (HQC) in pre-extraction procedure. For that purpose, three replicates of QC samples were prepared at three different concentrations. The accuracy was estimated by calculating the difference between the calculated and theoretical concentrations (relative error, RE%) of spiked serum and plasma samples.

The comparison between RPAs of postextraction spiked samples (LQC, MQC and HQC levels) and those obtained with the working standard solution at the same concentration allowed us to determine the matrix effect. The normalized effect of matrix of the responses of the analytes in plasma and serum in solution were calculated for each concentration (analyte response in matrix vs the analyte response in solution/IS response in solution). The matrix effect was not considered significant when variations were lower than 10%, relative to the normalized effect of matrix calculated for both concentration levels and each analyte.

Peak areas in postextraction and pre-extraction spiked were compared for each sample at the same concentration. As can be seen in the Table 4 the total recoveries were between 98.0 and 117.9% with RSD \leq 5.5%.

Application to real samples

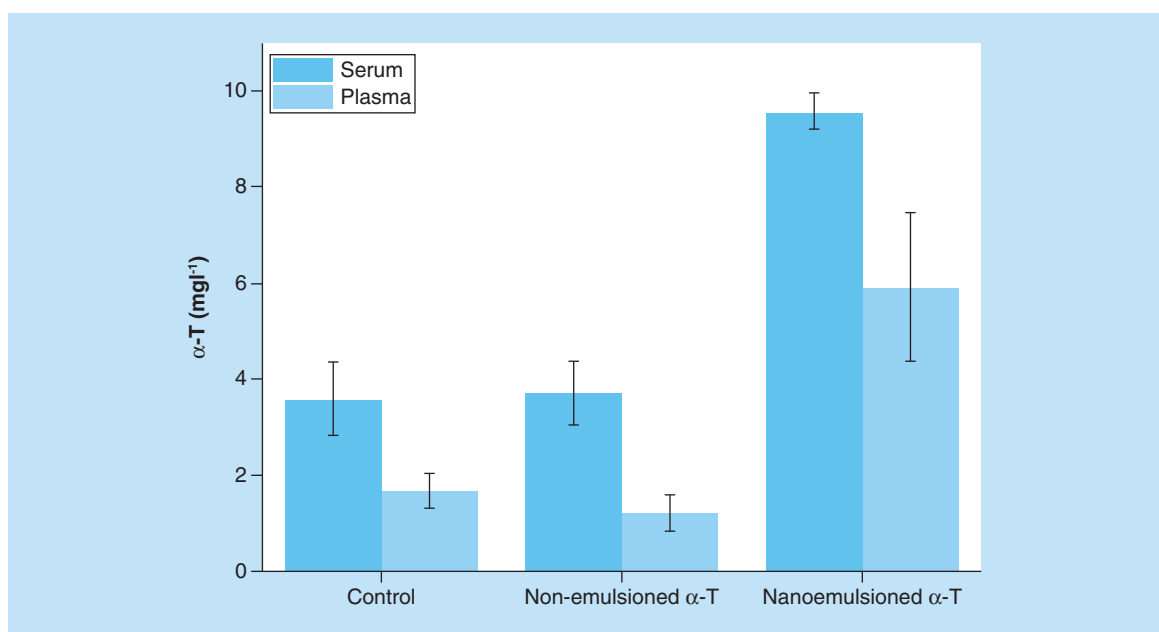
The nanoemulsions herein described are formed by the solvent displacement technique, which consists of the addition of an organic phase into an aqueous one under magnetic stirring. Nanoemulsions are obtained after the evaporation of the organic solvents (ethanol and acetone). These carriers are constituted by an oil core stabilized by lecithin in the surface that encapsulates, protects and stabilizes the active molecules. Therefore, it is important to determine the efficiency of the system to accommodate the active molecules in their structure, as the remaining free fraction will not benefit from these advantages. For that purpose, the analytical proposed method was used for the determination of active molecule (α -T) associated to the delivery system (encapsulation efficiency) to optimize the formulation parameters that were best for the efficient formulation of α -T in vegetable oil nanoemulsions. The α -T used was DL-all-rac- α -Tocopherol (see the 'Reagents & chemicals' section). For these studies, the quantification of α -T was performed using optical detection (DAD) because no interferences from matrix were found in unpretreated samples, when nanoemulsions were analyzed. Table 5 shows the encapsulation efficacy of α -T in four different oil nanoemulsions formulated with wheat germ, coconut, palm and soybean oils. Encapsulation efficacy was calculated by an indirect method determining the fraction of α -T in the aqueous phase of the nanoemulsions. This fraction is the infranatant obtained after separating the oil section of the nanoemulsion, which lays on top of the tube, from the bulk aqueous phase using ultracentrifugation at $120,000 \times g$. The infranatant, if constituted by lecithin micelles which were further diluted with acetonitrile and centrifuged. The organic fraction obtained was then analyzed by the chromatographic method using LC–DAD to determine α -T encapsulation efficiency in the nanoemulsions.

