



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

**Estructura de la zona subventricular del cerebro de cobayo y el efecto de la vitamina C en la neurogénesis y en la progresión tumoral en esta región**

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

NERY ALEJANDRA JARA MENDOZA  
CONCEPCIÓN - CHILE  
2016

Profesor Guía: Francisco Nualart Santander  
Laboratorio de Neurobiología y Células Madre, CellTT  
Centro de Microscopía Avanzada CMA BIO-BIO, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

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



---

Dr. Juan Pablo Henríquez H.  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dra. Marcela Torrejón Q.  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Agustín Martínez  
Profesor Evaluador Externo  
Centro Interdisciplinario de Neurociencia de  
Valparaíso  
Universidad de Valparaíso

---

Dr. Luis Aguayo H.  
Director Subrogante  
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Proyecto FONDECYT #1100396 (2010-2013).

Proyecto FONDECYT #1140477 (2014-2017).

Proyecto CONICYT PIA ECM-12

Beca CONICYT para estudios de doctorado (2011-2014).

Beca CONICYT de extensión (2015).

Beca CONICYT para gastos operacionales (2014).

Beca CONICYT para asistencia a congresos (2011 - 2015).

Beca proyecto MECESUP UCO 1311 para termino de tesis doctoral (2015).

Escuela de Graduados de la Universidad de Concepción para asistencia a congresos (2013-2015) y para la realización de una pasantía (2014).

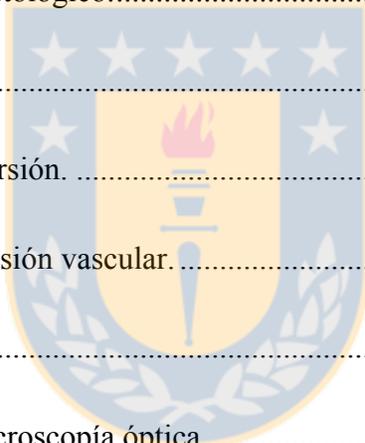


*Esta tesis está dedicada  
a mis padres, Jorge y Carmen,  
Con mucho cariño y gratitud*

## INDICE GENERAL

<b>INDICE GENERAL</b> .....	<b>I</b>
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
1.1. Neurogénesis en mamíferos adultos.....	1
1.2. Nicho neurogénico en zona subventricular. ....	2
1.3. Nicho neurogénico en la zona subventricular humana.....	8
1.4. Gliomas.....	12
1.5. Relación entre la SVZ y los gliomas.....	14
1.6. Vitamina C, sus funciones e importancia en sistema nervioso central.....	17
1.7. Vitamina C y sus transportadores.....	20
1.8. Vitamina C y su rol en neurogénesis .....	22
1.9. Vitamina C y su rol en tumores.....	25
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>31</b>
<b>III. HIPOTESIS</b> .....	<b>33</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>33</b>

<b>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>33</b>
<b>IV. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>34</b>
4.1. Animales de experimentación. ....	34
4.2. Cultivos celulares. ....	34
4.2.1. Cultivos de la línea celular U87 – MG.....	34
4.2.2. Cultivo de las células C3. ....	35
4.3. Marcaje con BrdU <i>in vivo</i> . ....	35
4.4. Procesamiento histológico.....	36
4.4.1. Fijación.....	36
4.4.1.1. Fijación por inmersión. ....	36
4.4.1.2. Fijación por perfusión vascular. ....	37
4.4.2. Inclusión.....	37
4.4.2.1. Inclusión para microscopía óptica.....	37
4.4.2.2. Inclusión para microscopía electrónica.....	38
4.5. Ensayos de Inmunolocalización.....	39
4.5.1. Inmunohistoquímica.....	39
4.5.2. Inmunofluorescencia.....	40
4.5.3. Inmunoultraestructural.....	40
4.5.4. Inmunocitoquímica.....	42
4.5.5. Estudios de co-localización.....	42



4.6.	Microscopia.....	44
4.7.	Inyección intracerebroventricular de peroxidasa.....	44
4.8.	Captura por microdissección láser.....	45
4.9.	RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real.....	46
4.9.1.	Extracción de ARN.....	46
4.9.1.1.	Extracción de ARN total.....	46
4.9.1.2.	Extracción de ARN por columna.....	46
4.9.2.	Transcripción reversa del ARN total (RT).....	47
4.9.3.	Amplificación del ADNc por PCR.....	48
4.9.4.	Electroforesis en geles de agarosa.....	49
4.9.5.	RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).....	49
4.10.	Inyección estereotáxica de células tumorales en el cerebro de cobayos.....	50
4.11.	Tinción histológica para la detección de colágeno.....	51
4.12.	Ensayos de inmunodetección de proteínas.....	51
4.12.1.	Obtención de extractos de proteínas totales.....	52
4.12.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.....	52
4.12.3.	Inmunodetección de las proteínas.....	53
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>54</b>
5.1.	Capítulo 1. Descripción del nicho neurogénico del cerebro de cobayo adulto.....	54

5.1.1.	El cerebro de cobayo adulto posee una extensión del ventrículo lateral, por el que fluye líquido cefalorraquídeo y que alcanza el bulbo olfatorio.....	54
5.1.2.	Los VLs y la EVL son revestidos por células ependimarias y bajo esta capa de células se disponen los neuroblastos a lo largo de la SVZ y de la EVL. ....	61
5.1.3.	La citoarquitectura de la SVZ y de la EVL de cobayo adulto es semejante a la citoarquitectura de la SVZ de ratón, pero posee características de la SVZ humana. ....	68
5.1.4.	La capacidad proliferativa y neurogénica se concentra en la SVZ y el envejecimiento reduce estas capacidades drásticamente.....	72
5.1.5.	Los neuroblastos que se originan en la SVZ, migran rodeando la EVL en dirección hacia el BO, donde se diferencian a neuronas periglomerulares y granulares. ....	78
5.2.	Capítulo 2. Estudio del efecto de la deficiencia en vitamina C en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.....	84
5.2.1.	La deficiencia en vitamina C en cobayos adultos induce una disminución en la cantidad de neuroblastos y de células proliferativas en la SVZ y en la EVL..	84
5.2.2.	La deficiencia en vitamina C altera la morfología de células, y la localización y composición celular en la SVZ y en la EVL de cerebro de cobayo adulto..	96
5.2.3.	El transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayo, y su expresión a nivel de mensajero aumenta en cobayos deficientes de vitamina C. ....	105

5.2.4.	SVCT2 se expresa en células endoteliales, en neuronas y en vasos sanguíneos del cerebro de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C. ....	108
5.3.	Capítulo 3. Generación y caracterización de un modelo de glioblastoma multiforme inducido en la SVZ del cerebro de cobayos adultos. ....	124
5.3.1.	Las células de glioblastoma multiforme humano, U87 – MG y C3, expresan marcadores neuronales, gliales y troncales. ....	124
5.3.2.	El modelo de GBM subventricular en el cerebro de cobayo reproduce las principales características histopatológicas de los GBMs humanos. ....	128
5.3.3.	El modelo GBM subventricular induce una gliosis reactiva, una infiltración microglial y un aumento en la cantidad de neuroblastos en el SVZ. ....	132
5.4.	Capítulo 4. Estudio del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la progresión de un glioblastoma multiforme humano en el cerebro de cobayo adulto.....	137
5.4.1.	La deficiencia en vitamina C posee un efecto anti-tumoral, reduciendo entre otros, la vasculatura glomeruloide y la infiltración de células de la microglía. ....	138
<b>VI. DISCUSION.....</b>		<b>164</b>
6.1.	El cerebro de cobayo adulto posee una extensión del ventrículo lateral. ....	164
6.2.	La citoarquitectura del nicho neurogénico de cobayo presenta características del nicho neurogénico humano. ....	168

6.3.	La deficiencia en vitamina C reduce la neurogénesis en la SVZ del cerebro de cobayo. ....	170
6.4.	La deficiencia en vitamina C altera la morfología de células, y la organización celular en la SVZ y en la EVL de cerebro de cobayo adulto. ....	173
6.5.	El transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayo adulto y su expresión aumenta en condiciones de deficiencia en vitamina C. ....	177
6.6.	SVCT2 se expresa en los vasos sanguíneos del cerebro de cobayo adulto. ...	178
6.7.	Las células de glioblastoma multiforme humano, U87 – MG y C3, expresan marcadores neuronales, gliales y troncales. ....	181
6.8.	El modelo de GBM subventricular en el cerebro de cobayo reproduce las principales características histopatológicas de los GBMs humanos. ....	182
6.9.	El modelo GBM subventricular induce una gliosis reactiva, una infiltración microglial y un aumento en la cantidad de neuroblastos en el SVZ. ....	183
6.10.	La deficiencia en vitamina C posee un efecto anti-tumoral, reduciendo entre otros, la vasculatura glomeruloide y la infiltración de células de la microglía. ....	186
<b>VII. CONCLUSIONES .....</b>		<b>198</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>200</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Localización y cito-arquitectura de la zona subventricular del cerebro de ratón adulto.....	3
Figura 2.	Localización y cito-arquitectura de la zona subventricular del cerebro humano adulto.....	9
Figura 3.	Comparación de la estructura que conecta la SVZ con el bulbo olfatorio en los cerebros de ratón y humano.....	11
Figura 4.	Análisis de la disposición del ventrículo lateral y de la extensión del ventrículo lateral en el cerebro de cobayo adulto.....	56
Figura 5.	Análisis de la difusión de peroxidasa a través del VL y de la EVL del cerebro de cobayo.....	57
Figura 6.	Análisis ultraestructural de la difusión de peroxidasa a través de las cavidades ventriculares del cerebro de cobayo adulto, usando microscopio electrónica de transmisión.....	59
Figura 7.	Localización de las células ependimarias en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.....	62
Figura 8.	Localización de los neuroblastos en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.....	63
Figura 9.	Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.....	66
Figura 10.	Análisis ultraestructural de la SVZ del cerebro de cobayo, usando microscopía electrónica de transmisión.....	70

Figura 11. Análisis ultraestructural de la EVL del cerebro de cobayo, usando microscopia electrónica de transmisión.....	73
Figura 12. Detección de las células BrdU positivas (células tipo B y tipo C) en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.....	76
Figura 13. Composición celular de la SVZ y de la EVL en cobayos de 6 y 12 meses de edad.....	79
Figura 14. Análisis de la migración de neuroblastos en el cerebro de cobayo adulto.....	81
Figura 15. Análisis del destino de neuroblastos generados la SVZ del cerebro de cobayo adulto.....	83
Figura 16. Detección de neuroblastos en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.....	85
Figura 17. Detección de las células PCNA positivas (células tipo B y tipo C) en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.....	88
Figura 18. Detección de las células BrdU positivas (células tipo B y tipo C) en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.....	89
Figura 19. Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la SVZ del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.....	92
Figura 20. Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la EVL del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.....	94
Figura 21. Reconstrucción en tres dimensiones del área ocupada por los neuroblastos en la EVL de un cobayo control y uno con 21 días de deficiencia en vitamina C.....	97
Figura 22. Análisis ultraestructural de la SVZ de cerebros de cobayos deficientes en vitamina C.....	100

Figura 23. Análisis ultraestructural de la EVL del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.....	103
Figura 24. Expresión de SVCT2 en la corteza cerebral de cobayo adulto.....	106
Figura 25. Análisis del nivel de expresión del ARN mensajero de SVCT2 en el cerebro de cobayos control y en el cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.....	107
Figura 26. Expresión y localización de SVCT2 en la SVZ del cerebro de cobayos control y cobayos deficientes en vitamina C.....	109
Figura 27. Expresión y localización de SVCT2 en la corteza cerebral de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C.....	112
Figura 28. Expresión y localización de SVCT2 en vasos sanguíneos de tumores cerebrales humanos.....	115
Figura 29. Análisis de colocalización entre SVCT2, GLUT1 y vimentina en vasos sanguíneos de cerebro de cobayo control.....	116
Figura 30. Análisis de colocalización entre SVCT2, GLUT1 y vimentina en vasos sanguíneos de cerebro de cobayo deficientes en vitamina C.....	119
Figura 31. Análisis inmunoultraestructural de la localización de SVCT2 en vasos sanguíneos del cerebro de cobayo control.....	121
Figura 32. Análisis inmunoultraestructural de la localización de SVCT2 en vasos sanguíneos del cerebro de cobayo deficiente en vitamina C.....	123
Figura 33. Expresión de marcadores de múltiples linajes en las células U87 – MG y en las células C3.....	126
Figura 34. Análisis del modelo de GBM inducido en la SVZ del cerebro de cobayo con las células U87 – MG.....	129

Figura 35. Análisis de las principales características histopatológicas del modelo de GBM subventricular en cerebro de cobayo.....	131
Figura 36. Análisis de la matriz extracelular de colágeno en el modelo de GBM subventricular en cerebro de cobayo.....	133
Figura 37. Análisis histopatológico del modelo de GBM inducido en la SVZ del cerebro de cobayo.....	135
Figura 38. Cuantificación de neuroblastos y células BrdU positivas en la SVZ adyacente al tumor.....	136
Figura 39. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la generación de la matriz extracelular de colágeno.....	139
Figura 40. Comparación de las características histopatológicas de glioblastomas multiformes inducidos en la SVZ de cobayos control y de cobayos con deficiencia en vitamina C.....	142
Figura 41. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de masa ventricular dorsal en tumores U87 – MG.....	145
Figura 42. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de masa ventricular dorsal en tumores C3.....	148
Figura 43. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de vasculatura glomeruloide en tumores U87 – MG y en tumores C3.....	151
Figura 44. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de zona necrótica en tumores U87 – MG y en tumores C3.....	154
Figura 45. Análisis de los parámetros de invasión en tumores U87 – MG y en tumores C3.....	157

Figura 46. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de infiltración microglial en tumores U87 – MG y en tumores C3.....	159
Figura 47. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la capacidad proliferativa de tumores U87 – MG y de tumores C3.....	162
Figura 48. Disposición de las cavidades ventriculares y composición celular de la SVZ y de la EVL en el cerebro de cobayo adulto.....	167
Figura 49. Efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la composición celular de la SVZ y de la EVL.....	176
Figura 50. Efectos de la deficiencia en vitamina C sobre la progresión de tumores U87 – MG y de tumores C3.....	197



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Anticuerpos primarios.....	43
Tabla 2: Anticuerpos secundarios.....	43
Tabla 3. Partidores.....	49
Tabla 4. ....	125



## ABREVIATURAS

3D:	Tridimensional
AA:	Ácido Ascórbico
ADN:	Acido Desoxiribonucleico
ADNc:	Acido Desoxiribonucleico Copia
Ara-C:	Citosina - $\beta$ - D - Arabinofuranosido
ARNm:	Acido Ribonucleico Mensajero
ATP:	Adenosin Trifosfato
BMPs:	Proteínas Morfogenéticas Óseas
BO:	Bulbo Olfatorio
BrdU:	5-Bromo-2-Deoxiuridina
BSA:	Albúmina de Suero de Bovino
BTSCs:	Células Madre de Tumores Cerebrales
CA9:	Anhidrasa Carbónica 9
Cy2:	Cianina 2
Cy3:	Cianina 3
Cy5:	Cianina 5
DDSA:	Anhídrico Dodecenilsuccinico
DHA:	Ácido Deshidroascórbico
DMEM:	Medio Eagle Modificado por Dulbecco
D-MEMF12:	Medio Eagle Modificado por Dulbeco con Suplemento F12
DMSO:	Dimetilsulfóxido
dNTPs:	Desoxiribonucleótidos
DTT:	Ditiotreiol
EAAT2:	Transportador de Aminoácidos Exitatorios Isoforma 2
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetracético
EGF:	Factor de Crecimiento Epidermal
EGFR:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
ENU:	N-etil-N-nitrourea
EVL:	Extensión del Ventrículo Lateral

FGF8:	Factor de Crecimiento de Fibroblastos 8
GAPDH:	Gliceraldehído-3-Fosfato Deshidrogenasa
GBMs:	Glioblastomas Multiformes
GFAP:	Proteína Fibrilar Ácida de la Glia
GLUT1:	Transportador de Glucosa Isoforma 1
GLYT2:	Transportador de Glicina Isoforma 2
HIF-1:	Factor Inducido por Hipoxia 1
HRP:	Peroxidasa de Rábano Picante
IDH1:	Isocitrato Deshidrogenasa 1
IGF-2:	Factor de Crecimiento de Insulina 2
IPCs:	Células Precursoras Inducidas
kDa:	Kilo Dalton
LCR:	Líquido Cefalorraquídeo
MAP2:	Isoforma 2 de la Proteína Asociada a Microtúbulos
MDA:	Malondialdehído
MRI:	Imagen por Resonancia Magnética
mTOR:	Blanco de Rapamicina en Mamíferos
MWM:	Laberinto de Agua de Morris
NAD:	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NF1:	Proteína Relacionada a la Neurofibromatosis 1
NSCs:	Células Madres Neurales
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PCFT:	Transportador de Folato Acoplado a Protones
PCNA:	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDGFRA:	Receptor Alfa del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PFA:	Para-formaldehído
PFS:	Supervivencia Libre de Progresión
PK2:	Prokineticina 2
PKR1:	Receptor de Prokineticina 1
PKR2:	Receptor de Prokineticina 2

PTEN:	Proteína Fosfatasa Homóloga a Tensina
RMS:	Corriente de Migración Rostral
ROS:	Especies Reactivas del Oxígeno
RT:	Transcripción Reversa
qRT-PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa con Transcripción Reversa
S18:	Proteína Ribosómica S18
SBF:	Suero Bovino Fetal
SDS:	Lauril Sulfato de Sodio
SGZ:	Zona Subgranular
SHG:	Generación de Segundos Armónicos
SHH:	Ligando Sonic Hedgehog
SNC:	Sistema Nervioso Central
SVCT1:	Transportador de Sodio-Ascorbato Isoforma 1
SVCT2:	Transportador de Sodio-Ascorbato Isoforma 2
SVZ:	Zona Subventricular
TAE:	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TBS:	Tampón Tris Salino
TCGA:	Atlas de Genoma del Cáncer
TEMED:	N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamida
Tris:	Tris(hidroximetil)Amino-Metano
TRPC6:	Receptor de Potencial Transitorio Catiónico 6
TUNEL:	Ensayo de Marcaje con dUTP por la Deoxinucleotidil Transferasa Terminal
VEGF:	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular
VL:	Ventrículo Lateral

## RESUMEN

En la zona subventricular (SVZ) del cerebro adulto convergen dos procesos biológicos importantes; por un lado, en la SVZ ocurre la neurogénesis, que se define como la génesis de neuroblastos a partir de células madres neurales (NSCs); y por otro lado, debido a su potencial proliferativo, actualmente se relaciona a la SVZ con la génesis y progresión de tumores cerebrales, como el glioblastoma multiforme (GBM). Se describe que una subpoblación de células de los GBMs, comparte numerosas características con las NSCs, destacando las vías de señalización y moléculas que las regulan. La vitamina C es una molécula que ejerce un efecto sobre estos dos tipos celulares, y por consiguiente, sobre la neurogénesis y la progresión tumoral. En relación a la neurogénesis, la vitamina C aumenta la generación de neuronas a partir de células precursoras embrionarias, y los cobayos deficientes en esta vitamina tienen un menor número de neuronas en el hipocampo adulto. En relación a la progresión tumoral los resultados son controversiales; se describe que la vitamina C aumenta la supervivencia de pacientes con cáncer, y por otro lado, que antagoniza el efecto de drogas quimioterapéuticas y favorece la progresión del tumor. Ahora bien, se desconoce el efecto de la vitamina C en la neurogénesis adulta de la SVZ y en la progresión tumoral de GBMs localizados en la SVZ. Para resolver estas interrogantes utilizamos el modelo animal del cobayo, debido a que su SVZ presentaría semejanzas con la SVZ humana ya que presenta una extensión del ventrículo lateral (EVL) similar a la descrita en el cerebro humano. Por otro lado, privando de vegetales a los cobayos se les puede inducir una deficiencia en vitamina C, igual que en humanos. De esta forma, nuestra hipótesis es que la estructura de la zona subventricular del cerebro de cobayo adulto es similar a la descrita en el cerebro humano, y que la deficiencia en vitamina C reduce la neurogénesis y la progresión de un tumor en esta región

Mediante un análisis inmunohistoquímico y de inmunofluorescencia, identificamos y localizamos neuroblastos (tubulina  $\beta$ III +), células precursoras (BrdU +) y células endimarias (vimentina +) en la SVZ y en la EVL. Determinamos que la EVL se encuentra revestida por células endimarias y es rodeada por neuroblastos en migración. A través de un análisis ultraestructural, comprobamos que las células endimarias poseen cilios y microvellosidades en su superficie apical y que los neuroblastos y astrocitos se disponen muy densamente bajo la pared endimaria. Mediante un marcaje con BrdU determinamos que las células proliferativas

se concentran en la SVZ, mientras que en la EVL las células se encuentran en migración. Determinamos que la estructura de la EVL se mantiene en animales envejecidos, pero se reduce el potencial proliferativo de la SVZ. Analizamos el efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la neurogénesis, demostrando que esta deficiencia disminuye significativa y progresivamente los neuroblastos en la SVZ y en la EVL, lo que se relaciona a una reducción de las células proliferativas. A través de un análisis ultraestructural, determinamos que en animales deficientes en vitamina C se produce una reducción en la cantidad de neuroblastos; sin embargo, los astrocitos se mantienen. En la EVL de animales deficientes determinamos que se produce una alteración en la morfología de las diferentes células. A continuación, mediante análisis de RT-PCR, de Western blot y de inmunohistoquímica, demostramos que el transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayo, específicamente en células endoteliales, en neuronas y en vasos sanguíneos. Mediante un análisis ultraestructural, demostramos que SVCT2 se localiza de forma heterogénea en la superficie luminal de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Posteriormente, mediante un análisis histopatológico y de inmunofluorescencia, estudiamos un modelo de GBM subventricular y el efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la progresión tumoral. Determinamos que el modelo de GBM reproduce las principales características de los GBMs humanos y que la deficiencia en vitamina C reduce la vasculatura glomeruloide y la infiltración microglial en tumores U87 – MG, y asimismo, reduce la masa tumoral, la vasculatura glomeruloide, la invasión, la infiltración microglial y la proliferación en tumores C3.

Concluimos que, dadas las similitudes con el humano, el cobayo es un buen modelo para estudiar la neurogénesis y la progresión tumoral. Adicionalmente, concluimos que la deficiencia en vitamina C altera la actividad y el potencial neurogénico de la SVZ del cerebro de cobayo adulto, y por otro lado, que la deficiencia en vitamina C actúa en forma anti-tumoral, alterando numerosos parámetros histopatológicos de la progresión tumoral de los GBMs.

## ABSTRACT

Two important biological processes converge in the subventricular zone (SVZ) of adult brain: firstly, the neurogenesis, which is defined as the genesis of neuroblasts from neural stem cells (NSCs), takes place in the SVZ; and secondly, the genesis and progression of brain tumors, such as glioblastoma multiforme (GBM), which are currently linked to the SVZ due to its proliferative potential. It has been described that a small population of the GBM cells shares several features with NSCs, highlighting the signaling pathways and molecules that regulate them. Vitamin C is a molecule that exerts an effect on these two cell types, and therefore, on neurogenesis and tumor progression. Regarding neurogenesis, vitamin C increases the generation of neurons from embryonic precursor cells, and vitamin C-deficient guinea pigs have fewer neurons in the adult hippocampus. Regarding tumor progression, the results are controversial; it is described that vitamin C increases the survival of cancer patients, and also that vitamin C antagonizes the effect of chemotherapeutic drugs and promotes tumor progression. However, the effects of vitamin C on the SVZ neurogenesis and tumor progression of GBMs located in the SVZ are unknown. To address these questions, we used guinea pigs as the animal model, since their SVZ has certain similarities with the human SVZ, and their brains have an extension of the lateral ventricle (EVL) similar to that described in the human brain. Furthermore, guinea pigs deprived from vegetables develop a vitamin C deficiency, like humans. Therefore, our hypothesis is that the structure of the subventricular zone of adult guinea pig brain is similar to that described in the human brain, and that the vitamin C-deficiency reduces neurogenesis and tumor progression in this region.

By means of immunohistochemical and immunofluorescence analysis of the SVZ and ELV, we identified and located neuroblasts ( $\beta$ III tubulin +), progenitor cells (BrdU +) and ependymal cells (vimentin +). We determined that the ELV is lined by ependymal cells and is surrounded by migrating neuroblasts. Ultrastructural analysis proved that ependymal cells have cilia and microvilli on their apical surface and that neuroblasts and astrocytes are very tightly arranged below the ependymal wall. Using BrdU labeling we determined that proliferating cells are located in the SVZ, while migrating cells are detected in the ELV. We also determined that the ELV structure is preserved in aged animals, but the

proliferative potential of the SVZ is reduced. We analyzed the effect of vitamin C-deficiency on neurogenesis and demonstrated a significant and progressive reduction of neuroblasts in the SVZ and ELV, which was related to a reduction of proliferating cells. By means of ultrastructural analysis, we determined that the amount of neuroblasts is reduced in deficient animals, but astrocytes are preserved. In the ELV of deficient animals we determined that the morphology of the different cells is altered. Then, by RT-PCR, Western blot and immunohistochemical analysis, we demonstrated that the vitamin C transporter, SVCT2, is expressed in the guinea pig brain, specifically in ependymal cells, neurons and blood vessels. Ultrastructural analysis revealed that SVCT2 is located on the luminal surface of endothelial cells from blood vessels, in a heterogeneous fashion. Subsequently, using histopathological and immunofluorescence analysis, we studied a subventricular GBM model and the effect of vitamin C-deficiency on tumor progression. We observed that the GBM model reproduces the main features of the human GBMs, and that vitamin C-deficiency reduces glomeruloid vasculature and microglial infiltration in U87 - MG tumors, and likewise, reduces tumor mass glomeruloid vasculature, invasion, microglial infiltration and proliferation in C3 tumors.

We conclude that, given the similarities with humans, the guinea pig is a good model to study neurogenesis and tumor progression. Additionally, we conclude that vitamin C-deficiency alters the activity and neurogenic potential of the SVZ from the adult guinea pig brain, and on the other hand, vitamin C-deficiency shows an anti-tumoral effect, altering several histopathologic parameters of the tumor progression of GBMs.

## I. INTRODUCCION

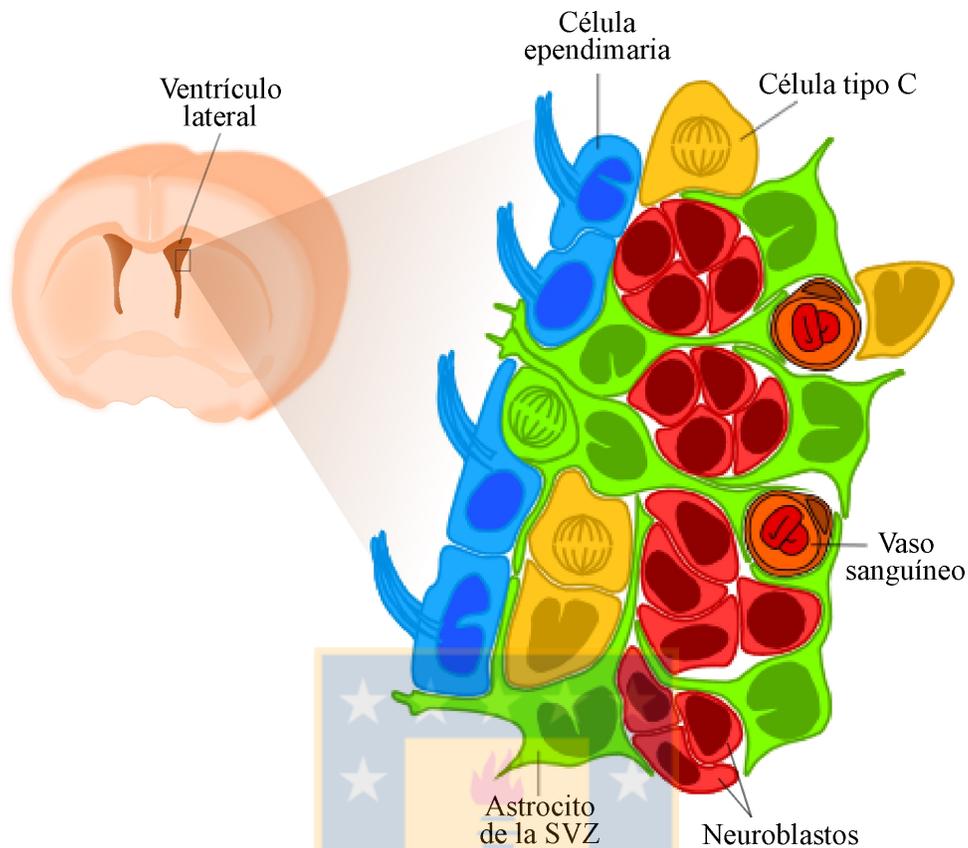
### 1.1. Neurogénesis en mamíferos adultos.

La mayoría de los tejidos adultos poseen una reserva de células madres que pueden renovar los componentes celulares diferenciados de dichos tejidos; sin embargo, solo hasta hace pocos años se pensaba que el cerebro representaba una excepción a esta regla. La escasez de figuras mitóticas sumado a una casi total irreversibilidad de las lesiones del sistema nervioso, reforzaron la noción de que la población neuronal de un individuo adulto solo puede decrecer a lo largo del tiempo (Gross, 2000). Esta perspectiva comenzó a cambiar en los años 60 cuando se describió por primera vez la existencia de células con características de neuronas que incorporaban timidina tritiada (Altman, 1962). Más adelante, mediante un análisis ultraestructural, se confirmó que el marcaje con tritio incluía a células con características estructurales de neuronas (Kaplan y Hinds, 1977). Estos hallazgos sumados a una serie de estudios posteriores - primero en cerebros de aves (Goldman y Nottebohm, 1983), luego en cerebro de roedores (Bayer, 1983), humanos (Eriksson y col., 1998) y varias otras especies - permitieron desmentir que la neurogénesis se encontraba ausente en el cerebro adulto. Actualmente, se conoce que las células madres neurales (NSCs) persisten en regiones germinales restringidas del cerebro adulto, y dan origen a células gliales y también a neuronas (Lois y Alvarez-Buylla, 1993). Dos regiones germinales, denominadas nichos neurogénicos, albergan las NSCs en el cerebro de mamíferos adultos: la zona subventricular (SVZ), a lo largo de las paredes de los ventrículos laterales (VLs) (Lois y Alvarez-Buylla, 1993) y la zona subgranular (SGZ), en el giro dentado del hipocampo (Kaplan y Bell, 1984).

Uno de los hallazgos más determinantes en relación a la existencia de NSCs en el cerebro de mamíferos adultos fue presentado por Reynolds y Weiss en 1992, quienes aislaron células desde la SVZ de un cerebro de ratón adulto y demostraron que proliferaban en presencia del factor de crecimiento epidermal (EGF) y que formaban esferas de células precursoras indiferenciadas, a las que se les denominó neurósferas (Reynolds y Weiss, 1992). Las neurósferas podían ser amplificadas para formar más neurósferas o diferenciadas a células gliales o neuronales al remover el EGF del medio de cultivo. De esta manera, mediante el ensayo de neurósferas fue posible demostrar que las células aisladas desde la SVZ presentaban las dos propiedades que definen a una célula madre: la capacidad de auto-renovación y multipotencia (Reynolds y Weiss, 1992).

## **1.2. Nicho neurogénico en zona subventricular.**

Como se mencionó en la sección anterior, los principales nichos neurogénicos presentes en el cerebro de mamíferos adultos, son la SGZ y la SVZ. Esta última corresponde al nicho neurogénico más extenso, abarcando gran parte de las paredes de los VLs, y además, concentrando la mayor cantidad de NSCs, quienes cada día dan origen a miles de nuevas neuronas, también denominadas neuroblastos (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). La composición y arquitectura celular de la SVZ ha sido bien caracterizada por medio de técnicas inmunohistoquímicas y por análisis ultraestructural (Doetsch y col., 1997). De esta forma, se han definido al menos cuatro tipos de células diferentes: los astrocitos de la SVZ o células tipo B, las células precursoras transientes o células tipo C, los neuroblastos o células tipo A y las células endimarias o células tipo E (Doetsch y col., 1997; Garcia-Verdugo y col., 1998). Las células endimarias ciliadas componen un



**Figura 1. Localización y cito-arquitectura de la zona subventricular del cerebro de ratón adulto.**

Se muestra un esquema del cerebro de un ratón adulto cortado en sentido frontal, indicando la localización de los ventrículos laterales (VLs). En la pared lateral de los VLs se localiza la SVZ (región ampliada) que está formada por cuatro tipos celulares: las células ependimarias (células celestes) que separan el lumen del ventrículo de la SVZ; los astrocitos (células verdes) que corresponden a las células madres neurales del cerebro adulto, se localizan bajo la pared ependimaria y presentan un proceso que contacta el lumen del ventrículo y otro proceso que contacta los vasos sanguíneos; las células tipo C (células amarillas) que corresponden a un precursor transiente que al dividirse generan a los neuroblastos y se localizan adyacentes a los astrocitos; y finalmente, los neuroblastos (células rojas) que corresponden a las nuevas neuronas generadas en la SVZ y se localizan formando agrupaciones rodeadas por astrocitos.

epitelio que separa la cavidad de los VLs de la SVZ. Bajo este epitelio, los neuroblastos se organizan formando cadenas que son rodeadas por astrocitos de la SVZ. Adyacente a las cadenas de neuroblastos, se localizan las células tipo C formando pequeños grupos (Doetsch y col., 1997) (Figura 1).

Durante años la identidad de las NSCs adultas fue controversial, por un lado se proponía al astrocito de la SVZ como la NSC, y por otro lado, a la célula endimaria (Johansson y col., 1999). Sin embargo, estudios posteriores confirmaron que las células endimarias son quiescentes y que bajo condiciones normales no contribuyen a la generación de nuevas neuronas en ratones adultos (Chojnacki y col., 2009). Ahora bien, bajo condiciones patológicas, en el caso de un accidente cerebrovascular, se describió que las células endimarias se activan, dando origen a neuroblastos y astrocitos, aunque sin ser capaces de auto-renovarse para mantener su propia población (Carlen y col., 2009). En paralelo, para identificar al astrocito de la SVZ como la NSC adulta, se realizaron infusiones de la droga antimetabólica, citosina -  $\beta$  - D - arabinofuranosido (Ara-C) durante 6 días en cerebros de ratones adultos (Doetsch y col., 1999a). El tratamiento eliminó por completo a los neuroblastos y a las células tipo C, mientras que las células endimarias y algunos astrocitos de la SVZ se mantuvieron. Doce horas después del tratamiento, los astrocitos de la SVZ comenzaron a dividirse, dando origen a las células tipo C, las que a su vez originaron a los neuroblastos. Dentro de 10 días, la SVZ se regeneró completamente; no obstante, a lo largo del experimento no se observó que las células endimarias incorporaran marcadores mitóticos. (Doetsch y col., 1999a).

En la actualidad se conoce que el astrocito de la SVZ se divide en forma asimétrica dando origen a otro astrocito de la SVZ (auto-renovación) y a una célula tipo C, la que corresponde a un progenitor de amplificación transiente con un potencial de diferenciación

más restringido que el astrocito de la SVZ multipotente (Ponti y col., 2013). La célula tipo C se divide simétricamente tres veces aproximadamente, dando origen a los neuroblastos y a su vez, los neuroblastos que se van generado en la SVZ migran en dirección rostral para diferenciarse a neuronas en el bulbo olfatorio (BO) y durante su migración se dividen simétricamente en una o dos ocasiones (Ponti y col., 2013).

La SVZ constituye un microambiente muy propicio para la neurogénesis en donde diferentes factores modulan este proceso por medio de la regulación de la actividad de astrocito de la SVZ (Ihrie y Alvarez-Buylla, 2011; Lim y col., 2007b). Los astrocitos de la SVZ presentan características epiteliales, poseen un proceso apical que se introduce entre las células endimarias y contacta la cavidad ventricular, y poseen un pie terminal que contacta los vasos sanguíneos presentes en la SVZ (Mirzadeh y col., 2008) (Figura 1, células verdes). Como consecuencia de su morfología, los astrocitos de la SVZ pueden ser regulados por medio de tres dominios diferentes (Fuentealba y col., 2012). El dominio I o apical, a través del proceso apical, recibe señales regulatorias desde las células endimarias vecinas y desde los factores solubles presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Fuentealba y col., 2012). Las células endimarias juegan un rol fundamental al secretar nogina, una proteína que neutraliza el efecto inhibitorio que tienen sobre la neurogénesis las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) producidas por los astrocitos (Lim y col., 2000). Los factores solubles presentes en el LCR como sonic hedgehog (SHH), Wnt, ácido retinoico y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-2) también se ha descrito que regulan la neurogénesis (Huang y col., 2010; Lehtinen y col., 2011). A continuación, en el dominio II o intermedio, se produce una amplia interacción célula-célula entre el astrocito y células tipo C, neuroblastos, terminales nerviosos y células de la microglía, cada uno de los cuales modula la actividad neurogénica o proliferativa

(Fuentealba y col., 2012). Por último, el dominio III o distal, donde los procesos basales en forma de pie terminal que contactan vasos sanguíneos reciben señales desde el torrente sanguíneo y de factores derivados de las células endoteliales (Fuentealba y col., 2012). Además, a través de los 3 dominios, componentes de la matriz extracelular, de la lamina basal y proteoglicanos contribuyen al proceso neurogénico en la SVZ, destacándose tenascina-C, que sensibiliza a las NSCs frente a factores mitógenos (Faissner y Reinhard, 2015). De esta forma, el microambiente de la SVZ juega un rol activo respaldando a las NSCs, donde los constituyentes celulares y moleculares de esta zona regulan varios aspectos de la neurogénesis y son esenciales para el establecimiento del nicho neurogénico (Doetsch, 2003).

Como se mencionó más arriba los neuroblastos se localizan formando cadenas en la SVZ, estas cadenas se extienden a lo largo de las paredes de los VLs y se fusionan en la parte anterior de la SVZ originando una vía restringida conocida como corriente de migración rostral (RMS), la que se extiende en dirección rostroventral y se conecta con la región central del BO (Rousselot y col., 1995) (Figura 3). Más de 30.000 neuroblastos migran diariamente desde la SVZ hacia el BO a través de la RMS (Lois y Alvarez-Buylla, 1994). Para la migración de los neuroblastos, éstos se asocian unos a otros, formando agregados celulares elongados que asemejan cadenas, y son rodeados por astrocitos especializados que constituyen verdaderos túneles de migración (Peretto y col., 2005). Sin bien, los túneles no son esenciales para la migración en cadenas, factores secretados por los astrocitos estimulan la migración de los neuroblastos (Mason y col., 2001). Asimismo, los túneles previenen que los neuroblastos se separen en forma prematura de su ruta hacia al BO (Alvarez-Buylla y Garcia-Verdugo, 2002).

Los neuroblastos en migración tienen una morfología alargada con un proceso conductor de 20 a 40  $\mu\text{m}$  de largo y ocasionalmente con un proceso posterior fino (Wichterle y col., 1997). Cada neuroblasto migra deslizándose sobre sus neuroblastos vecinos, en ciclos de avance rápido y periodos estacionarios. De esta forma, la cadena de neuroblastos sirve como soporte de migración de los neuroblastos que la forman (Wichterle y col., 1997). Una vez que los neuroblastos han alcanzado la región central del BO, se separan de las cadenas y migran individualmente a las capas más superficiales, donde se diferencian a neuronas granulares y periglomerulares (Luskin, 1993). Recientemente, se describió que la clase de neurona que se genera en el BO depende de dónde se encontraba localizado el astrocito de la SVZ que le dio origen a dicha neurona (área dorsal, lateral, anterior o posterior de la pared ventricular) (Merkle y col., 2014; Merkle y col., 2007). Por esta razón, actualmente se considera a los astrocitos de la SVZ como una población heterogénea de NSCs.

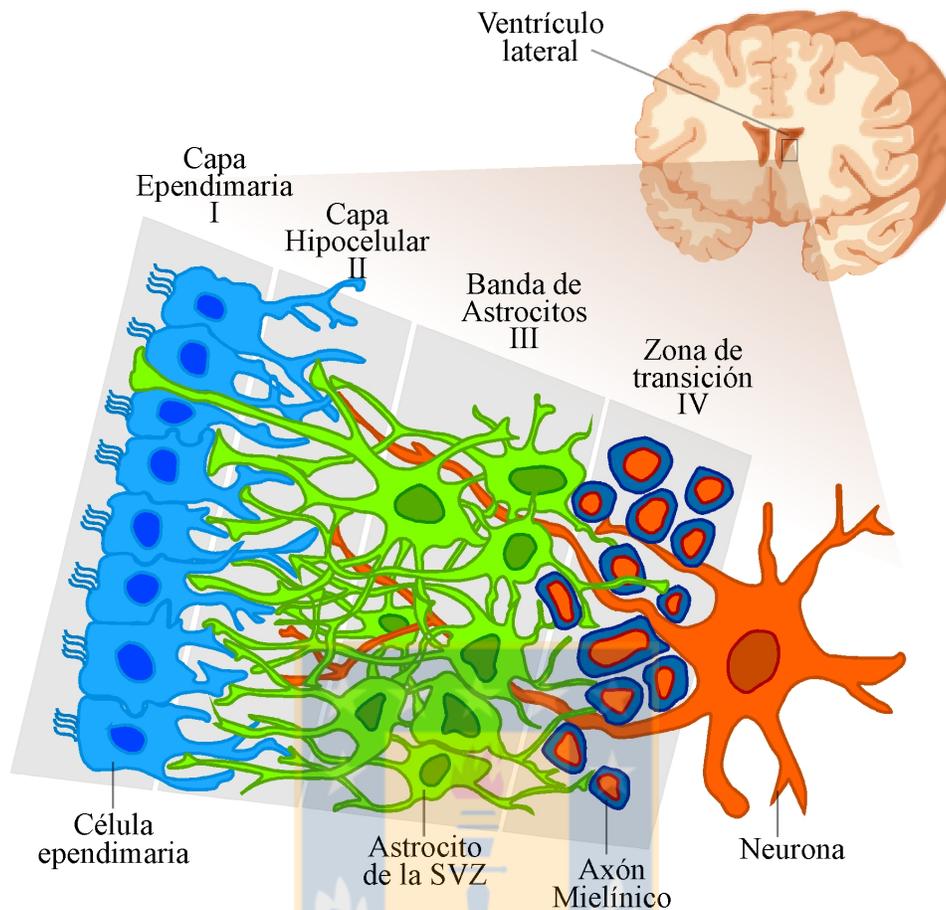
Aún no se establece con claridad qué induce la migración de neuroblastos hacia el BO; sin embargo, se postula que mecanismos quimiorrepelentes y/o quimioattractantes podrían estar involucrados. La proteína quimiorrepelente, Slit, y sus receptores, Robo1-3, podrían corresponder a uno de los mecanismos (Sawamoto y col., 2006). Slit es secretada por los plexos coroideos y se distribuye en un gradiente de concentración en el LCR. Se encuentra en mayor concentración en la región caudal, desde donde difunde hacia la SVZ induciendo la migración de los neuroblastos hacia regiones rostrales (menor concentración de Slit) (Sawamoto y col., 2006). Otra señal descrita es la proteína quimioattractante prokineticina 2 (PK2) (Ng y col., 2005). La PK2 es expresada en el BO y sus receptores PKR1 y PKR2 son expresados en los neuroblastos en migración y en las células precursoras transientes en la SVZ y RMS. Ratones *knock-out* para PK2 tienen una disrupción severa de

la arquitectura del BO, aunque aún no está claro si esto es solo un efecto en la interrupción de la migración en la RMS (Ng y col., 2005).