For *in vivo* studies, the whole procedure including off-line LLE and chromatographic method (LC–MS/MS) was used for the quantitative and qualitative determination of α -T in complex biological matrices after administration. As shown in Figure 3, the proposed method allowed the quantification of α -T levels from mice after oral administration of saline/water (control), the nonemulsioned or the nanoemulsioned α -T. The blood samples were extracted and serum and plasma fractions were treated as commented in section 'Biological samples & pretreatment procedure' and analyzed by the described method. Due to complex nature of these matrices, the use of MS detector (QQQ)

Table 5. Evaluation of encapsulation efficacy of α -tocopherol (*in vitro* study) $n = 4$, in four new nanoemulsions based on vegetable oils.

Nano systems	Found α -T 1:100 (mg l ⁻¹)	% outside of α -T	% inside of α -T
WheatGerm-1	15.26	6.10	93.90
WG-2	9.55	3.82	96.18
WG-3	8.42	3.37	96.63
WG-4	4.65	1.86	98.14
CocoNut 1	5.15	2.06	97.94
CN-2	12.24	4.89	95.11
CN-3	8.59	3.44	96.56
CN-4	8.84	3.54	96.46
Palm-1	16.09	6.43	93.57
P2	7.91	3.16	96.84
P3	20.24	8.10	91.90
P4	15.46	6.18	93.82
Soy-1	23.01	9.18	90.82
S-2	21.55	8.65	91.35
S-3	22.90	9.22	90.78
S-4	20.84	7.99	92.01

α -T: α -tocopherol.

Figure 3. Determination of α -tocopherol in serum and plasma samples for biodistribution (*in vivo*) studies.

was mandatory in order to obtain good quality results. The same analytical methodology was used to evaluate the concentration level of α -T (control saline/water) previous oral administration. Interestingly, the administration of the α -T as nanoemulsion led to an around two- to threefold increase in the blood levels of α -T.

Conclusion

The determination of natural bioactive molecules, such as α -T, in complex matrices is of great importance for the drug development of new nutraceutical entities. This work describes an isocratic and ultrafast chromatographic method using an original mobile phase (100% organic phase and inorganic salts free). A stable and easily reproducible signal has been obtained using a standard ionization source (ESI) without previous derivatization process sometimes

proposed for improving the signal for compounds that are poorly ionizable. The optimized method relies on double detection using DAD on-line ESI–MS/MS, for obtaining a high quality determination of α -T in biopharmaceutical applications. Analytical validation parameters such as precision, recovery, LOD and LOQ, linear range and matrix effects were successfully carried out including some statistical tests (F-Snedecor and ANOVA).

Biopharmaceutical applications were focused for the adequate determination of α -T in novel drug delivery systems (*in vitro*) development and its biodistribution levels in blood samples (*in vivo*). Fractions from whole blood of serum and plasma samples (100 μ l each) were previously treated (off-line LLE) and analyzed using the proposed method. In addition, the ultrafast determination of α -T has allowed the efficient management of the large number of samples generated in the study, in accordance to the ones produced in drug development.

Acknowledgements

V Rodríguez would like to thank JJB Nevado for his guidance in the analytical chemistry field. Research group: Cellular Neuroanatomy and Molecular Chemistry of Central Nervous System. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

Financial & competing interests disclosure

The authors thank the financial support given by the PEII-2014–040-P research project from the Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

1. Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31(7), 671–701 (1996).
2. Eitenmiller RR, Lee J. *Vitamin E, Food Chemistry, Composition and Analysis*. Marcel Dekker Inc., NY, USA, 540–550 (2004).
3. Shils ME, Shike M, Ross AC *et al.* Modern Nutrition in Health and Disease. Lippincott, Williams & Wilkins, MD, USA, 396–411 (2006).
4. Lampi AM. Analysis of tocopherols and tocotrienols by HPLC. *Lipids Library AOCs* (2011).
5. Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A *et al.* Review vitamin E. *J. Sci. Food Agric.* 80, 913–938 (2000).
6. Zhao Y, Lee MJ, Cheung C *et al.* Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. *J. Agric. Food Chem.* 58(8), 4844–4852 (2010).
7. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic. Biol. Med.* 43(1), 4–15 (2007).
8. Sen CK, Khanna S, Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family. *Mol. Aspects Med.* 28(5–6), 692–728 (2007).
9. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ *et al.* Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* 4(5), 1–11 (2005).
10. Yalcin O, Karatas F, Erulus FA *et al.* The levels of glutathione peroxidase, vitamin A, E, C and lipid peroxidation in patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *BJU Int.* 93(6), 863–866 (2004).
11. Yoshida Y, Niki E, Noguchi N *et al.* Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chem. Phys. Lipids.* 123(1), 63–75 (2003).
12. Gray SL, Hanlon JT, Landerman LR *et al.* Is antioxidant use protective of cognitive function in the community-dwelling elderly? *Am. J. Geriatr. Pharmacother.* 1(1), 3–10 (2003).
13. Valko M, Leibfritz D, Moncol J *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(1), 44–84 (2007).
14. Robledo VR, Smyth WF. Review of the CE-MS platform as a powerful alternative to conventional couplings in bio-omics and target-based applications. *Electrophoresis* 35(16), 2292–2308 (2014).
15. Careri M, Mangia A. Multidimensional detection methods for separations and their application in food analysis. *Trends Anal. Chem.* 15(10), 538–549 (1996).
16. Lantz AW, Brehm-Stecher BF, Armstrong DW. Combined capillary electrophoresis and DNA-fluorescence *in situ* hybridization for rapid molecular identification of Salmonella Typhimurium in mixed culture. *Electrophoresis* 29(12), 2477–2484 (2008).
17. Abidi SL. Chromatographic analysis of tocol-derived lipid antioxidants. *J. Chromatogr. A* 881(1–2), 197–216 (2000).
18. Khan A, Khan MI, Iqbal Z *et al.* An optimized and validated RP-HPLC/UV detection method for simultaneous determination of all-trans-retinol (vitamin A) and alpha-tocopherol (vitamin E) in human serum: comparison of different particulate reversed-phase HPLC columns. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878(25), 2339–2347 (2010).