### **1.3. Nicho neurogénico en la zona subventricular humana.**

Así como en roedores y otras especies, la neurogénesis también ocurre en el cerebro humano adulto. La primera evidencia se obtuvo al estudiar los cerebros de pacientes con cáncer, que habían recibido inyecciones intravenosas de bromodeoxiuridina (BrdU), encontrándose que algunas células de la SVZ y del giro dentado del hipocampo se marcaban con BrdU, confirmando la presencia de estas dos zonas germinales en humanos adultos (Eriksson y col., 1998). Posteriormente, se demostró que astrocitos aislados desde la SVZ del cerebro humano adulto pueden actuar como NSCs, formando neurósferas y generando neuronas *in vitro* (Sanai y col., 2004).

La citoarquitectura de la SVZ humana adulta fue descrita y se encontró que es significativamente diferente a la descrita previamente en roedores. En el cerebro humano adulto, la SVZ está compuesta por 4 capas diferentes (Quinones-Hinojosa y col., 2006) (Figura 2). La capa lindante con los VLs (Capa I) corresponde a una monocapa de células endimarias que poseen cilios apicales y expansiones basales paralelas o perpendiculares a la superficie ventricular. Algunas de estas expansiones endimarias interaccionan con los procesos de astrocitos en la capa hipocelular (Capa II) (Quinones-Hinojosa y col., 2006). Esta última, adyacente a la capa I, es rica en procesos de astrocitos y carente de cuerpos celulares. Se cree que esta capa puede corresponder a un remanente de la actividad germinal en etapas más tempranas o como un camino para la migración celular. Vecina a la capa hipocelular se encuentra una banda de cuerpos celulares de astrocitos (capa III)

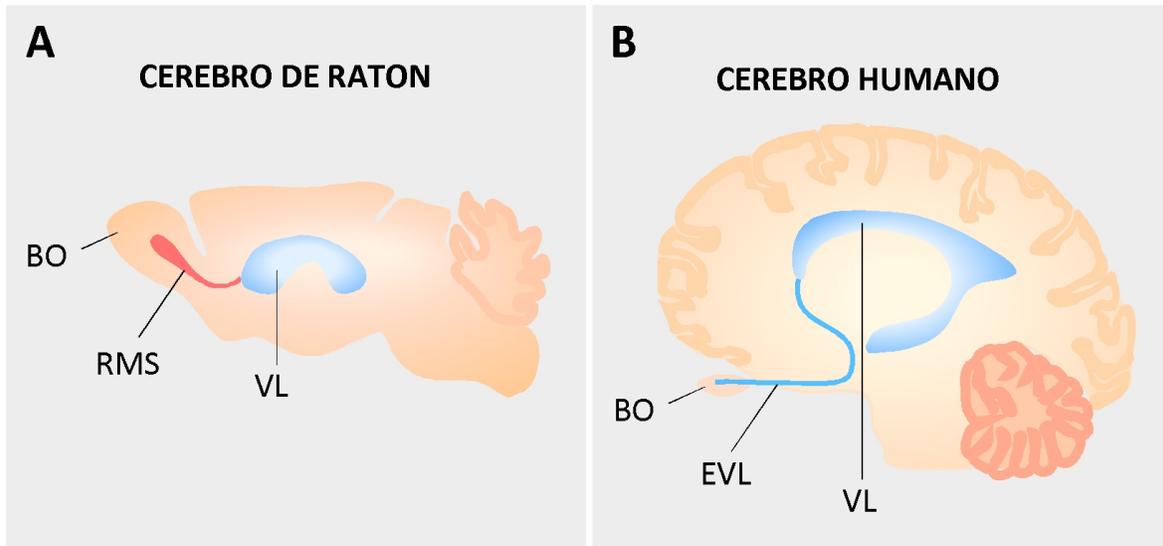


**Figura 2. Localización y cito-arquitectura de la zona subventricular del cerebro humano adulto.**

Se muestra un esquema del cerebro humano adulto cortado en sentido frontal, indicando la localización de los ventrículos laterales (VLs). En la pared lateral de los VLs se localiza la SVZ (región ampliada) que, a diferencia de lo descrito en ratón, está compuesta por cuatro capas celulares. La capa I o endimaria (células celestes) que está formada por células endimarias que presentan cilios apicales y procesos basales. La capa II o hipocelular que está formada principalmente por procesos de células endimarias (procesos celestes) y procesos de astrocitos (procesos verdes). La capa III o banda astrocítica que está formada por cuerpos de astrocitos de la SVZ (células verdes). La capa IV o zona de transición, que como su nombre lo indica, corresponde a una zona de transición entre la SVZ y en parénquima cerebral circundante. En la zona de transición se encuentran neuronas (célula anaranjada) y axones mielinizados (estructuras azules).

(Quinones-Hinojosa y col., 2006). Una subpoblación de estos astrocitos puede proliferar *in vivo*, y serían quienes dan origen a las neurósferas *in vitro* (Sanai y col., 2004). Sin embargo, mediante los marcadores de proliferación Ki-67 y PCNA, se demostró que el número de células en proliferación en la SVZ humana, es significativamente menor que en la SVZ de roedores. La última capa (capa IV), se caracteriza por la presencia de mielina y denota una zona de transición entre la banda de astrocitos y el parénquima cerebral adyacente (Quinones-Hinojosa y col., 2006) (Figura 2).

Actualmente se acepta que la SVZ humana adulta posee una reserva de NSCs; sin embargo, persiste una controversia en relación a la existencia de una RMS en el cerebro humano. Un primer estudio describió la presencia de una conexión entre la SVZ y el BO, que contenía cavidades endimarias discontinuas, las que serían el remanente de un ventrículo olfatorio embrionario (Sanai y col., 2004). Por otro lado, también describió la presencia de células con morfología migratoria, aún cuando no se observaron cadenas de neuroblastos en migración o una RMS propiamente tal (Sanai y col., 2004). Más adelante, se determinó que la RMS humana existe como una vía de migración robusta antes de 18 meses de edad, disminuyendo en niños mayores y prácticamente extinguiéndose en la edad adulta (Sanai y col., 2011). En contraste, otro estudio demostró la presencia de una cavidad ventricular continua, denominada extensión del VL (EVL), que alcanza el BO y que va acompañada de una RMS conteniendo neuroblastos (Curtis y col., 2007). Además, al realizar un análisis más detallado de la organización celular en la corriente migratoria humana, se describió que la organización de la EVL es comparable a la organización de la SVZ en varios aspectos (Kam y col., 2009) (Figura 3). Si bien, hasta el día de hoy no se establece con certeza si existe una EVL continua y si es acompañada por una RMS, existe



**Figura 3. Comparación de la estructura que conecta la SVZ con el bulbo olfatorio en los cerebros de ratón y humano.**

(A) Esquema del cerebro de ratón adulto cortado en sentido sagital, en donde se señala la localización del ventrículo lateral (VL), de la corriente de migración rostral (RMS) y del bulbo olfatorio (BO). En el cerebro de ratón adulto, los neuroblastos que se generan en la SVZ, posteriormente migran a través de la RMS en dirección al BO, donde se integrarán como neuronas maduras. (B) Esquema del cerebro humano adulto cortado en sentido sagital, en donde se señala la localización del ventrículo lateral (VL), de la extensión del ventrículo lateral (EVL) y del bulbo olfatorio (BO). En el cerebro humano no se ha definido la presencia de una RMS; sin embargo, se describió la existencia de una pequeña cavidad ventricular que conecta el VL con el BO.

un amplio consenso en relación a la presencia de neuronas jóvenes, recién diferenciadas en el BO humano adulto (Maresh y col., 2008).

Los modelos murinos son ampliamente usados para el estudio de la neurogénesis y la migración de neuroblastos hacia el BO; sin embargo, los contrastes en relación a la ruta migratoria y al potencial de proliferación de la SVZ, sumado a las diferencias de citoarquitectura entre la SVZ humana y la SVZ de roedores puede derivar en diferencias importantes en los resultados que se obtienen en estos modelos. Por consiguiente, en relación a la neurogénesis y la migración de neuroblastos, se requieren modelos más próximos al modelo humano.

#### **1.4. Gliomas.**

El concepto de que la SVZ es una fuente continua de nuevas células a través de la vida adulta tiene profundas implicancias. Entre ellas, la hipótesis de que la SVZ puede ser un origen potencial de tumores cerebrales malignos (Quinones-Hinojosa y Chaichana, 2007). Los tumores cerebrales corresponden a un grupo diverso de tumores que afectan al cerebro. Derivan de componentes del cerebro, en el caso de los tumores cerebrales primarios o de células tumorales localizadas en otras regiones del organismo que se extendieron al cerebro a través del torrente sanguíneo, en el caso de los tumores cerebrales secundarios (metástasis). Entre los tumores cerebrales primarios, los gliomas corresponden a los más frecuentes en el sistema nervioso central, alcanzando el 77% de los casos. Se estima que hay 22.000 nuevos casos de tumores cerebrales primarios en los Estados Unidos y 13.000 muertes cada año (Gu y col., 2009). Los gliomas son clasificados histológicamente de acuerdo a su línea de diferenciación hipotética (astrocitos,

oligodendrocitos o células endimarias) y se agrupan dentro de cuatro grados clínicos de acuerdo a su malignidad. El grado IV, conocido como glioblastoma multiforme (GBM), es el grado más agresivo y también el más común en humanos. La tasa de incidencia ajustada por edad en promedio es de 3,19/100.000 habitantes cada año, siendo la tasa de incidencia más alta entre los tumores cerebrales y tumores del sistema nervioso central (Thakkar y col., 2014). El 80% de los GBMs surgen *de novo*, mientras que el porcentaje restante surge de la progresión de gliomas de menor grado (Grado II o III) (Kleihues y Ohgaki, 2000). Los GBMs están formados de una masa heterogénea de células gliales, incluyendo astrocitos y oligodendrocitos. Estos tumores son altamente resistentes a la radioterapia y a la quimioterapia. A pesar de las terapias disponibles en la actualidad, el tiempo promedio de supervivencia de los pacientes con esta enfermedad es de tan solo 15 meses (Koshy y col., 2012; Tran y Rosenthal, 2010). Entre las razones de la resistencia de los GBMs a la intervención terapéutica, está el complejo carácter de estos tumores. Como su nombre lo indica, estos tumores son ampliamente multiformes, mostrando regiones de hemorragia y de necrosis pseudo-empalizada, núcleos pleomórficos, proliferación microvascular y vasculatura glomeruloide (Holland, 2000). Además, muestran heterogeneidad genética, existiendo subclones dentro de la población de células tumorales. Las células de los GBMs presentan una fuerte tendencia a invadir el tejido cerebral, propagándose difusamente a largas distancias y en regiones del cerebro esenciales para la supervivencia del paciente. Como consecuencia, los pacientes mueren por la expansión del tumor dentro de regiones vitales del cerebro, aún cuando se hayan repetido las cirugías de resección para las recurrencias del tumor (Holland, 2000).

Recientemente, la Red de Investigación del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) catalogó las anomalías genómicas más recurrentes en GBMs, con el objetivo de

comprender de mejor manera la patogénesis de estos tumores e identificó cuatro subtipos de GBMs: clásico, mesenquimal, proneural y neural (Phillips y col., 2006; Verhaak y col., 2010). El GBM clásico se define por una amplificación aberrante del receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR), por un patrón de expresión astrocítico y por la pérdida del cromosoma 10 (Verhaak y col., 2010). El subtipo mesenquimal se define por mutaciones en la proteína relacionada a la neurofibromatosis 1 (NF1) y PTEN, por un patrón de expresión mesenquimal y por una menor amplificación de EGFR en comparación a otros subtipos de GBM (Verhaak y col., 2010). El subtipo proneural se caracteriza por la amplificación focal del receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRA), por mutaciones en TP53 e isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y por un patrón de expresión oligodendrocítico (Verhaak y col., 2010). Por último, el GBM neural, se define por un perfil de expresión de tejido cerebral normal, así como, la expresión de marcadores de astrocitos y de oligodendrocitos (Verhaak y col., 2010). Esta heterogeneidad en los perfiles de los GBMs explicaría las diferencias en la eficacia de los tratamientos entre pacientes y sugiere que no existirá una única terapia efectiva para todos los subtipos.

### **1.5. Relación entre la SVZ y los gliomas.**

Una de las implicancias más relevantes de que la neurogénesis continúe en adultos, es la presencia de células madres y células progenitoras indiferenciadas y mitóticamente activas dentro de regiones discretas, como la SVZ. Estas poblaciones de células pueden funcionar como fuente de células transformables, pudiendo originar células madres de tumores cerebrales (BTSCs). Se ha propuesto que los GBMs presentan BTSCs (Vescovi y col., 2006), lo que se apoya en la demostración de que una pequeña fracción de células en

los GBMs comparten muchas características en común con las NSCs y son capaces de iniciar nuevos tumores en modelos de xenoinjertos (Lee y col., 2006; Singh y col., 2004). Además, al aislar BTSCs desde GBMs, éstas son capaces de formar neurósferas, experimentando auto-renovación y diferenciación multipotencial hacia los fenotipos celulares presentes en el tumor del que derivan (Dirks, 2001; Ignatova y col., 2002). Por otro lado, las BTSCs son más resistentes a tratamientos genotóxicos que otros tipos celulares más diferenciados dentro de los tumores y por lo tanto, podrían ser responsables de la recurrencia de estos tumores después de los tratamientos (Vescovi y col., 2006). Las características en común entre las NSCs y las BTSCs incluyen: expresión de marcadores de células madres, alta movilidad, diversidad de progenie, robusto potencial de proliferación y asociación con vasos sanguíneos y con la sustancia blanca (Sanai y col., 2005). Además, ambas poblaciones de células son activadas por mitógenos exógenos, lo que sugirió la presencia de receptores de superficie celular y mecanismos intracelulares similares (Vescovi y col., 2006). Por consiguiente, se postula que las BTSCs derivan de NSCs anómalas, donde las BTSCs presentan las vías regulatorias de las NSCs; sin embargo, estas vías se presentan de forma aberrante, con respecto a tiempo, orden y magnitud.

En varios modelos animales de tumores cerebrales, inducidos química o viralmente, se relaciona la formación de los gliomas a la SVZ. La inoculación intraventricular del virus del sarcoma aviar en cerebros de caninos neonatos condujo a la formación inicial de un glioma en la SVZ (Vick y col., 1977). Después de 10 días post-inoculación, los tumores fueron encontrados en la sustancia blanca, lo que sugirió la migración de células transformadas desde la SVZ hacia el parénquima del cerebro (Vick y col., 1977). Asimismo, la exposición sistémica al carcinógeno N-etil-N-nitrosourea (ENU) permitió estudiar la formación de tumores en etapas tempranas, exponiendo ratas durante etapas

tardías de gestación a una dosis de ENU y observando que las lesiones hiperplásicas - que son detectadas semanas antes de la aparición de los tumores - casi siempre se presentan en la SVZ (Lantos y Cox, 1976). Un trabajo más reciente demuestra que la inactivación de p53 sumada a la inactivación de NF1 induce la formación de GBMs a partir de los astrocitos de la SVZ y que, frecuentemente, estos GBMs se mantienen contactando la SVZ e infiltran la corteza cerebral (Zhu y col., 2005). Estudios clínicos también respaldan la existencia de una relación entre los gliomas y la SVZ. En un análisis mediante MRI, se determinó que en 93 pacientes diagnosticados con un glioma de un total de 100, dicho glioma contactaba una región de la pared de los VLs como mínimo (Barami y col., 2009), confirmando que los gliomas se localizan con mayor frecuencia en directa relación con la SVZ. Por otro lado, se determinó que los pacientes que portan un glioma que contacta la SVZ, tienen un tiempo de supervivencia promedio significativamente menor que los pacientes que portan un glioma que no contacta los VLs (Chaichana y col., 2008; Young y col., 2011). Recientemente, se confirmaron estas observaciones, determinando que un 67% de los pacientes con un GBM que no contacta la SVZ se mantienen libres de recurrencias y con vida luego de 6 meses del tratamiento, mientras que este porcentaje fue significativamente menor en pacientes con un GBM que contacta la SVZ, solo un 39% (Jafri y col., 2013). Adicionalmente, se determinó que la supervivencia libre de progresión (PFS) a 6 meses después del tratamiento fue de solo un 47% entre pacientes con un GBM que contacta la SVZ, comparado con un 69% en pacientes con un GBM que no contacta la SVZ (Jafri y col., 2013). Por otro lado, se determinó que los GBMs que contactan la SVZ tuvieron una mayor probabilidad de ser multifocales al momento del diagnóstico inicial y de presentar recurrencias del tumor en regiones distantes de la lesión inicial; sin embargo, los GBMs que no contactan la SVZ no fueron multifocales al momento del diagnóstico y siempre recurrieron dentro de 2 cm del

margen de resección (Lim y col., 2007a). Más adelante, se identificaron las características moleculares de los GBMs que contactaban la SVZ, encontrando que sobre-expresan enzimas metabólicas, proteínas ribosomales y proteínas de shock térmico. Además, se encontró que los GBMs que contactan la SVZ expresan en gran cantidad marcadores representativos de las células de la SVZ (Haskins y col., 2013).

En resumen, los gliomas que se localizan cercanos a la pared de los VLs, contactando la SVZ, son más frecuentes y además, presentan un peor pronóstico. Pese a lo anterior, cuando se realizan y estudian modelos de xenoinjertos de gliomas en el cerebro, éstos se inducen frecuentemente en el cuerpo estriado y no en la SVZ, que correspondería a una región más adecuada por la frecuencia y malignidad en que en ésta se presentan los gliomas.

#### **1.6. Vitamina C, sus funciones e importancia en sistema nervioso central.**

Como se mencionó más arriba, se propone que las BTSCs surgen de la transformación maligna de las NSCs. Esta hipótesis se sustenta en que ambas poblaciones de células presentan varias características en común, entre las que se incluye que las NSCs y las BTSCs presentan receptores en su superficie celular y mecanismos intracelulares muy similares (Vescovi y col., 2006). De esta forma, las NSCs y las BTSCs responderían a las mismas moléculas o estímulos, es decir, la neurogénesis y la progresión de tumores en la SVZ serían moduladas por las mismas moléculas. En este contexto, se ha descrito que la vitamina C puede modular tanto la neurogénesis como la progresión tumoral. La vitamina C o también denominada, ácido ascórbico (AA), es una hexosa soluble en agua que posee dos protones disociables con valores de pKa de 4.2 y 11.8 (Rice, 2000). A pH fisiológico,

la vitamina C se encuentra predominantemente en su forma ionizada como anión monovalente, ascorbato. Su estructura de enediol le permite actuar como un donador de electrones, donde por la pérdida de dos electrones forma su producto final de oxidación, el ácido dehidroascórbico (DHA). Dada su propiedad donadora de electrones, la vitamina C es un importante antioxidante, actuando como un agente reductor y neutralizador de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, generadas de forma normal durante el metabolismo celular (Harrison y May, 2009). La vitamina C oxidada a DHA, puede ser posteriormente reducida y reciclada por glutatión o por reductasas de dehidroascorbato dependientes de glutatión (Maellaro y col., 1994). La vitamina C también actúa como un cofactor en varias reacciones enzimáticas, incluyendo aquellas involucradas en la síntesis de catecolaminas, carnitina, colesterol, aminoácidos (metabolismo de tirosina) y ciertas hormonas peptídicas (Harrison y May, 2009). Ahora bien, una de sus funciones más conocidas es facilitar la hidroxilación de residuos de prolina y lisina en el colágeno, permitiendo el plegamiento intracelular apropiado de pro-colágeno para la exportación y deposición como colágeno maduro, que fortalece los vasos sanguíneos, la piel, los músculos y huesos. La mayoría de las especies puede sintetizar vitamina C a partir de glucosa en el hígado; sin embargo, humanos, algunos primates y cobayos poseen un gen no funcional para la enzima L-gulonolactona oxidasa, fundamental para la síntesis de esta vitamina (Chatterjee y col., 1975). Por esta razón, estas especies requieren incorporar la vitamina C a partir de la dieta. La vitamina C obtenida desde los alimentos es incorporada a nivel intestinal mediante transporte activo y se distribuye en el cuerpo mediante el torrente sanguíneo (Bianchi y col., 1986). La falta de vitamina C produce escorbuto, patología que se caracteriza por debilidad muscular, sangramiento de encías, pérdida de dientes y problemas de cicatrización, lo que finalmente puede conducir a la muerte (Hirschmann y Raugi, 1999).

Durante el escorbuto, en el sistema nervioso central (SNC) la vitamina C es retenida ávidamente. Los cobayos que se encuentran cerca de la muerte por escorbuto tienen niveles indetectables de vitamina C en el hígado, mientras que el contenido en el cerebro continúa cerca del 25% del normal, reflejando su importancia para la función neuronal (Hughes y col., 1971). Las funciones de la vitamina C en el SNC y en el cerebro son numerosas. En relación a su función antioxidante, la vitamina C elimina eficientemente el superóxido producido por el rápido metabolismo mitocondrial neuronal (Hediger, 2002), y en la superficie de las membranas biológicas reduce el  $\alpha$ -tocoferol radical (Buettner, 1993). Por otro lado, la vitamina C es esencial para la síntesis de catecolaminas en el cerebro, sirviendo como un cofactor para la conversión de dopamina a noradrenalina por la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (Diliberto y Allen, 1981). Además, la vitamina C funciona como un neuromodulador en la neurotransmisión mediada por dopamina y glutamato, y que estaría involucrada en la amidación de neuropéptidos y su posterior liberación en el cerebro (Harrison y May, 2009). En relación a la función de la vitamina C en la síntesis de colágeno en el cerebro, existe poca información en comparación a otros órganos; sin embargo, mínimas cantidades parecen esenciales para la formación de vasos sanguíneos, según lo que se observó ratones *knock-out* para el transportador de vitamina C, SVCT2. Estos animales mueren poco después de nacer y al analizar sus cerebros, se determinó que poseen niveles indetectables de vitamina C y tienen hemorragia difusa. Interesantemente, los embriones no muestran hemorragias en otros tejidos y no tienen signos de escorbuto generalizado (Sotiriou y col., 2002).

Estudios recientes describen una nueva función relacionada a la vitamina C. Se reportó que vitamina C induce una demetilación específica en el ADN de un conjunto de genes en células madres embrionarias humanas, alterando la expresión de dichos genes

(Chung y col., 2010) y que vitamina C mejora la reprogramación de células somáticas de ratón y humanas hacia células madres pluripotentes inducidas (IPCs) (Esteban y col., 2010). Adicionalmente, se demostró que los efectos de vitamina C sobre el genoma son consecuencia de que vitamina C actúa como un cofactor en enzimas del tipo Fe(II) 2-oxoglutarato-dioxigenasas, modulando su actividad (Monfort y Wutz, 2013). Entre las enzimas dioxigenasas que actúan sobre el genoma y que son moduladas por vitamina C, se describen la demetilasa de histonas, Jhdmla/1b (Wang y col., 2011b), y la demetilasa de ADN, TET1 (Blaschke y col., 2013; Chen y col., 2013).

### **1.7. Vitamina C y sus transportadores.**

La vitamina C es incorporada a la células a través de transportadores. El transportador de vitamina C fue clonado en 1999 y se le denominó, transportador de vitamina C dependiente de sodio, abreviado como SVCT (Tsukaguchi y col., 1999). Se identificaron dos isoformas funcionales del transportador en rata, y también en humano (Daruwala y col., 1999). Las isoformas humanas poseen un 65% de identidad a nivel de secuencia aminoacídica, pero sus funciones difieren debido a su distribución divergente en los tejidos. Mientras SVCT1 se encuentra confinado a superficies epiteliales (Castro y col., 2008; Tsukaguchi y col., 1999) involucradas en transporte de grandes volúmenes, tales como el transporte en el intestino, riñón, hígado, y pulmón; SVCT2 está involucrado en la captación de vitamina C por tejidos específicos, expresándose en el cerebro, glándulas adrenales, glándula pituitaria, órganos linfoides, músculo y huesos (Tsukaguchi y col., 1999). De forma adicional a la captación por los SVCTs, la forma oxidada de la vitamina C, DHA, puede entrar y salir de las células por difusión facilitada a través de transportadores de

glucosa de la familia de los GLUTs. Una vez que DHA ha ingresado a las células, es rápidamente reducido a ascorbato y es retenido dentro de las células (Astuya y col., 2005; Nualart y col., 2003).

En relación a la entrada de vitamina C al SNC, el movimiento de esta vitamina a través de la barrera hematoencefálica parece la ruta más lógica; sin embargo, las células endoteliales de capilares del cerebro no expresan SVCT2 *in vivo* (Berger y col., 2003; Garcia y col., 2005). De esta forma, la ruta más importante por la que la vitamina C entra al SNC involucra el transporte desde el plasma hacia el LCR, a través del epitelio de los plexos coroideos (Angelow y col., 2003). La expresión del ARNm de SVCT2 se ha observado por hibridación *in situ* en el epitelio de los plexos coroideos y también, se ha descrito que SVCT2 se expresa en células de papiloma de plexos coroideo humano, donde media el transporte de vitamina C a través de la membrana basolateral hacia el interior de las células (Ulloa y col., 2013). A continuación, la vitamina C intracelular sale de las células hacia el LCR a través de la membrana apical; sin embargo, se desconoce como ocurre este proceso (Angelow y col., 2003). Este transporte transcelular genera un gradiente de vitamina C, donde la concentración del LCR es de 200 – 400  $\mu\text{M}$ , mientras que la concentración del plasma es de 60  $\mu\text{M}$  o menor en ratas (Spector, 1977). Desde el LCR, la vitamina C se equilibra con el del parénquima cerebral y luego, es transportado desde el líquido extracelular hacia las células, donde la concentración estimada en neuronas es de 10 mM y en la glía es de 1 mM (Rice, 2000).

Además de la expresión de SVCT2 en los plexos coroideos, las neuronas de la corteza cerebral, hipocampo, e hipotálamo expresan el ARNm para SVCT2 (Garcia y col., 2005; Mun y col., 2006; Nualart y col., 2012). Se demostró que SVCT2 se expresa y es funcional en cultivos de neuronas embrionarias corticales de ratón (Castro y col., 2001), y

que SVCT2 se expresa en neuronas embrionarias hipocampales, localizándose en los axones (Nualart y col., 2012). Por otro lado, se reportó la detección del ARNm y la de proteína SVCT2 en cerebro fetal de rata, localizándose principalmente en el área ventricular y subventricular donde se encuentran las células precursoras (glía radial) (Caprile y col., 2009; Nualart y col., 2012). Trabajos más recientes de nuestro grupo, demuestran altos niveles de expresión de SVCT2 en neuronas piramidales de la región interna de la corteza cerebral, entre los estadios post-natales P1 y P5 (Salazar y col., 2014), y por otro lado, demuestran la expresión de SVCT2 en la SVZ y en la RMS en cerebro de rata adulta, específicamente las células proliferativas BrdU-positivas (Pastor y col., 2013). Adicionalmente, se demostró la expresión de SVCT2 en neurósferas aisladas de la SVZ (Pastor y col., 2013). Con respecto a la expresión y funcionalidad de SVCT2 en células gliales, se demostró en microglía, células endoteliales y en tanicitos hipotalámicos (García y col., 2005). No se detectó la expresión de SVCT2 en astrocitos; sin embargo, se demostró que cuando el tejido cerebral es sometido a estrés, los astrocitos inducen la expresión de este transportador (Berger y col., 2003).

### **1.8. Vitamina C y su rol en neurogénesis.**

Los niveles de vitamina C en el cerebro fetal de rata se duplican en el último período de gestación, entre los estadios E15 y E20, y caen en un 18% luego del nacimiento. Dicho período de gestación (E14 a E20), coincide con el período en el que ocurre la neurogénesis embrionaria, sugiriendo que la vitamina C podría tener un rol importante durante este proceso (Kratzing y col., 1985). La primera evidencia que apoyó esta hipótesis, demostró que el tratamiento de células madres embrionarias con SHH, con el factor de

crecimiento de fibroblastos 8 (FGF8) y con vitamina C aumenta la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas (Lee y col., 2000). Asimismo, la eficiencia de la diferenciación dopaminérgica disminuye en precursores mesencefálicos subcultivados por largos períodos *in vitro*; sin embargo, el tratamiento con vitamina C es capaz de restablecer la diferenciación dopaminérgica, incrementando 10 veces el número de neuronas de este tipo (Yan y col., 2001). Ahora bien, el efecto de la vitamina C no solo estaría involucrado en la diferenciación neuronal, ya que el tratamiento *in vitro* de precursores corticales embrionarios con 200  $\mu\text{M}$  de vitamina C promueve la diferenciación hacia neuronas y astrocitos (Lee y col., 2003). Posteriormente, en neuronas hipocámpales aisladas de ratones *knock-out* para SVCT2 se demostró que concentraciones muy bajas de ascorbato intracelular (100  $\mu\text{M}$  o menos) son suficientes y necesarias para la maduración neuronal, lo que fue evidenciado por la formación de dendritas y el aumento en el número de potenciales postsinápticos excitatorios miniaturas (Qiu y col., 2007). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado por primera vez que la sobreexpresión de SVCT2, a través de la incorporación de vitamina C y la posterior fosforilación de MAP-ERK1/2, induce la aparición de un fenotipo diferenciado, caracterizado por el desarrollo de filopodias y procesos positivos para la proteína MAP-2 (Salazar y col., 2015). Ahora bien, el efecto diferenciador de la vitamina C no tiene relación con su capacidad antioxidante, ya que no es reproducido por antioxidantes como glutatión y vitamina E (Lee y col., 2003); por el contrario, este efecto estaría relacionado a cambios en la expresión génica, puesto que se demostró que el tratamiento *in vitro* de células madres embrionarias y de células precursoras mesencefálicas con vitamina C incrementa la expresión de genes involucrados en neurogénesis, diferenciación y neurotransmisión (Shin y col., 2004; Yu y col., 2004).

Más próximo al posible mecanismo de acción de vitamina C y en relación a la diferenciación hacia neuronas dopaminérgicas, recientemente se describió que la vitamina C aumenta la expresión de genes de fenotipo dopaminérgico al inducir la demetilación del ADN y de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27m3) en los promotores de estos genes y que la demetilación es mediada por las demetilinas Tet1 y Jmjd3, respectivamente (He y col., 2015).

Con respecto a la neurogénesis adulta, se demostró que el tratamiento *in vitro* de neuróferas aisladas desde la SVZ de rata con vitamina C aumenta la diferenciación de las células hacia un linaje neuronal (Pastor y col., 2013). Además, las células mitóticamente activas de la SVZ y de la RMS de ratón adulto expresan el transportador de vitamina C, SVCT2, lo que sugiere que la vitamina C puede estar involucrada en una función a lo largo de estas áreas neurogénicas (Pastor y col., 2013). Por otra parte, se demostró que la mantención de cobayos con una dieta deficiente en vitamina C provoca una disminución significativa en el número de neuronas de tres regiones diferentes del hipocampo, lo que es acompañado de una reducción en la memoria espacial de estos animales, demostrando que la vitamina C es fundamental para el correcto desarrollo y función neuronal (Tveden-Nyborg y col., 2009). Recientemente, también se demostró que la deficiencia prenatal de vitamina C en cobayos provoca un deterioro permanente en el desarrollo post-natal del hipocampo y que al suministrar una dieta rica en vitamina C luego del nacimiento no se revierte este deterioro (Tveden-Nyborg y col., 2012). Si bien, existen numerosos estudios demostrando que vitamina C tendría un efecto en diferenciación y neurogénesis, se desconoce el efecto que tiene esta molécula en el nicho neurogénico más extenso del cerebro adulto, la SVZ.

## 1.9. Vitamina C y su rol en tumores.

A mediados del siglo XX, se propuso por primera vez la utilización de vitamina C en la prevención y tratamiento del cáncer (Mc, 1959). Esta propuesta fue sostenida, más adelante, por Cameron y colaboradores, quienes mostraron que la administración de megadosis de vitamina C (10 g al día por vía intravenosa) a pacientes con cáncer terminal, aumentaba el tiempo de sobrevida promedio en más de 4 veces (Cameron y Pauling, 1976). Atribuyeron este resultado, a que altas dosis de vitamina C promovería la síntesis de colágeno, conduciendo a la encapsulación de los tumores. En adelante, se reportaron varios casos de pacientes tratados con megadosis de vitamina C por vía intravenosa donde se observó, incluso, una remisión completa de la enfermedad (Drisko y col., 2003; Padayatty y col., 2006). Sin embargo, estos trabajos han sido fuertemente cuestionados, ya que estudios clínicos posteriores demostraron que no hay diferencias significativas en relación al tiempo de sobrevivencia de pacientes con cáncer entre los grupos tratados con altas dosis de vitamina C (por vía oral) y placebo (Creagan y col., 1979; Moertel y col., 1985). Recientemente, se realizaron dos revisiones sistemáticas de estudios observacionales y aleatorios para evaluar los efectos antitumorales y la toxicidad del tratamiento con vitamina C. Las revisiones no encontraron evidencias consistentes de un efecto antitumoral, en términos de mejores tasas de respuesta o mejores resultados de supervivencia en pacientes (Jacobs y col., 2015; Wilson y col., 2014).

En paralelo a los estudios clínicos, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* se llevaron a cabo para dilucidar el rol de la vitamina C en el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Se reportó que la vitamina C incrementa la eficacia de varias drogas quimioterapéuticas (Chiang y col., 1994; Verrax y Calderon, 2008), y también la eficacia

de la radioterapia (Taper y col., 1996). Por otro lado, también se describió que a concentración milimolar, vitamina C tiene un profundo efecto inhibitorio en el crecimiento *in vitro* de células de neuroblastoma (Pavelic, 1985), osteosarcoma y retinoblastoma (Medina y col., 1994). Asimismo, se observó una inhibición de la proliferación en células de glioma (U-373) (Naidu y col., 1993), células de glioblastoma (T98G) y células de carcinoma renal (Makino y col., 1999). No obstante, numerosos estudios muestran lo contrario; por ejemplo, se determinó que la administración de DHA antes del tratamiento con drogas antitumorales como doxorubicina, cisplatina, vincristina, metotrexato o imatinib, conduce a una reducción substancial de la eficacia terapéutica de dichas drogas en ratones con tumores derivados de células de linfoma (RL) (Heaney y col., 2008). Además, se determinó que el tratamiento con DHA provoca una atenuación de la citotoxicidad y una reducción de la apoptosis, de forma dosis dependiente, indicando que DHA antagoniza los efectos citotóxicos de estas drogas antitumorales durante el tratamiento del cáncer (Heaney y col., 2008). Se describió algo similar en el caso de bortezomib, donde se observó una inactivación directa de la droga al tratar con vitamina C (Zou y col., 2006), y en el caso del trióxido de arsénico, el ligando TRAIL (Perez-Cruz y col., 2007) y vinblastina (Fukumura y col., 2012), donde se observó que vitamina C protege a las células tumorales expuestas a estas drogas. Trabajos más recientes, demuestran que un pre-tratamiento con vitamina C causa una atenuación de la citotoxicidad de tamoxifeno en forma dosis-dependiente en células de cáncer de mama humana (MCF7), protegiendo a las células de la peroxidación lipídica (Subramani y col., 2014). Por otro lado, se reportó que los efectos anti-tumorales de vitamina C han sido sobrestimados en estudios *in vitro* previos, puesto que los efectos citotóxicos de vitamina C en células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 son abolidos completamente al utilizar concentraciones fisiológicas de hierro en los medios de cultivo

(Mojic y col., 2014). En el mismo contexto, se describió que la combinación de radiación y altas concentraciones de vitamina C sensibilizan *in vitro* a las células de glioma murino GL261 a la radiación; sin embargo, en el mismo estudio también se demostró *in vivo* que la progresión tumoral fue más rápida en ratones portando un tumor tratado con radiación y una dosis diaria de vitamina C que en ratones que solo fueron tratados con radiación (Grasso y col., 2014). Por otro lado, se demostró que vitamina C antagoniza en forma efectiva la apoptosis inducida por radiación ultravioleta en células de carcinoma epidermoide A431 a través de la regulación de la actividad de la demetilasa Tet, la demetilación del ADN y la subsecuente activación de los genes supresores de tumores, p16 y p21 (Lin y col., 2014).

Los efectos observados del tratamiento de vitamina C, han sido relacionados a numerosos y diversos mecanismos de acción. Uno de estos mecanismos describe que un gran número de células, incluyendo células tumorales, no expresan el transportador de vitamina C, SVCT2, por lo que adquieren esta vitamina en su forma oxidada, DHA, a través de transportadores de glucosa (Agus y col., 1999; Nualart y col., 2003). En este mecanismo, denominado “efecto bystander”, células productoras de oxidantes, producen superóxido que oxida la vitamina C a DHA, posteriormente el DHA es transportado a través de GLUTs, y es reducido y retenido intracelularmente como vitamina C (Agus y col., 1999; Nualart y col., 2003). De esta forma, las células tumorales pueden acumular altos niveles de vitamina C intracelularmente, y a su vez, los altos niveles de este poderoso antioxidante pueden interferir con las terapias que inducen la muerte celular por un mecanismo oxidativo, como es el caso de la quimioterapia y la radiación (Agus y col., 1999; Nualart y col., 2003). Sin embargo, también se ha descrito que la vitamina C a altas concentraciones puede actuar como un agente pro-oxidante, generando especies reactivas

del oxígeno y puede transformar tumores resistentes a la radiación en sensibles a ésta (Du y col., 2015). En este sentido, se demostró que vitamina C a concentraciones farmacológicas aumenta los efectos citotóxicos de la radiación ionizante *in vitro* y la combinación de vitamina C a concentraciones farmacológicas con radiación ionizante reduce el crecimiento tumoral y aumenta la supervivencia de ratones con un xenotransplante de tumor pancreático (Du y col., 2015). Además, un régimen diario de vitamina C a concentraciones farmacológicas reduce significativamente la tasas de crecimiento de tumores de ovario, pancreáticos y de glioblastomas, por un incremento del radical ascorbato y por producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chen y col., 2008). Por otro lado y en relación a la capacidad energética de las células, recientemente se describió que la vitamina C a concentraciones milimolares actúa como un pro-oxidante, induce daño al ADN y depleta el ATP intracelular (Tian y col., 2014), y que activa la vía de señalización ATM/AMPK, lo que resulta en la inhibición de mTOR y la muerte de células tumorales (cáncer de ovario) (Ma y col., 2014). Por otro lado, en células humanas de cáncer de mama (MCF7) y en células humanas de cáncer de colon (HT29), vitamina C a concentraciones farmacológicas induce la muerte de las células cancerígenas al alterar los perfiles metabólicos de éstas, reduciendo los niveles de ATP y depletando NAD (Uetaki y col., 2015). En el mismo sentido, se describió que a través de GLUT1 se incrementa la captación de DHA en células de cáncer colorrectal humano portando mutaciones de KRAS o BRAF. La acumulación de DHA depleta el glutatión e induce una acumulación de ROS, lo que a su vez inhibe la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), conduciendo a una crisis energética y a la muerte celular (Yun y col., 2015). Recientemente, nuestro grupo ha descrito que la oxidación de vitamina C a DHA durante el transcurso de ciertas patologías en el cerebro tiene importantes consecuencias metabólicas, ya que el DHA intracelular reduce de manera transiente las

concentraciones de glutatión reducido, incrementando la actividad de la vía de las pentosas fosfato y reduciendo la glicólisis (Cisternas y col., 2014). Otro mecanismo propuesto para la acción de la vitamina C se relaciona con la expresión del factor 1a inducido por hipoxia (HIF-1a). Las células tumorales expuestas a bajos niveles de oxígeno responden estabilizando HIF-1a. HIF-1a actúa induciendo la transcripción de varios ARNs mensajeros que son esenciales para el crecimiento tumoral, incluyendo enzimas glicolíticas y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Knowles y col., 2003). Vitamina C es un cofactor en la hidroxilación y subsecuente degradación proteosomal de HIF-1a. De esta forma, la suplementación con vitamina C induciría la degradación de HIF-1a, inhibiendo la expresión de varios blancos transcripcionales protumorales y reduciendo el crecimiento tumoral (Knowles y col., 2003).