19. Zhao Y, Monahan FJ, McNulty BA *et al.* Effect of vitamin E intake from food and supplement sources on plasma alpha- and gamma-tocopherol concentrations in a healthy Irish adult population. *Br. J. Nutr.* 112(9), 1575–1585 (2014).
20. Cimadevilla HM, Hevia D, Miar A *et al.* Development and validation of a single HPLC method for determination of alpha-tocopherol in cell culture and in human or mouse biological samples. *Biomed. Chromatogr.* 29(6), 843–852 (2015).
21. Takahashi K, Takisawa S, Shimokado K *et al.* Age-related changes of vitamin E: alpha-tocopherol levels in plasma and various tissues of mice and hepatic alpha-tocopherol transfer protein. *Eur. J. Nutr.* 56(3), 1317–1327 (2017).
22. Jeurnink SM, Ros MM, Leenders M *et al.* Plasma carotenoids, vitamin C, retinol and tocopherols levels and pancreatic cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition: a nested case-control study: plasma micronutrients and pancreatic cancer risk. *Int. J. Cancer* 136(6), E665–E676 (2015).
23. Ramis MR, Sarubbo F, Terrasa JL *et al.* Chronic alpha-tocopherol increases central monoamines synthesis and improves cognitive and motor abilities in old rats. *Rejuvenation Res.* 19(2), 159–171 (2016).
24. Kamal-Eldi A, Gorgen S, Pettersson J *et al.* Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols. Comparison of different chromatographic columns. *J. Chromatogr. A* 881(1–2), 217–227 (2000).
25. Ruperez FJ, Martin D, Herrera E *et al.* Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. *J. Chromatogr. A* 935(1–2), 45–69 (2001).
26. Semeraro A, Altieri I, Patriarca M *et al.* Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: an application to the simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum by HPLC. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877(11–12), 1209–1215 (2009).
27. Rodríguez-Suarez E, Siwy J, Zurbig P *et al.* Urine as a source for clinical proteome analysis: from discovery to clinical application. *Biochim. Biophys. Acta* 1844(5), 884–898 (2014).
28. Horvatovich P, Hoekman B, Govorukhina N *et al.* Multidimensional chromatography coupled to mass spectrometry in analysing complex proteomics samples. *J. Sep. Sci.* 33(10), 1421–1437 (2010).
29. Rentel C, Strohschein S, Albert K *et al.* Silver-plated vitamins: a method of detecting tocopherols and carotenoids in LC/ESI-MS coupling. *Anal. Chem.* 70(20), 4394–4400 (1998).
30. Al-Talla ZA, Tolley LT. Analysis of vitamin E derivatives in serum using coordinated ion spray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19(16), 2337–2342 (2005).
31. Lanina SA, Toledo P, Sampels S *et al.* Comparison of reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure chemical ionization for analysis of dietary tocopherols. *J. Chromatogr. A* 1157(1–2), 159–170 (2007).
32. Hao Z, Parker B, Knapp M *et al.* Simultaneous quantification of alpha-tocopherol and four major carotenoids in botanical materials by normal phase liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1094(1–2), 83–90 (2005).
33. Heudi O, Trisconi MJ, Blake CJ. Simultaneous quantification of vitamins A, D3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1022(1–2), 115–123 (2004).
34. Vaule H, Leonard SW, Traber MG. Vitamin E delivery to human skin: studies using deuterated alpha-tocopherol measured by APCI LC-MS. *Free Radic. Biol. Med.* 36(4), 456–463 (2004).
35. Mottier P, Gremaud E, Guy PA *et al.* Comparison of gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry methods to quantify alpha-tocopherol and alpha-tocopherolquinone levels in human plasma. *Anal. Biochem.* 301(1), 128–135 (2002).
36. Krucker M, Lienau A, Putzbach K *et al.* Hyphenation of capillary HPLC to microcoil (1)H NMR spectroscopy for the determination of tocopherol homologues. *Anal. Chem.* 76(9), 2623–2628 (2004).
37. Lauridsen C, Leonard SW, Griffin DA *et al.* Quantitative analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry of deuterium-labeled and unlabeled vitamin E in biological samples. *Anal. Biochem.* 289(1), 89–95 (2001).
38. Lienau A, Glaser T, Krucker M *et al.* Qualitative and quantitative analysis of tocopherols in toothpastes and gingival tissue employing HPLC NMR and HPLC MS coupling. *Anal. Chem.* 74(20), 5192–5198 (2002).
39. Hall WL, Jeanes YM, Pugh J *et al.* Development of a liquid chromatographic time-of-flight mass spectrometric method for the determination of unlabelled and deuterium-labelled alpha-tocopherol in blood components. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17(24), 2797–2803 (2003).
40. Cervinkova B, Krcmova LK, Solichova D *et al.* Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Anal. Bioanal. Chem.* 408(10), 2407–2424 (2016).
41. Bartosinska E, Buszewska-Forajta M, Siluk D. GC–MS and LC–MS approaches for determination of tocopherols and tocotrienols in biological and food matrices. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127, 156–169 (2016).
42. Konieczna L, Kazmierska K, Roszkowska A *et al.* The LC-MS method for the simultaneous analysis of selected fat-soluble vitamins and their metabolites in serum samples obtained from pediatric patients with cystic fibrosis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 124, 374–381 (2016).

43. Albahrani AA, Rotarou V, Roche PJ *et al.* A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 159, 41–53 (2016).
44. Jiang Q, Xu T, Huang J *et al.* Analysis of vitamin E metabolites including carboxychromanols and sulfated derivatives using LC/MS/MS. *J. Lipid. Res.* 56(11), 2217–2225 (2015).
45. Yuan C, Burgyan M, Bunch DR *et al.* Fast, simple, and sensitive high-performance liquid chromatography method for measuring vitamins A and E in human blood plasma. *J. Sep. Sci.* 37(17), 2293–2299 (2014).
46. Kucerova B, Krcmova L, Solichova D *et al.* Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and alpha-tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* 36(14), 2223–2230 (2013).