La mayoría de los estudios en relación a vitamina C y cáncer se han enfocado en los efectos de las altas dosis de vitamina C en el desarrollo y la progresión tumoral; sin embargo, en pocos trabajos se ha estudiado la deficiencia en vitamina C. Como cofactor en la síntesis de colágeno, la vitamina C es esencial para la angiogénesis y para la reparación de vasos sanguíneos. En este sentido, se demostró que la depleción en vitamina C restringe significativamente el crecimiento de carcinomas de pulmón implantados en ratones Gulo<sup>-/-</sup> (ratones incapaces de sintetizar vitamina C) (Telang y col., 2007). El análisis histopatológico de estos tumores reveló la presencia de vasos sanguíneos pobremente formados y una expresión reducida de colágeno y del factor de von Willebrand. De esta manera, se confirmó que la vitamina C juega un rol esencial en la angiogénesis y crecimiento tumoral (Telang y col., 2007).

En síntesis, hasta el día de hoy los estudios en relación al efecto que ejerce vitamina C en la progresión tumoral y en el tratamiento de pacientes con cáncer son controversiales.

Además, existe muy poca información en relación al efecto que ejerce vitamina C en la progresión de tumores cerebrales como los gliomas. Más aún, no existen estudios del efecto de vitamina C en gliomas localizados en la SVZ, región en la cual son más frecuentes y malignos.



## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La región neurogénica con mayor cantidad de células madres neurales en el cerebro de mamíferos adultos corresponde a la SVZ. La citoarquitectura de la SVZ ha sido descrita en varias especies. En humanos la cito-arquitectura de la SVZ difiere significativamente de la descrita en ratón; sin embargo, los componentes celulares son los mismos. En ratón los neuroblastos generados en la SVZ migran al BO a través de la RMS, mientras que en el humano el destino de los neuroblastos aún no es definido. Por un lado, se sostiene que los neuroblastos no migran al BO humano, y por otro, se describe la existencia de una EVL que alcanza el BO y que es rodeada por neuroblastos en migración. Estos resultados demuestran que el modelo del ratón difiere significativamente del modelo humano, por lo que es necesario contar con un modelo más próximo al humano para el estudio del nicho neurogénico.

Retomando la SVZ, la constante proliferación de células madres en esta región, ha llevado a plantear la hipótesis de que a partir de la SVZ podrían originarse los gliomas. Los gliomas son tumores cerebrales muy agresivos. Los pacientes diagnosticados con este tipo de tumor no sobreviven más de un año, aún sometiéndose a todas las terapias disponibles. Los gliomas contactan la SVZ con alta frecuencia y además, los pacientes que portan un glioma que contacta la SVZ presentan un peor pronóstico. Pese a esto, los modelos de gliomas en el cerebro no son inducidos en la SVZ, que correspondería a una región más idónea.

Se ha planteado que tanto la neurogénesis como la progresión tumoral, incluyendo la progresión de gliomas, podrían ser moduladas por las mismas vías y moléculas, entre las que se encuentra, la vitamina C. En relación a la neurogénesis, la vitamina C potencia la

diferenciación de precursores cerebrales embrionarios hacia neuronas y astrocitos, e incrementa la expresión de genes involucrados en neurogénesis, maduración y neurotransmisión. Por otro lado, una dieta deficiente en vitamina C provoca una disminución significativa en el número de neuronas del hipocampo. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce cual es el efecto de vitamina C en la neurogénesis adulta que ocurre en la SVZ. En cuanto al efecto de vitamina C en la progresión tumoral los resultados son controversiales. Se describió que megadosis de vitamina C aumentan la sobrevivencia de pacientes con cáncer terminal y por el contrario, también se demostró que vitamina C puede antagonizar los efectos citotóxicos de drogas terapéuticas usadas en el tratamiento del cáncer. Aún cuando los estudios con respecto al efecto de vitamina C en la progresión tumoral son numerosos, no se ha logrado alcanzar un consenso y por otro lado, se desconoce el efecto que ejerce vitamina C sobre la progresión de gliomas localizados en la SVZ.

En esta tesis caracterizaremos, mediante un análisis inmunohistoquímico y ultraestructural, la organización del nicho neurogénico del cerebro de cobayo adulto, incluyendo la estructura de la SVZ y de una extensión del ventrículo lateral, similar a la descrita en el cerebro humano. Utilizaremos el modelo animal del cobayo, ya que esta especie no sintetiza vitamina C y debe adquirirla a partir de la dieta, de igual forma que la adquiere el humano. Posteriormente, analizaremos el efecto que ejerce la deficiencia en vitamina C en la neurogénesis de la SVZ, e induciremos y analizaremos gliomas subventriculares en cerebro de cobayo, para finalmente determinar el efecto que ejerce la deficiencia en vitamina C en la progresión de estos gliomas.

### **III. HIPOTESIS**

- 1.- “La estructura de la zona subventricular del cerebro de cobayo adulto es similar a la descrita en el cerebro humano”
- 2.- “La deficiencia de vitamina C reduce la neurogénesis y la progresión tumoral en la zona subventricular”.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la estructura del nicho neurogénico en la zona subventricular del cobayo adulto y el efecto de la deficiencia de vitamina C en la neurogénesis y en la progresión tumoral que ocurren en esta región.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- 1.- Estudiar la estructura del nicho neurogénico en la zona subventricular del cerebro de cobayo.
- 2.- Analizar el efecto de la deficiencia de vitamina C sobre la neurogénesis en la zona subventricular.
- 3.- Generar y caracterizar un glioma localizado en la zona subventricular del cerebro de cobayo.
- 4.- Estudiar el efecto de la deficiencia de vitamina C sobre la progresión tumoral en la zona subventricular.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Animales de experimentación.

En esta tesis se utilizaron cobayos Pirbrigh macho de 1, 6 y 12 meses de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25° C, fotoperíodo 12/12 h luz/oscuridad, recibieron acceso libre al agua y fueron alimentados diariamente. Los cobayos con un tratamiento control se mantuvieron bajo alimentación con pellet de conejo y vegetales, mientras que los cobayos con un tratamiento escorbútrico, se alimentaron con pellet de conejo y sin vegetales durante 2 o 3 semanas. Todos los animales de experimentación se manejaron de acuerdo a las normas de bioética del *National Institutes of Health, Bethesda, MD* y por el manual de Bioseguridad de CONICYT. Estas normas fueron presentadas con el proyecto Fondecyt 1140477.

### 4.2. Cultivos celulares.

Los cultivos celulares fueron realizados en una incubadora a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 5 % v/v a -80° C o en nitrógeno líquido.

#### 4.2.1. Cultivos de la línea celular U87 – MG.

Las células U87 – MG corresponden a células de un glioblastoma multiforme humano aisladas desde un paciente de 44 años de edad. Las células de la línea U87 – MG fueron cultivadas en placas petri de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio de cultivo DMEM Hg, suplementado con 10 % v/v de suero bovino fetal (Gibco BRL), L-glutamina 2

mM (Gibco BRL), Penicilina/Streptomycin al 1 % (Gibco BRL) y fungizona 2,5 µg/mL (Gibco BRL) con cambios de medio cada 2 días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 80 % de confluencia aproximadamente, fueron expandidas en una proporción de 1:5. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

#### **4.2.2. Cultivo de las células C3.**

La línea de células C3 fue establecida en nuestro laboratorio a partir de un tumor subventricular obtenido quirúrgicamente desde el ventrículo lateral de un paciente masculino de 16 años de edad. Las células C3 fueron cultivadas en placas petri de 10 cm de diámetro (Falcon) con 10 mL de medio de cultivo DMEM/F12 (Gibco BRL) suplementado con suero bovino fetal 10 % (Gibco BRL), L-glutamina 2 mM (Gibco BRL), Penicilina/Streptomycin al 1 % (Gibco BRL) y fungizona 2,5 µg/mL (Gibco BRL) con cambios de medio cada 2 días. Cuando las células en cultivo alcanzaron un 90 % de confluencia aproximadamente, fueron expandidas en una proporción de 1:5. Los cultivos fueron mantenidos a 37° C, 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

#### **4.3. Marcaje con BrdU *in vivo*.**

Para los análisis de proliferación en nicho neurogénico, cobayos de 1 mes de edad recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de 4-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma, Saint Louis, Missouri, EE.UU.) (50 mg/Kg de peso del animal – por inyección) a intervalos de 2 h. Los animales fueron sacrificados al transcurrir 24 h desde la primera inyección. Para los análisis de migración de neuroblastos, cobayos de 1 mes de edad recibieron 5 inyecciones intraperitoneales de BrdU (50 mg/Kg de peso del animal – por inyección) a intervalos de 2 h. A continuación, los animales fueron sacrificados luego de 1, 5 o 10 días desde la primera

inyección. Para los análisis de proliferación del nicho neurogénico de animales viejos y de animales deficientes en vitamina C, cobayos de 1, 6 o 12 meses de edad recibieron una inyección intraperitoneal de BrdU (100 mg/Kg de peso del animal) 4 h antes del sacrificio de los animales. Finalmente, para los análisis de proliferación de los tumores subventriculares, los cobayos recibieron una inyección intraperitoneal de BrdU (100 mg/Kg de peso del animal) 24 h antes del sacrificio de los animales.

#### **4.4. Procesamiento histológico.**

##### **4.4.1. Fijación.**

Para el desarrollo de esta tesis se utilizaron muestras de tejido cerebral de cobayos adultos. Dichas muestras fueron fijadas por inmersión o por perfusión vascular con solución Bouin (750 mL de ácido pícrico saturado, 250 mL de formaldehído al 37 % y 50 mL de ácido acético glacial); con para-formaldehído (PFA) al 4 % p/v en tampón fosfato 0,1 M pH 7.4 para microscopía óptica; o con PFA al 2 % p/v y glutaraldehído al 2,5 % v/v en tampón fosfato 0,1 M para microscopía electrónica.

##### **4.4.1.1. Fijación por inmersión.**

Los cobayos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (60 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y acepromacina maleato (10 mg/kg) y posteriormente fueron sacrificados por decapitación para extraer sus cerebros. Cada cerebro fue mantenido en solución Bouin o PFA al 4 % p/v por 15 min. Transcurrido el tiempo, los cerebros fueron cortados en secciones frontales o sagitales de alrededor de 2 mm para facilitar la penetración del fijador, en el cual se mantuvieron por 24 a 48 h.

#### **4.4.1.2. Fijación por perfusión vascular.**

Los cobayos fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (60 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y acepromacina maleato (10 mg/kg), y luego fueron perfundidos transcárdialmente (punción con catéter en ventrículo cardíaco izquierdo, apertura de aurícula derecha y ligación aórtica) con suero fisiológico (NaCl al 0,9 % p/v) por 10 min. A continuación, los animales fueron perfundidos con solución Bouin, con PFA al 4 % p/v por 30 min para microscopía óptica, o con la mezcla de fijadores glutaraldehído al 2,5 % v/v y PFA al 2 % p/v en tampón fosfato 0,1 M por 30 min para microscopía electrónica. Posteriormente, los cerebros fueron extraídos del cráneo parcialmente y post-fijados en inmersión durante la noche a 4° C en el mismo fijador utilizado para perfundir.

#### **4.4.2. Inclusión.**

##### **4.4.2.1. Inclusión para microscopía óptica.**

Los tejidos fijados en Bouin fueron lavados en etanol 70° v/v, deshidratados en una batería de etanol a concentraciones crecientes y luego se pasaron por 3 baños de Histo-Clear®. En la última etapa de la inclusión, los tejidos se pasaron por 4 baños de parafina mantenida a 60° C en una estufa termorregulada, para finalizar con la confección de los bloques de parafina. A partir de los bloques de parafina se obtuvieron los cortes seriados de 7 µm de grosor utilizando un micrótopo (Leica Reichert-Jung 2040 Autocut Microtome) y luego, los cortes fueron montados en portaobjetos previamente tratados poli-L-lisina al 0,02 %. Los tejidos fijados en PFA al 4 % p/v fueron trasferidos a una solución de sacarosa al 30 % p/v por 72 h a 4° C, para criopreservar la muestra. Transcurrido el tiempo, los tejidos fueron embebidos en solución criopreservadora NEG50 (Thermo-Scientific), congelados

utilizando CO<sub>2</sub>, y mantenidos a -80° C hasta el momento de realizar los cortes. Finalmente, se obtuvieron cortes seriados de 50 µm de grosor utilizando un criostato (MICROM HM520, Walldorf, Alemania).

#### **4.4.2.2. Inclusión para microscopía electrónica.**

Una vez finalizada la post-fijación en glutaraldehído al 2,5 % v/v /PFA al 2 % p/v en tampón fosfato 0,1 M, los cerebros fueron extraídos por completo del cráneo, lavados 5 veces por 10 min en tampón fosfato 0,1 M a 4° C y cortados en secciones frontales de 100 a 150 µm en un vibrátomo (Leica VT 1000 S). Para la inclusión, los cortes fueron lavados en tampón fosfato 0,1 M dos veces por 10 min y luego fueron transferidos a tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 2 % en tampón fosfato 0,1 M por 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron lavados en agua destilada 3 veces por 5 min, deshidratados sucesivamente en etanol 25°, 50° y 70° tres veces por 5 min e incubadas en acetato de uranilo al 2 % p/v en etanol 70° por 3 h a 4°C y en oscuridad. En forma paralela se preparó la resina Araldita 502 (Electron Microscopy Sciences), mezclando 10.8 g de araldita, 9.2 g de anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) y 0.4 g del acelerador DMP-30, esta mezcla fue agitada vigorosamente y fue puesta en una cámara de vacío para remover las burbujas. Posteriormente, las muestras fueron lavadas en etanol 70° por 5 min a 4° C y en etanol 95°, y 100° tres veces por 10 min a 4° C y luego fueron lavadas en óxido de propileno 2 veces por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se transfirieron a araldita y se mantuvieron en agitación toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente las muestras se llevaron a un molde de aluminio y se cubrieron con araldita fresca dejando polimerizar por 3 días a 60° C. Posteriormente se procedió a realizar los cortes de 60 nm en el ultramicrotomo, UltraCutE (Reichert- Jung. Germany) con cuchilla de

diamante, a una velocidad de 1.0 mm/s y se recogieron sobre grillas de cobre de 200 mesh para su observación en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol Jem-1400).

#### **4.5. Ensayos de Inmunolocalización.**

##### **4.5.1. Inmunohistoquímica.**

Los cortes de 7  $\mu\text{m}$ , montados en portaobjetos con poli-L-lisina, fueron desparafinados por inmersión en tres baños sucesivos de Histo-Clear® y en una batería de etanol a concentraciones decrecientes por 5 min cada una. Posteriormente, los cortes fueron incubados en  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % en metanol por 15 min, para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas. Los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (Tris 10 mM, NaCl 120 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,4 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,5 mM, pH 7,8), y luego incubados con los anticuerpos primarios (Tabla 1) preparados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y albúmina sérica de bovino al 1 % p/v (Tris-BSA). La incubación fue realizada en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (Tabla 2), preparados en Tris-BSA por 2 h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y luego la actividad enzimática de la peroxidasa fue revelada utilizando una solución de diaminobenzidina 0,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,03 % v/v en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) por 15 min en oscuridad. La reacción fue detenida con lavados en agua destilada. A continuación, los cortes fueron sometidos a una tinción de contraste nuclear con hematoxilina de Harris y finalmente, fueron

deshidratados en una batería de etanol a concentraciones crecientes y en cuatro baños sucesivos de Histo-Clear®, para luego ser cubiertos con cubreobjetos utilizando el medio de inclusión Histo-Mount®.

#### **4.5.2. Inmunofluorescencia.**

Se utilizaron cortes de tejido incluidos en parafina y cortes de tejido obtenidos por microtomía de congelación. Los cortes fueron lavados en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) 3 veces por 10 min e incubados con los anticuerpos primarios (Tabla 1) preparados en Tris-BSA-Tritón X-100 0,2 % v/v, por 16 h en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. Transcurrida la incubación, los cortes fueron lavados nuevamente 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) e incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos (Tabla 2) por 2 h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7,8) y montados en medio de montaje para fluorescencia (Dako, Carpintería, CA, EE.UU.). Como tinción nuclear se utilizó ToPro-3 (Invitrogen) o Hoechst 33258, los que fueron incubados junto a los anticuerpos secundarios.

#### **4.5.3. Inmunoultraestructural.**

Cobayos anestesiados con la mezcla de anestésicos descrita más arriba, fueron perfundidos con glutaraldehído al 0,5 % v/v / PFA al 4 % p/v en tampón fosfato 0,1 M. Finalizada la perfusión, los cerebros fueron extraídos y post-fijados en PFA al 4 % p/v durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, los cerebros fueron lavados 5 veces por 10 min en tampón fosfato 0,1 M a 4° C y cortados en secciones frontales de 30 a 50 µm en un vibrátomo (Leica VT 1000 S). Luego los cortes fueron lavados en tampón fosfato 0,1 M tres veces por 5 min,

fueron incubados en borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) al 1 % en  $\text{H}_2\text{O}$  durante 30 min y lavados nuevamente en tampón fosfato 0,1 M seis veces por 10 min (hasta eliminar las burbujas). A continuación, los cortes fueron crio-protectados con sacarosa al 25 % p/v en tampón fosfato 0,1 M por 30 min en agitación y luego, se realizó una permeabilización, repitiendo 4 ciclos de congelamiento y descongelamiento, al sumergir las muestras en metilbutano a  $-60^\circ\text{C}$  y luego en sacarosa al 25 % p/v. Posterior a la permeabilización, los cortes fueron lavados 3 veces por 5 min en tampón fosfato 0,1 M e incubados en albumina de suero bovino (BSA) al 0,3 % p/v en tampón fosfato 0,1 M durante 1 h. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario, preparado en BSA al 0,3 % p/v en tampón fosfato 0,1 M, durante 48 h en agitación. Transcurrido el tiempo, se lavó en tampón fosfato 0,1 M tres veces por 10 min; se bloqueó nuevamente, incubando las muestras en BSA al 0,5 % p/v en tampón fosfato 0,1 M durante 1 h y se incubó el anticuerpo secundario con oro coloidal (dilución 1:50) en BSA al 0,5 % p/v en tampón fosfato 0,1 M por 24 h a temperatura ambiente y en agitación. Finalizada la incubación, se lavó en tampón fosfato 0,1 M tres veces por 10 min y luego, en acetato sódico al 2 % en  $\text{H}_2\text{O}$  tres veces por 15 min. Posteriormente, se realizó la intensificación con plata, sumergiendo las muestras en volúmenes iguales de los reactivos *developer* y *enhancer* por 30 min y se lavó nuevamente en acetato sódico al 2 % tres veces por 5 min. A continuación, se realizó el *gold-toning*, incubando en cloruro de oro al 0,05 % en  $\text{H}_2\text{O}$  por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  y luego, lavando en tiosulfato de sodio al 0,3 % en  $\text{H}_2\text{O}$  dos veces por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Enseguida se lavó en tampón fosfato 0,1 M tres veces por 10 min, se fijó con glutaraldehído al 2 % v/v en tampón fosfato 0,1 M por 30 min y se lavó nuevamente en tampón fosfato 0,1 M cinco veces por 5 min. Posteriormente, se incubó en Osmio al 1 % v/v / glucosa al 7 % p/v en tampón fosfato 0,1 M por 30 min y finalmente, se continuó la inclusión, como una

inclusión convencional para microscopía electrónica de transmisión, como se describió más arriba.

#### **4.5.4. Inmunocitoquímica.**

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con poli-L-lisina 0.2 mg/mL (Sigma) en placas de 24 pocillos. Las células en los vidrios fueron lavadas en PBS (pH 7,4) y fijadas en PFA al 4 % p/v por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8), permeabilizadas con tritón X-100 0.2 % v/v (Sigma) por 10 min e incubadas con los anticuerpos primarios preparados en Tris-BSA por 16 h en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) e incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos preparados en Tris-BSA por 2 h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces por 10 min en tampón Tris-fosfato 10 mM (pH 7.8) y montadas en 10  $\mu$ L de medio de montaje para fluorescencia (DAKO). Como tinción nuclear se utilizó ToPro-3.

#### **4.5.5. Estudios de co-localización.**

Los análisis de dobles, triples y cuádruples marcajes fueron realizados utilizando dos, tres o cuatro anticuerpos primarios generados en especies animales distintas de modo que no exista reacción cruzada (Tabla 1). Los anticuerpos secundarios utilizados tienen unidos distintos fluoróforos, para observar la inmunoreactividad mediante el uso de diferentes láseres. Los anticuerpos se incubaron en la misma solución (Tris-BSA) y fueron lavados según el protocolo descrito anteriormente, en el punto 4.5.3.

**Tabla 1: Anticuerpos primarios.**

<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>
Anti-Tubulina $\beta$ III	Ratón	1:1000	Promega
Anti-GFAP	Conejo	1:500	Dako
Anti-Vimentina	Ratón	1:200	Dako
Anti-SVCT2 G19	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2 T19	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2 A16	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2 H70	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology
Anti-SVCT2	Conejo	1:100	Abcam
Anti-PCNA	Ratón	1:400	Dako
Anti-BrdU	Ratón	1:500	Roche
Anti-GLUT1	Conejo	1:100	Alpha-diagnostic
Anti-nestina	Ratón	1:50	BD Biosciences
IL-B4-FITC	-	1:10	Sigma

**Tabla 2: Anticuerpos secundarios.**

<b>Nombre</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Empresa</b>
Anti-ratón-HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-conejo-HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-cabra-HRP	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-ratón-Cy2	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-ratón-Dylight 549	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-ratón-Cy5	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-conejo-Cy2	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-conejo-Dylight 549	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-conejo-Cy5	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-cabra-Alexa 488	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-cabra-Cy3	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-cabra-Cy5	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-pollo-Cy2	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-pollo-Cy3	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch
Anti-pollo-Cy5	Burro	1:200	Jackson Immunoresearch

#### **4.6. Microscopia.**

Las imágenes en campo claro fueron obtenidas en un microscopio Axioplan 2 (Zeiss). Las imágenes en fluorescencia fueron obtenidas en un microscopio confocal espectral LSM 780 LNO (Zeiss), el cual posee 7 líneas de láser y permite detectar hasta 5 marcajes en una misma muestra. Por otra parte, también fueron obtenidas imágenes de superresolución en un microscopio de superresolución ELYRA S.1 (Zeiss), el cual permite obtener imágenes de más de 2 veces la resolución de un microscopio confocal convencional. Finalmente, para la realización de proyecciones en tres dimensiones (3D) y *rendering* de imágenes de fluorescencia se utilizó el programa de procesamiento de imágenes, Imaris (Bitplane v7.3).

#### **4.7. Inyección intracerebroventricular de peroxidasa.**

Los cobayos fueron anestesiados profundamente con una mezcla de ketamina (60 mg/kg), xilazina (10 mg/kg) y maleato de acepromazina (10 mg/kg) y enseguida fueron ajustados en un marco estereotáxico. A continuación, se infundieron, a un flujo de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 45  $\mu\text{L}$  de peroxidasa de rábano picante (HRP; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) al 3 % en PBS estéril en la cavidad del ventrículo lateral del cerebro de cobayos adultos (coordenada estereotáxica: 0 mm anteroposterior al bregma; 2,2 mm lateral a la línea media; 4 mm ventral al bregma). Luego de 20 o 60 min de la inyección de peroxidasa, los cobayos fueron perfundidos con PFA al 1 % / glutaraldehído al 1 % en tampón fosfato 0,1 M. Finalizada la perfusión, los cerebros fueron extraídos del cráneo y post-fijados en la misma mezcla fijadora durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, el tejido cerebral fue cortado en cortes frontales de 90  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un

vibrátomo (Leica VT 1000S) y enseguida, los cortes fueron lavados en tampón fosfato 0,1 M y la actividad peroxidasa fue revelada utilizando diaminobencidina al 0,1 % / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03 % en tampón fosfato 0,1 M. Finalmente, los cortes fueron montados para microscopía óptica o fueron procesados para microscopía electrónica de transmisión.

#### **4.8. Captura por microdissección láser.**

Regiones específicas de tejido fueron aisladas por microdissección láser. Para realizar este procedimiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron sus cerebros. Luego, se obtuvo una rebanada de la región de interés de alrededor de 2 mm de grosor y fue fijada por inmersión en el fijador Methacarn (Cloroformo 10 %, Acido Acético 30 % y Metanol 60 %) por 3 h. Transcurrido el tiempo, la muestra fue cortada en un vibrátomo (Leica VT 1000 S) a 60 µm de grosor en PBS frío. Luego, los cortes fueron montados en membranas PEN (polietileno naftalato), fueron secados al aire y teñidos con azul de toluidina. Las áreas de interés (SVZ, LVE o corteza) fueron obtenidas mediante un microscopio de microdissección láser LMD7000 (Leica) y fueron recolectas y almacenadas en RNA later (Ambion) para la posterior extracción de ARNs mensajeros. El microscopio de microdissección láser utiliza un láser UV sólido, la frecuencia y energía del láser pueden ser ajustadas para muestras gruesas, finas, duras y blandas, también se puede ajustar la apertura del láser para producir una línea de corte más o menos fina. La colección del espécimen se realiza por gravedad evitando la contaminación de la muestra.

## **4.9. RT-PCR convencional y RT-PCR en tiempo real.**

### **4.9.1. Extracción de ARN.**

#### **4.9.1.1. Extracción de ARN total.**

La extracción de ARN total fue realizada mediante el uso de Trizol (Invitrogen) a partir de trozos pequeños de cerebro de cobayo. Las muestras fueron homogenizadas e incubadas en 1 mL de Trizol por 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 s y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g por 15 min a 4° C y se recuperó la fase acuosa conteniendo el ARN. Posteriormente, se agregó 500  $\mu$ L de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g por 10 min a 4° C. El sobrenadante fue eliminado y el *pellet* fue lavado dos veces con 1000  $\mu$ L de etanol 70 % v/v y centrifugado a 10.000 g por 10 min a 4° C. El *pellet* fue resuspendido en 30  $\mu$ L de agua libre de ARNasa y finalmente, la cuantificación y la pureza del ARN fueron estimadas midiendo absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro SmartSpec 300 (Bio-Rad).

#### **4.9.1.2. Extracción de ARN por columna.**

La extracción de ARN por columna se realizó utilizando el RNAqueous®-Micro Total RNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE.UU.). El tejido capturado por microdissección láser, fue tratado con 100  $\mu$ L de solución de lisis por 30 min a 42° C. Transcurrido el tiempo, el lisado fue agitado en un vórtex y fue centrifugado para mezclar y colectar. Posteriormente, se adicionó 3  $\mu$ L de aditivo LCM (laser capture

microdissection) al lisado, y se agitó y centrifugó nuevamente. Se agregaron 129  $\mu\text{L}$  de etanol 100° y se mezcló utilizando una pipeta. A continuación, lisado fue cargado en un microfiltro (previamente humedecido con 30  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y centrifugado a máxima velocidad) y fue centrifugado a 10.000 x g por 1 min para capturar el ARN en el filtro. Se agregó 180  $\mu\text{L}$  de solución de lavado 1 al filtro, se cerró la tapa y se centrifugó a 10.000 x g por 1 min. Luego, se agregó 180  $\mu\text{L}$  de solución de lavado 2/3 al filtro, se cerró la tapa y se centrifugó a 13.000 x g por 30 s. Nuevamente, se agregó 180  $\mu\text{L}$  de solución de lavado 2/3 al filtro, se cerró la tapa y se centrifugó a 13.000 x g por 30 s. Posteriormente, se removió el filtro del tubo de colección, se eliminó el contenido, se reubicó el filtro nuevamente y se centrifugó a 13.000 x g por 1 min para remover el fluido residual y secar el filtro. A continuación, el microfiltro fue transferido a un nuevo tubo de micro-elusión y se agregó 8  $\mu\text{L}$  de solución de elusión, precalentada a 95° C, al centro del filtro. Se dejó a temperatura ambiente por 5 min y luego se centrifugó a 13.000 x g por 1 min para eluir el ARN del filtro. Por segunda vez, se agregó 8  $\mu\text{L}$  de solución de elusión, se dejó a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugó a 13.000 x g por 1 min.

#### **4.9.2. Transcripción reversa del ARN total (RT).**

La síntesis de ADN-copia (ADNc) fue realizada utilizando el *RevertAid<sup>®</sup> H Minus First Strand cADN Synthesis Kit* (Fermentas International Inc.). Las muestras de ARN total (2  $\mu\text{g}$  cada una) fueron tratadas con ADNasa I (Fermentas International Inc.) en tampón ADNasa I (Fermentas International Inc.) por 30 min a 37° C. La reacción se detuvo al incubarse con EDTA 2,5 mM por 10 min a 65° C. A continuación, la muestra fue incubada con 0,5  $\mu\text{g}$  de oligo-dT por 5 min a 70° C y luego fue llevada a hielo por 2 min.

Posteriormente, se agregó el tampón de transcripción pH 8.3 (Tris-HCl 50 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, DTT 10 mM), la mezcla de dNTPs (1 mM de cada uno) y 20 U del inhibidor de ARNasa y se incubó por 5 min a 37°C. Finalmente, se agregaron 200 U de la enzima transcriptasa reversa RevertAid H Minus M-MuLV (Fermentas International Inc.) y se incubó por 1 h a 42° C. Al finalizar la reacción, la muestra fue calentada a 70° C por 10 min. Los controles negativos para la amplificación de las muestras fueron tratados con el mismo protocolo de transcripción, pero sin la enzima transcriptasa reversa.

#### **4.9.3. Amplificación del ADNc por PCR.**

La reacción de amplificación del ADNc obtenido se realizó en un termociclador Mastercycler (Eppendorf) en presencia de partidores específicos (Tabla 3). Se preparó la siguiente mezcla de reacción: Tris-HCl pH 8,8 (10 mM), KCl 50 mM, Nonidet P40 0,8 % (v/v), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mezcla de dNTPs (0,2 mM de cada uno), partidores específicos (0,2 μM de cada uno), Taq ADN polimerasa 0,3 U (Fermentas) y 1 μL del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12.5 μL. La mezcla fue incubada inicialmente a 95° C por 5 min, luego se realizaron 35 ciclos de 95° C por 30 s, 55° C por 30 s y 72° C por 30 s, por último se realizó una extensión final de 72° C por 7 min. Todos los ADNc utilizados fueron testeados con partidores específicos para GAPDH y/o S18. Los partidores utilizados para amplificar los distintos genes fueron diseñados utilizando el programa Oligo Primer<sup>®</sup>, teniendo en cuenta su T<sub>m</sub>, el porcentaje de GC y la formación de dímeros y loops.

**Tabla 3. Partidores**

Nombre gen	Secuencia	Producto
GAPDH cuye SN	CGCCGCATCGGTATTCCTTC	119 pb
GAPDH cuye AS	ATGAAAGCAGCCCTGGTGAC	
cS18 SN	ATGTGGTGTGAGGAAAGCAG	195 pb
cS18 AS	GCTTGTTGTCCAGACCGTTG	
cSVCT2 SN	GTCCATCGGTGACTACTA	114 pb
cSVCT2 AS	ATGCCATCAAGAACACAGGA	

#### 4.9.4. Electroforesis en geles de agarosa.

Para la identificación de los productos de PCR se prepararon geles de agarosa 1,2 % p/v en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se utilizó tampón de carga 6x que contenía glicerol 30 % v/v, azul de bromofenol 0,5 % p/v en tampón TAE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM). Como estándar de peso molecular se sembraron 0.5 µg de un estándar de 100 pares de bases [sm #1143 (Fermentas)]. Los geles fueron sometidos a un campo eléctrico de 100 V por 30 min en tampón TAE en una cámara de electroforesis. Los fragmentos de ADN en el gel fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio, en un transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes de los geles se obtuvieron en un equipo de fotodocumentación de geles (Vilber Lourmat, Marne la Vallée Cedex 1, Francia).

#### 4.9.5. RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

La extracción del ARN total y la transcripción reversa fueron realizadas de la misma forma que para el RT-PCR convencional. La cuantificación del ADNc de los distintos genes evaluados fue realizada en forma relativa a un gen de referencia. Para la cuantificación se

utilizó el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Agilent Technologies, Inc) en un volumen final de 12.5 µL conteniendo 1 µL de ADNc, 500 nM de los partidores respectivos, y 30 nM de colorante ROX. Las muestras se denaturaron inicialmente a 95°C por 10 min, luego se realizaron 40 ciclos de 95° C por 30 s, 55° C por 30 s y 72° C por 1 min, en el termociclador Mastercycler Realplex<sup>2</sup> (Eppendorf). Se realizaron curvas de calibración, con diluciones seriadas, de una de las muestras para determinar la eficiencia de cada una de las reacciones. La cuantificación se realizó comparando el número de ciclos requeridos para amplificar cada gen sobre el ciclo umbral (Ct), en relación al número de ciclos requeridos para amplificar un gen de referencia sobre su umbral. Los resultados fueron cuantificados utilizando el método basado en la eficiencia del PCR (Pfaffl, 2001). Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPat InStat 3.0.

#### **4.10. Inyección estereotáxica de células tumorales en el cerebro de cobayos.**

Los cobayos fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con una mezcla de ketamina (60 mg/kg), xilacina (10 mg/kg) y acepromacina maleato (10 mg/kg). Luego de rasurar sus cabezas, los animales fueron instalados en un marco estereotáxico. Posteriormente, se limpió el área a intervenir con etanol al 70 % v/v y se realizó una incisión desde un punto medio entre los ojos hasta un punto medio entre las orejas. Una vez descubierto y limpio el cráneo, se localizó el Bregma (punto de referencia para las coordenadas estereotáxicas) y se calculó la coordenada para inyectar en la zona subventricular del cerebro (0 mm antero-posterior, 3 mm lateral y 4 mm dorso-ventral a partir del Bregma). A continuación, se inyectaron  $1 \times 10^6$  células tumorales U87 – MG o  $1 \times 10^6$  células tumorales C3 contenidas en un volumen de 10 µL, a un flujo de 1 µL/min, utilizando una jeringa Hamilton de 50 µL. Finalmente, los animales fueron suturados

utilizando corchetes metálicos y fueron mantenidos en una sala para animales operados bajo estrictas condiciones de higiene. Los animales se mantuvieron por 2 a 3 semanas antes del sacrificio y análisis de los tumores.

#### **4.11. Tinción histológica para la detección de colágeno.**

Se utilizaron cortes histológicos de cerebro de cobayos a los que previamente se les indujo un tumor subventricular. Los cortes fueron desparafinados en tres baños de Histo-Clear® e hidratados en una batería de etanol de concentración decreciente. A continuación, los cortes fueron lavados en agua destilada y teñidos en hematoxilina de Weigert durante 7 min. Luego los cortes fueron lavados en agua corriente por 10 min, en agua destilada por 5 min y teñidos en solución Biebrich Scarlett - Fucsina ácida (90 mL 1 % p/v solución acuosa de Biebrich Scarlett, 10 mL 1 % p/v solución acuosa de Fucsina ácida y 1 mL ácido acético glacial) por 2 min. Posteriormente, los cortes fueron lavados en agua destilada e incubados en solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (2,5 % p/v ácido fosfomolibdico, 2,5 % ácido fosfotúngstico en agua destilada) por 10 min. Los cortes fueron lavados en agua destilada y teñidos en azul de metileno (2,5 % p/v en agua destilada) por 5 min. Los cortes fueron lavados nuevamente en agua destilada e incubados en solución 1 % v/v ácido acético por 4 min. Finalmente, las cortes fueron deshidratados en una batería de etanol de concentración creciente y cuatro baños de Histo-Clear® y fueron montados con Histo-Mount®.

#### **4.12. Ensayos de inmunodetección de proteínas.**

Se realizaron ensayos de inmunodetección de proteínas en membranas immobilon® -P (Millipore) a partir de muestras de tejido de cerebro de cobayo.

#### **4.12.1. Obtención de extractos de proteínas totales.**

Los tejidos fueron extraídos, cortados en trozos pequeños y homogenizados con 150  $\mu$ L de un cóctel de inhibidores de proteasas (cOmplete Tables, Mini EDTA-free, EASYpack, Roche). Los tejidos homogenizados fueron sonicados a 4° C, luego fueron centrifugados por 10 min a 8.000 x g a 4° C y el sobrenadante resultante se conservó a -80° C. La concentración de proteínas fue cuantificada por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, EE.UU.) midiendo su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

#### **4.12.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida y electrotransferencia.**

Para resolver las proteínas de interés, se utilizaron geles al 10 % v/v de acrilamida/bisacrilamida. El gel separador fue preparado utilizando una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (40 % p/v/1,06 % p/v) al 25 % v/v, SDS 0,1 % p/v, TEMED 0,1 % v/v y persulfato de amonio 0,01 % p/v, preparado en tampón Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8). El gel espaciador fue preparado utilizando una mezcla acrilamida/bisacrilamida (40 % p/v/1,06 % p/v) 11 % v/v, SDS 0,1% p/v, TEMED 0,1 % v/v y persulfato de amonio 0,01 % p/v, preparado en tampón Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8). Como tampón de corrida se utilizó un tampón Tris-glicina pH 6,8 (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 % p/v). Se sembraron 100  $\mu$ g de proteínas diluidas en tampón de carga 6 x pH 6,8 (Tris-HCl 375 mM, SDS 9% p/v, glicerol 50% v/v,  $\beta$ -mercaptoetanol 9% v/v, azul de bromofenol 0,03% p/v). Se aplicó un voltaje de 100 V al gel montado en la cámara de electroforesis por 6 h aproximadamente. Las proteínas del gel resultante fueron transferidas a membranas Immobilon-P. Para esto, el gel fue puesto en contacto con la membrana en una cámara de

electrotransferencia en presencia de tampón Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), glicina 192 mM y metanol 20 % v/v. La electrotransferencia fue realizada a 40 mA durante 16 h a temperatura ambiente.

#### **4.12.3. Inmunodetección de las proteínas.**

Una vez realizada la transferencia, la membrana Immobilon-P fue teñida con una solución de rojo Ponceau-S 0,2 % p/v para confirmar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con leche descremada 5 % p/v en tampón TBS pH 7,4 (NaCl 150 mM, Tris 10 mM) y Tween-20 0,05 % v/v (TBS-TL) durante 30 min. Luego, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-SVCT2 G19 (1:1000) o anti-SVCT2 T19 (1:1000) diluidos en TBS-TL por 12 h a 4° C. Posteriormente, la membrana fue lavada con TBS-Tween-20 y bloqueada con TBS-TL. Luego, la membrana fue incubada por 2 h con el anticuerpo secundario anti-cabra IgG conjugado con peroxidasa diluido en TBS-TL. Una vez finalizada la incubación, la membrana fue lavada con TBS-Tween-20 y luego revelada con un sistema de detección quimioluminiscente (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer Inc, Massachusetts, EE.UU.). La señal de quimioluminiscencia fue capturada por un equipo fotodocumentador ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Capítulo 1. Descripción del nicho neurogénico del cerebro de cobayo adulto.

El cerebro de mamíferos adultos mantiene la generación de neuroblastos gracias a la existencia de NSCs, que pueden ser encontradas principalmente en la SVZ (Lois y Alvarez-Buylla, 1993; Reynolds y Weiss, 1992). En el cerebro de ratón, los neuroblastos que se originan en la SVZ migran rostralmente en dirección al BO a través de una ruta migratoria que se conoce como corriente de migración rostral (RMS) (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Rousselot y col., 1995). En el cerebro humano adulto, aún no se conoce con certeza si la RMS está presente. Sin embargo, se ha descrito la existencia de una extensión del ventrículo lateral que alcanza el BO (Curtis y col., 2007; Kam y col., 2009).

En este capítulo describimos la SVZ del cerebro de cobayo adulto y una extensión del ventrículo lateral (EVL) similar a la que ha sido descrita en el cerebro de humanos adultos. Además, analizamos la distribución celular, la actividad neurogénica, la migración de precursores y el efecto de la edad en estas regiones. Esta caracterización se realizó usando técnicas inmunohistoquímicas, de inmunofluorescencia, estudios ultraestructurales y marcaje *in vivo* con BrdU.

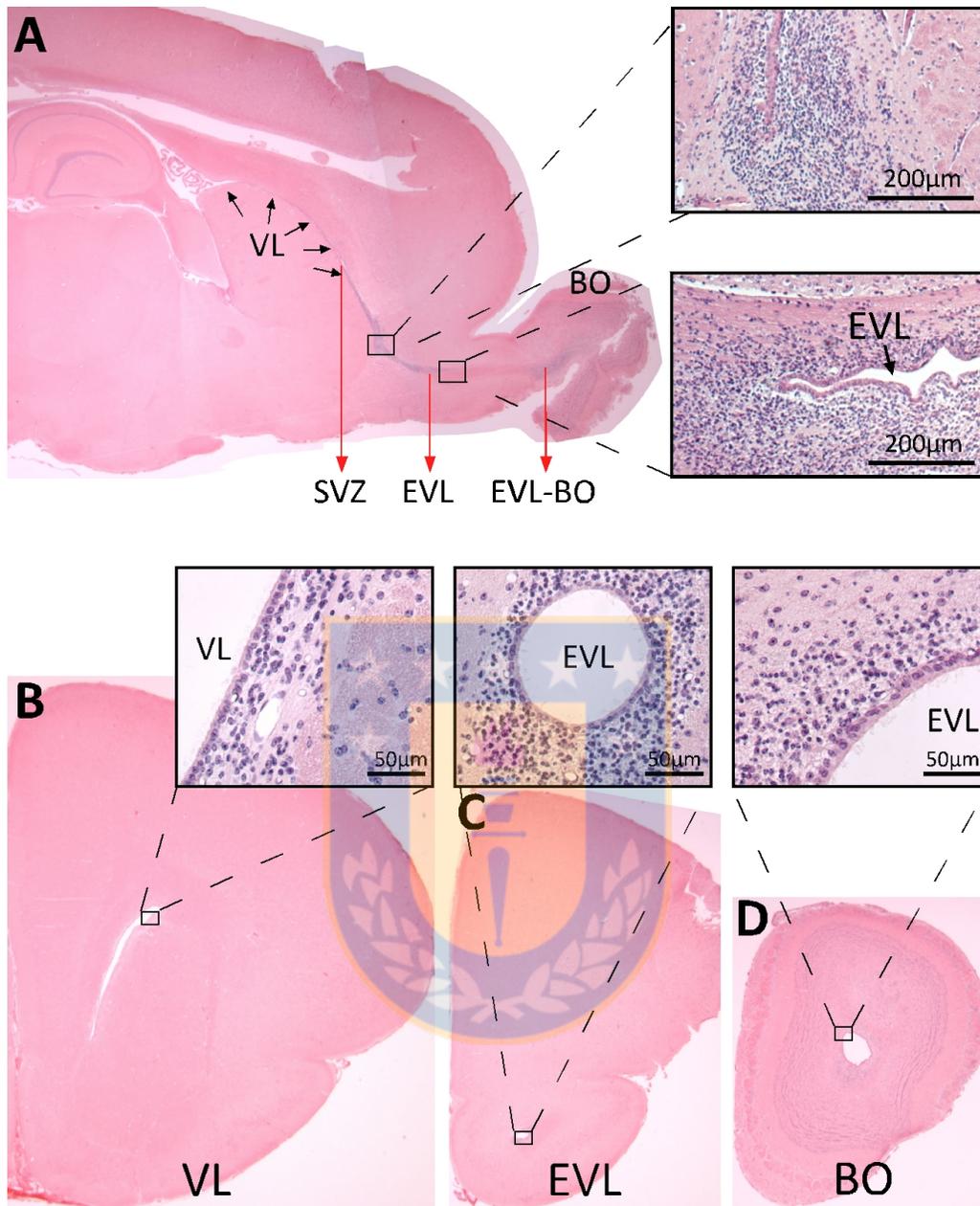
#### 5.1.1. El cerebro de cobayo adulto posee una extensión del ventrículo lateral, por el que fluye líquido cefalorraquídeo y que alcanza el bulbo olfatorio.

El cobayo es una de las pocas especies que posee una cavidad ventricular que alcanza el BO; sin embargo, esta cavidad no ha sido previamente descrita. Para definir la

disposición de las cavidades ventriculares, se analizaron cortes sagitales y frontales del cerebro de cobayo teñidos con hematoxilina–cromótopo (Figura 4A – D). En cortes sagitales, se observó que una columna de células conecta el VL con el BO (Figura 4A). Al observar con mayor aumento, notamos que esta columna de células se organiza alrededor de una cavidad ventricular que se extiende desde el VL y alcanza el BO (Figura 4A, insertos). En cortes frontales del área rostral del cerebro, confirmamos que la cavidad ventricular es continua, ya que se encontró en todos los cortes desde el BO al VL (Figura 4B – D). Por consiguiente, dicha cavidad ventricular continua fue denominada como "extensión del ventrículo lateral" (EVL).

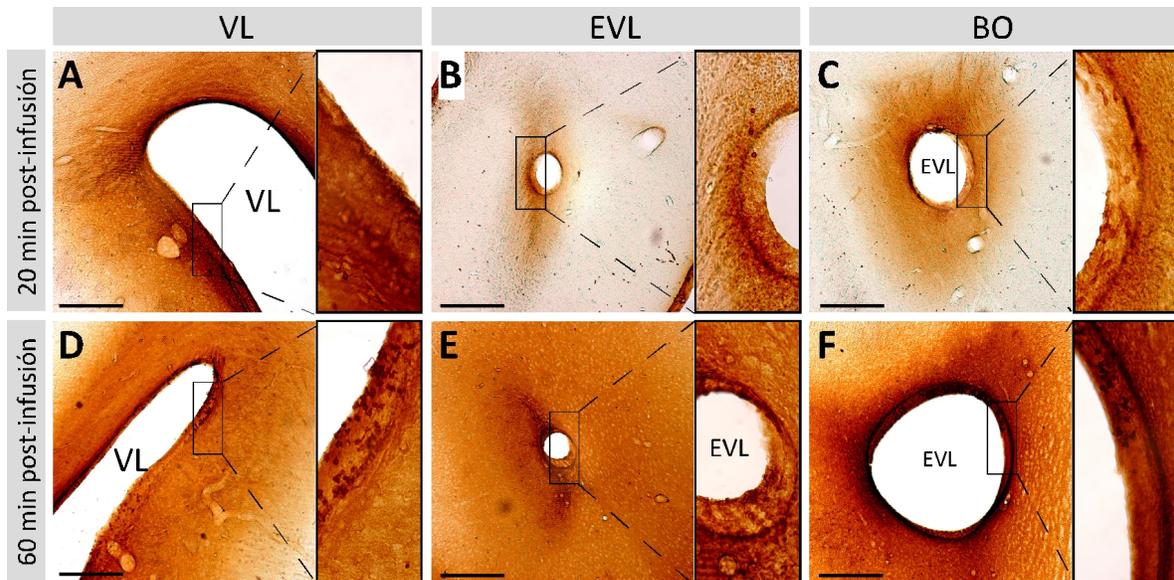
A continuación, para determinar si el líquido cefalorraquídeo (LCR) es capaz de fluir a través de la EVL, inyectamos peroxidasa en la cavidad del VL y sacrificamos los animales al transcurrir 20 y 60 min después de la inyección. A los 20 min después de la inyección, la peroxidasa difundió a través del parénquima adyacente a los VL (Figura 5A), e interesantemente, la peroxidasa también fue capaz de difundir rostralmente a través de la EVL (Figura 5B) alcanzando el BO (Figura 5C). A los 60 min después de la inyección, la peroxidasa difundió aún más en el parénquima adyacente a los VL, a la EVL y a la EVL en el BO (Figura 5D – F). Estos resultados confirman que LCR fluye a través de la EVL, lo que sugiere que la EVL es un ventrículo funcional.

Para comparar la difusión de peroxidasa en el parénquima adyacente al VL (SVZ), a la EVL y a la EVL en el BO, los cortes del cerebro de un cobayo, que fue previamente infundido con peroxidasa en el VL y perfundido luego de transcurrir 60 min desde la inyección, se procesaron para microscopía electrónica de transmisión y se realizó un análisis ultraestructural. La presencia de peroxidasa en el parénquima de la SVZ, de la EVL y del BO fue evidenciada por la presencia de un precipitado de diaminobencidina



**Figura 4. Análisis de la disposición del ventrículo lateral y de la extensión del ventrículo lateral en el cerebro de cobayo adulto.**

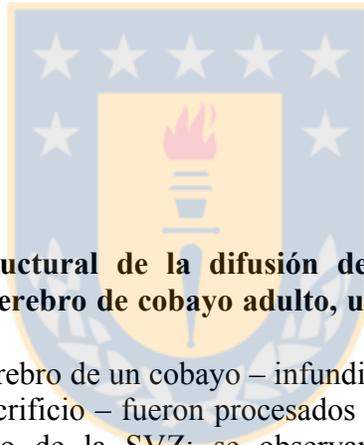
Cortes histológicos sagitales (A) y frontales (B – D) del cerebro de cobayo, teñidos con hematoxilina-cromótopo. (A) Se observó el ventrículo lateral (VL, flechas negras) y la ruta migratoria hacia el bulbo olfatorio (BO, inserto). Además, se señalan tres regiones diferentes (flechas rojas) que fueron estudiadas posteriormente en cortes frontales. (B) Corte frontal de la región anterior del VL donde se localiza la SVZ (inserto). (C) Corte frontal donde es posible observar una cavidad ventricular que conecta el VL con el BO, dicha cavidad se denominó, extensión del ventrículo lateral (EVL, inserto). (D) Corte frontal de la EVL que alcanza el BO (inserto). VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. BO: bulbo olfatorio.



**Figura 5. Análisis de la difusión de peroxidasa a través del VL y de la EVL del cerebro de cobayo.**

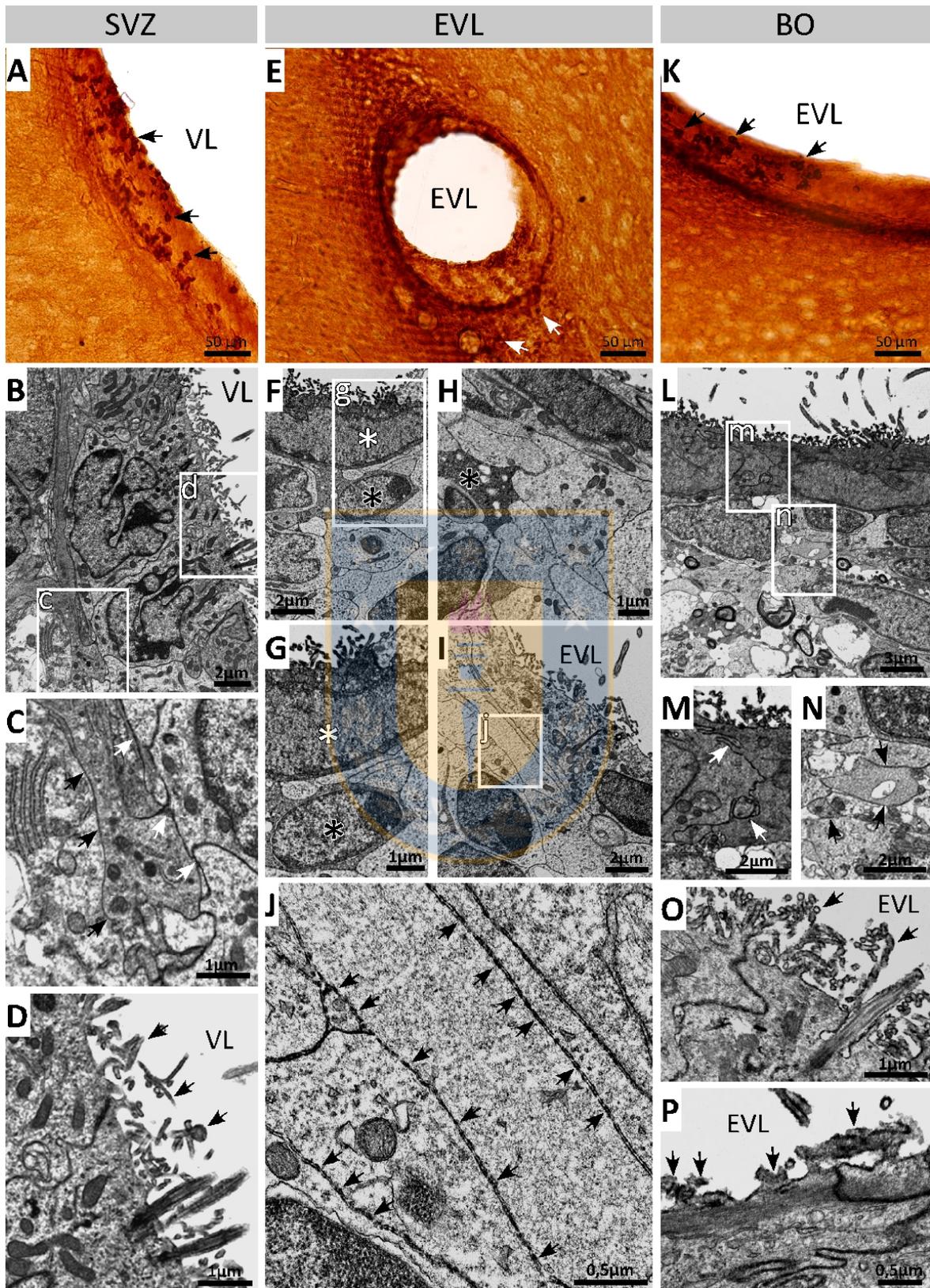
Cortes frontales de cerebros de cobayo infundidos con peroxidasa en la cavidad del VL y analizados después de 20 min (A – C) o 60 min (D – F) desde la infusión. (A – C) Después de 20 min desde la infusión de peroxidasa en el VL (A), la peroxidasa difundió rostralmente a través de la EVL (B) y alcanzó el BO (C). (D – F) Después de 60 min desde la infusión de peroxidasa en el VL (D), la peroxidasa difundió aún más en el parénquima del VL (D), de la EVL (E) y del BO (F), confirmando que el líquido cefalorraquídeo fue capaz de fluir rostralmente a través de la EVL. Mayor aumento en los insertos. VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. BO: bulbo olfatorio. Barra de aumento: 400  $\mu$ m.

de color café, en las imágenes de microscopía de campo claro (Figura 6A, E y K). Estas mismas áreas fueron las analizadas posteriormente por microscopía electrónica de transmisión. En la SVZ, la difusión peroxidasa en el parénquima adyacente fue evidenciada por la presencia de límites intercelulares electrón-densos (Figura 6B). Los límites intercelulares fueron más electrón-densos entre las células ependimarias (Figura 6C, flechas blancas) que entre las células subependimarias (Figura 6C, flechas negras), indicando que existe un gradiente de difusión de la peroxidasa. Adicionalmente, los cilios y microvellosidades de las células ependimarias fueron resaltados de forma tenue por la presencia de la peroxidasa (Figura 6D, flechas). En la EVL, se observaron algunas células electrón-densas en la pared ependimaria y en área subependimaria debido a la incorporación de la peroxidasa en el medio intracelular (Figura 6F – H, asteriscos). En relación a la difusión de la peroxidasa, ésta fue mayor en la EVL que en la SVZ, resultando fácil encontrar cúmulos de peroxidasa entre células subependimarias (Figura 6I – J, flechas). En el BO, las células de la pared ependimaria también incorporaron peroxidasa (Figura 6K, flechas). Además, la peroxidasa fue observada principalmente entre células ependimarias (Figura 6L – N, flechas) y los cilios y microvellosidades de las células ependimarias fueron resaltados intensamente por la presencia de la peroxidasa (Figura 6O – P, flechas). Estos resultados muestran que la peroxidasa se distribuyó en todas las cavidades ventriculares analizadas; sin embargo, ésta se acumuló en el extremo rostral del ventrículo, es decir, en la EVL en el BO.



**Figura 6. Análisis ultraestructural de la difusión de peroxidasa a través de las cavidades ventriculares del cerebro de cobayo adulto, usando microscopio electrónica de transmisión.**

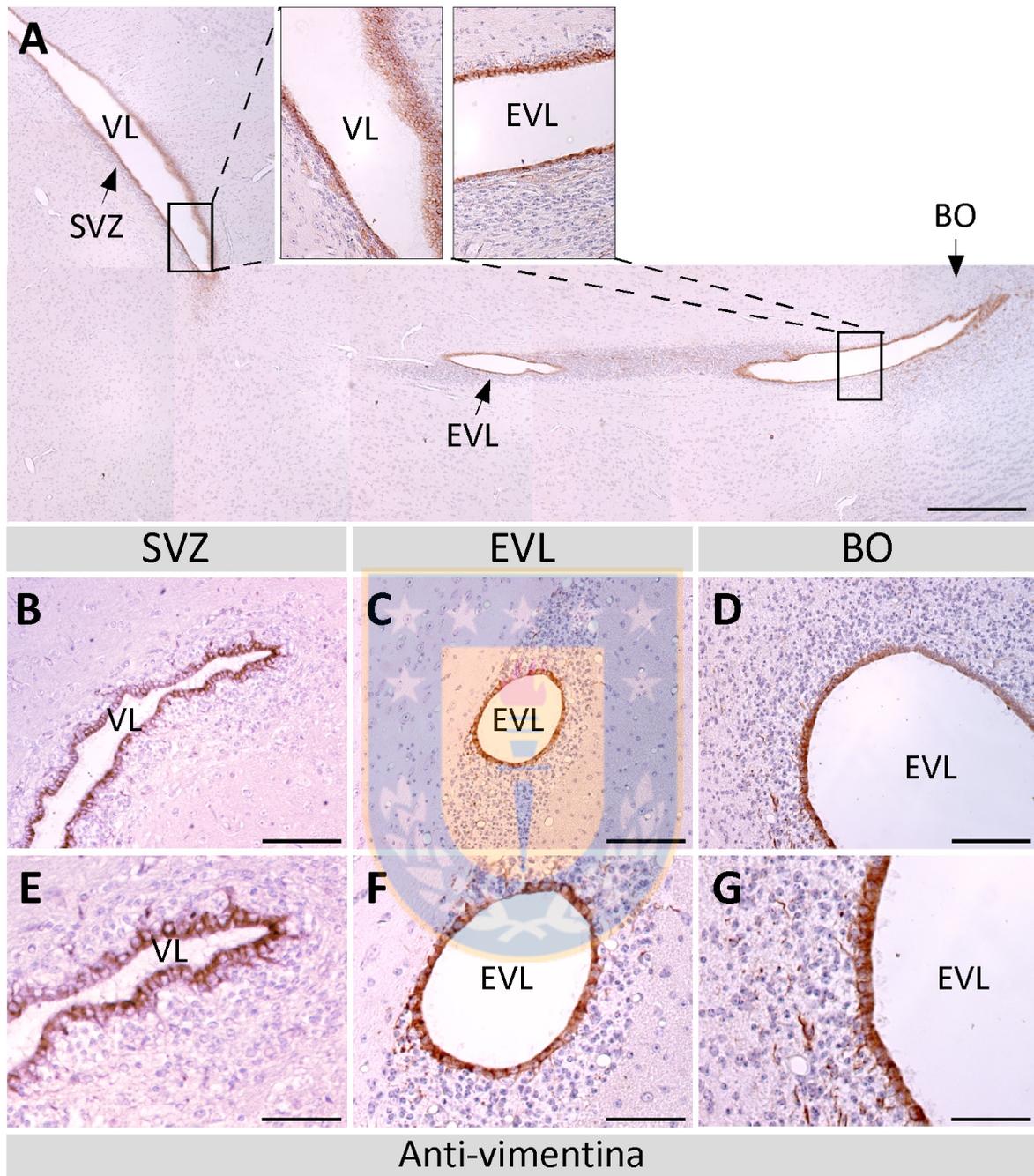
(A – P) Cortes frontales del cerebro de un cobayo – infundido con peroxidasa en la cavidad del VL, 60 min previo a su sacrificio – fueron procesados para microscopia electrónica de transmisión. (A) Corte grueso de la SVZ; se observan células oscuras en la pared endimaria (flechas). (B) Se distinguen células endimarias ciliadas y células en el área subependimaria. (C) Los límites celulares son más oscuros entre células endimarias (flechas blancas) que entre células subependimarias (flechas rojas). (D) Los cilios y las microvellosidades de las células endimarias se destacan en forma tenue por la peroxidasa. (E) Corte grueso de la EVL; se observan células oscuras en la pared endimaria y en la área subependimaria (flechas). (F y G) Algunas células endimarias (asterisco blanco) y células subependimarias (asterisco negro) se oscurecen por la incorporación de peroxidasa. (H) Célula subependimaria que incorporó peroxidasa (asterisco). (I y J) Se señalan cúmulos de peroxidasa entre los límites intercelulares de las células subependimarias (flechas). (K) Corte grueso del BO; se observan células oscuras en la capa endimaria (flechas). (L, M y N) Los límites intercelulares son más oscuros entre células endimarias (M, flechas) que entre células subependimarias (N, flechas). (O y P) Los cilios y las microvellosidades se destacan intensamente por la peroxidasa, sugiriendo una acumulación de la peroxidasa en el extremo rostral de la EVL. SVZ: zona subventricular. VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. BO: bulbo olfatorio.



### **5.1.2. Los VLs y la EVL son revestidos por células endimarias y bajo esta capa de células se disponen los neuroblastos a lo largo de la SVZ y de la EVL.**

Para determinar si las células endimarias también revisten las cavidades ventriculares del cerebro de cobayo, se realizó una inmunolocalización en cortes frontales y sagitales de la SVZ, de la EVL y del BO, utilizando anti-vimentina para detectar las células endimarias. En cortes sagitales, encontramos una reacción positiva para anti-vimentina en la pared de los VL y en la pared de la EVL a lo largo de toda su extensión (Figura 7A, insertos). Posteriormente, confirmamos estas observaciones en cortes frontales. Primero en la SVZ, observamos que una línea de células endimarias reviste el VL, separando la SVZ de la cavidad ventricular (Figura 7B y E). Las células endimarias también fueron observadas revistiendo la EVL, incluyendo la EVL en el BO (Figura 7C – G). Por otra parte, también se detectaron células gliales (astrocitos) mediante anti-vimentina en la zona subependimaria de la SVZ, de la EVL y de la EVL en el BO (Figura 7B – G).

A continuación, para determinar la presencia de neuroblastos en la SVZ, en la EVL y en el BO del cerebro de cobayo, se realizó una inmunolocalización en cortes frontales y sagitales, utilizando anti-tubulina  $\beta$ III para detectar los neuroblastos. En cortes sagitales, observamos la presencia de neuroblastos anti-tubulina  $\beta$ III positivos en la SVZ de los VL y también en la EVL, incluyendo la EVL en el BO (Figura 8A, insertos). Luego, confirmamos estas observaciones en cortes frontales. En la SVZ, observamos que los neuroblastos se localizan en la zona subependimaria (Figura 8B y E, flechas). En la EVL, se determinó que las células que se organizan alrededor de la esta cavidad eran neuroblastos (Figura 8C y F, flechas); éstos se encontraron altamente empaquetados rodeando la EVL y levemente más dispersos en la EVL del BO (Figura 8D y G, flechas). Posteriormente, para



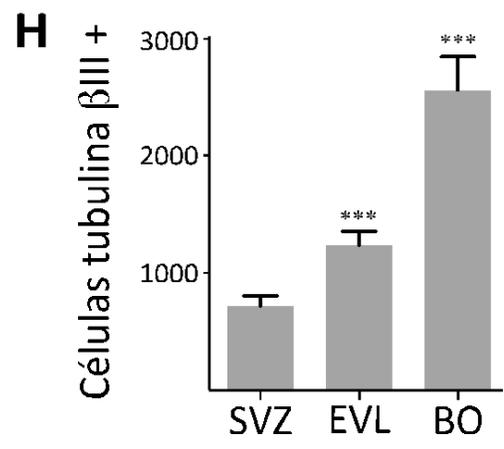
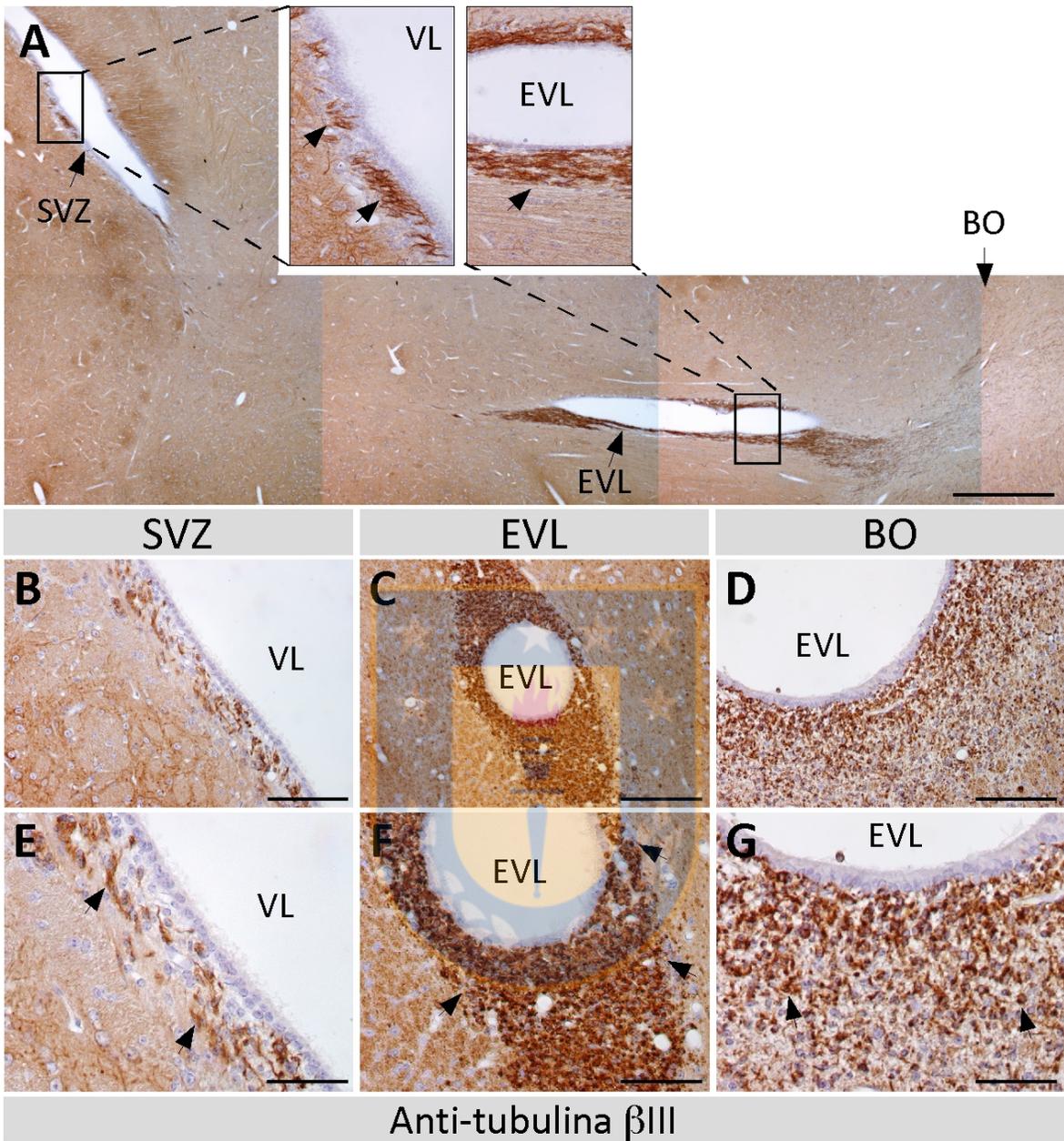
**Figura 7. Localización de las células endimarias en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.**

Las células endimarias fueron detectadas con el anticuerpo anti-vimentina (1:200) en cortes sagitales (A) y frontales (B – G) de cerebro de cobayo. Se observó que las células endimarias revisten el VL (A, B y E) y también la EVL (A, C y F) y la EVL en el BO (A, D y G). E, F y G mayores aumentos de B, C y D, respectivamente. VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. BO: bulbo olfatorio. Barras de aumento: A: 500  $\mu$ m, B – D: 100  $\mu$ m, E – G: 50  $\mu$ m.



**Figura 8. Localización de los neuroblastos en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.**

Los neuroblastos fueron detectados con el anticuerpo anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000) en cortes sagitales (**A**) y frontales (**B – G**) de cerebro de cobayo. Los neuroblastos se localizaron en pequeñas agrupaciones en la SVZ bajo la capa de células endimarias (**A, B y E**, flechas); densamente empaquetados en rodeando la EVL (**A, C y F**, flechas) y menos empaquetados en la EVL en el BO (**A, D y G**, flechas). E, F y G mayores aumentos de B, C y D, respectivamente. Los neuroblastos fueron cuantificados en la SVZ, en la EVL y en la EVL en el BO (**H**). El número de neuroblastos incrementa progresivamente desde la SVZ hacia la EVL en el BO. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola, \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3$ . VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. BO: bulbo olfatorio. Barras de aumento: A: 500  $\mu$ m, B – D: 100  $\mu$ m, E – G: 50  $\mu$ m.



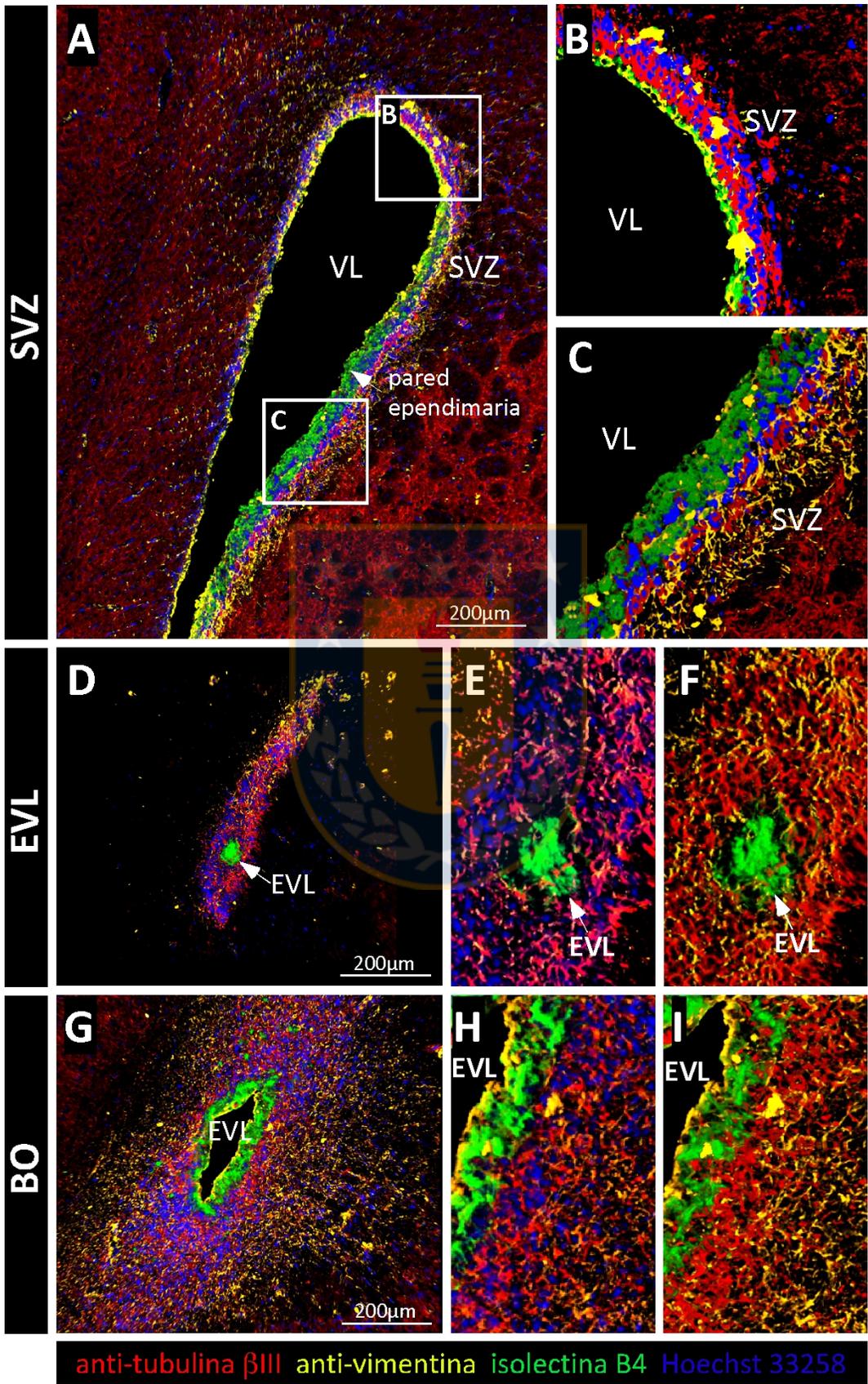
determinar cómo varía el número de neuroblastos a lo largo de las cavidad analizadas, cuantificamos los neuroblastos en la SVZ, en la EVL y en el BO y encontramos que su número aumentó progresivamente desde la SVZ hacia la EVL en el BO, donde alcanzaron un promedio de  $2.559 \pm 164,5$  neuroblastos por sección (Figura 8H).

Para definir y comparar las distribuciones gliales y neuronales en la SVZ, en la EVL y en la EVL en el BO del cerebro de cobayo, se realizó una inmunolocalización en cortes frontales de éstas regiones, utilizando anti-tubulina  $\beta$ III para detectar neuroblastos, anti-vimentina para detectar células endoteliales y gliales, isolectina B4 para detectar células endoteliales y Hoechst para detectar los núcleos. A continuación, analizamos las muestras por microscopía confocal espectral, y obtuvimos proyecciones tridimensionales en el plano Z (Figura 9). Observamos una distribución glial y neuronal diferencial a lo largo de la SVZ del VL (Figura 9A). En la región dorsal del VL, observamos un alto número de neuroblastos codistribuidos con un bajo número de astrocitos, ambos localizados por debajo de la línea de células endoteliales (Figura 9B). En la región medial del VL, observamos que la cantidad de neuroblastos fue menor en comparación con las región dorsal del VL mientras que la cantidad de células gliales fue mayor (Figura 9C). En relación a la distribución glial y neuronal en la EVL, observamos una alta densidad de neuroblastos rodeando la EVL justo debajo de la línea de células endoteliales, y éstos neuroblastos, a su vez, fueron rodeados por astrocitos (Figura 9D, E y F). En el BO, la cavidad ventricular posee un diámetro mayor, y los neuroblastos se observaron más dispersos y codistribuidos con astrocitos (Figura 9G, H y I).



**Figura 9. Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.**

Las imágenes representan proyecciones en plano Z y reconstrucción en 3D, usando múltiples marcadores, anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000) como marcador neuronal, anti-vimentina (1:200) como marcador glial, isolectina B4 (1:10) como marcador de células endoteliales y Hoechst 33258 (1:1000) como marcador nuclear. **(A)** Distribución glial y neuronal en la SVZ de los VL, se observan diferentes distribuciones celulares a lo largo del VL. **(B)** Mayor aumento de la región dorsal del LV; se observa que las células endoteliales (verde) revisten el VL, que una gran cantidad de neuroblastos (rojo) se localiza justo por debajo de la pared de células endoteliales y que una pequeña cantidad de células gliales (amarillo) se co-distribuye con los neuroblastos. **(C)** Mayor aumento de la región central del VL; se observan pocos neuroblastos co-distribuidos con muchas células gliales. **(D)** Distribución celular en la EVL, se observa que las células endoteliales (verde) revisten la EVL, que los neuroblastos (rojo) se encuentran densamente empaquetados rodeando la pared de células endoteliales y que a su vez las células gliales rodean la corriente de neuroblastos. **(E – F)** Mayor aumento de la imagen D. **(G)** Distribución celular en la EVL en el BO, se observa que la cavidad ventricular tiene un mayor diámetro y que los neuroblastos se encuentran dispersos rodeando la EVL y codistribuidos con las células gliales. **(H – I)** Mayor aumento de la imagen G. VL: ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. EVL: extensión del ventrículo lateral.



### **5.1.3. La citoarquitectura de la SVZ y de la EVL de cobayo adulto es semejante a la citoarquitectura de la SVZ de ratón, pero posee características de la SVZ humana.**

Para complementar y confirmar los resultados de distribución celular obtenidos mediante los análisis inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia, se realizó un análisis ultraestructural para determinar la citoarquitectura de la SVZ y de la EVL del cerebro de cobayo adulto. En el VL, observamos que una línea oscura de células endimarias separa la cavidad ventricular de la SVZ (Figura 10A y B). Estas células presentan cilios (Figura 10C, flechas amarillas) y microvellosidades (Figura 10C, flechas blancas) en su superficie apical; presentan un núcleo irregular con invaginaciones profundas, él que se compone principalmente de eucromatina con grandes cúmulos de heterocromatina asociadas a la membrana nuclear (Figura 10D, G y H, letra e). De todos los tipos celulares observados en la SVZ, las células endimarias poseen el citoplasma más electrón–denso, portando el mayor número de mitocondrias (Figura 10J, en azul) y también, algunas gotas pequeñas de lípidos (Figura 10K, flechas amarillas). Además, observamos que algunas células endimarias poseen un proceso radial dirigido a los vasos sanguíneos (Figura 10E, en azul). Esta característica fue descrita previamente en las células endimarias humanas (Quinones-Hinojosa y col., 2006). Bajo la línea oscura de células endimarias, observamos un alto número de neuroblastos dispuestos en grupo, sin espacio extracelular visible (Figura 10F, en rojo). Estas células presentan un núcleo ovalado con grandes y pequeños cúmulos de cromatina condensada y tienen un citoplasma escaso y electrón–denso (Figura 10F, en rojo). También localizados bajo la línea de células endimarias, y cercanos a los neuroblastos, encontramos a los astrocitos. Estas células presentan un núcleo

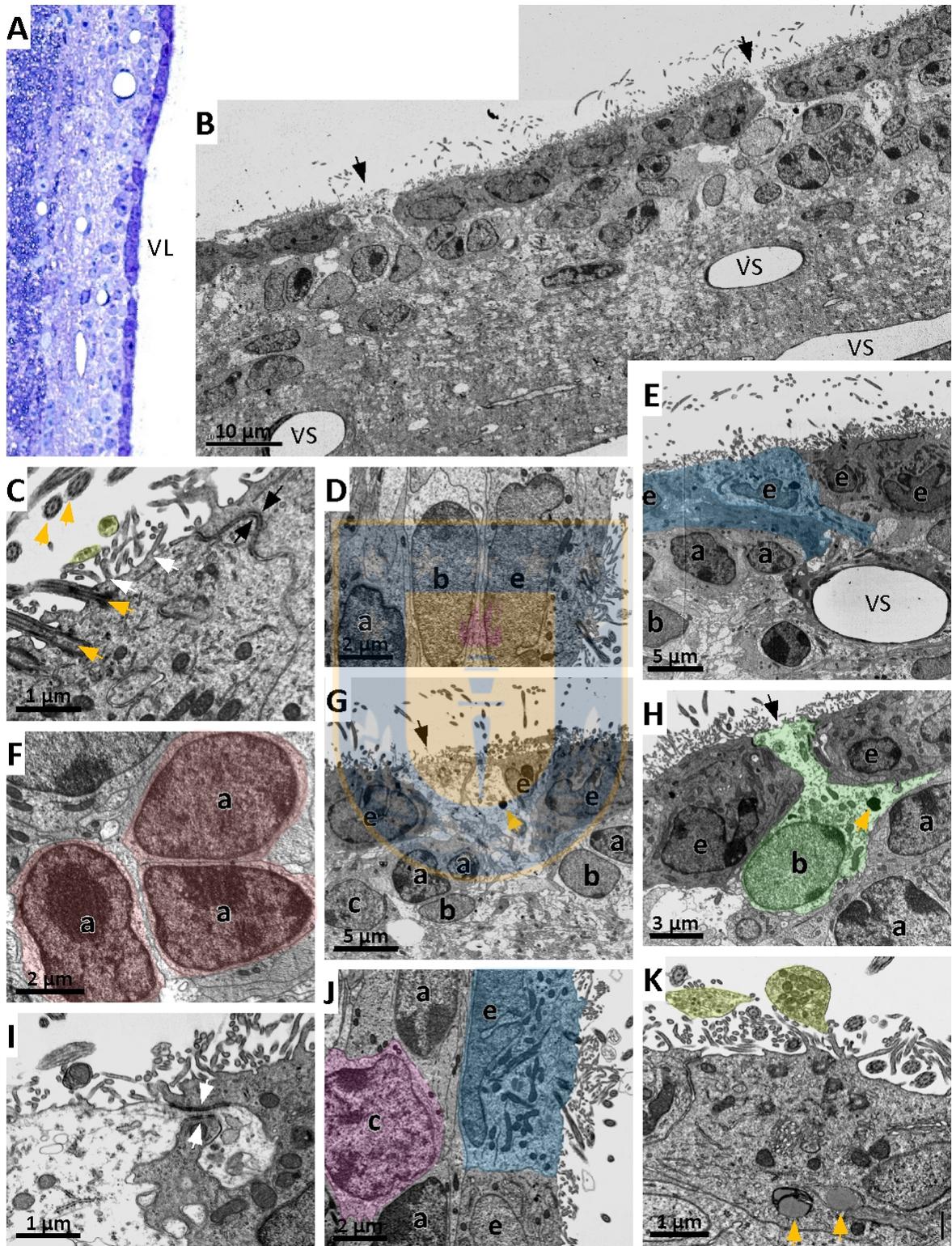
ovalado eucromático, con algunos cúmulos grandes de heterocromatina (Figura 10D y H, letra b); presentan el citoplasma más electrón-lúcido comparado a las demás células analizadas, con inclusiones electrón-densas (Figura 10G y H, flechas amarillas) y numerosas mitocondrias (Figura 10H). Algunos astrocitos, a través de sus procesos, fueron observados tocando la superficie ventricular y haciendo contacto con el líquido cefalorraquídeo (Figura 10B, G y H, flechas negras). Esta clase de astrocitos se ha observado previamente en la SVZ de ratón adulto, donde fueron descritos como las células madre neurales del cerebro adulto (Mirzadeh y col., 2008). Por otro lado, también observamos uniones adherentes entre las células endimarias y los astrocitos que contactan el ventrículo (Figura 10I, flechas blancas), así como entre las células endimarias (Figura 10C, flechas negras). En relación a las células tipo C, se localizan cerca de los astrocitos y de los neuroblastos, y poseen un citoplasma electrón-lúcido y un núcleo grande e irregular con numerosos cúmulos pequeños de cromatina condensada (Figura 10J, en rosado). Por último, observamos axones en la cavidad ventricular, los que poseen un contenido denso y numerosas mitocondrias (Figura 10K, en amarillo).

En la EVL, los tipos celulares que observamos poseen una morfología similar a la observada en la SVZ; sin embargo, las cantidades y la distribución de estos tipos celulares fueron diferentes (Figura 11A y B). En la EVL, las células endimarias presentan un núcleo más grande y con una menor cantidad de invaginaciones que las células endimarias de la SVZ (Figura 11B y F, letra e); también presentan cilios y microvellosidades en su superficie apical (Figura 11D), y algunas tienen un proceso radial, como fue observado en las células endimarias de la SVZ (Figura 11C, en azul). Bajo la línea de células endimarias, observamos una gran cantidad de neuroblastos (Figura 11B, E y F, en rojo), cuya morfología es igual a la que describimos en los neuroblastos de la



**Figura 10. Análisis ultraestructural de la SVZ del cerebro de cobayo, usando microscopia electrónica de transmisión.**

(A) Corte semifino de la SVZ teñido con azul de toluidina. (B) En la SVZ es posible distinguir la línea de células endimarias, diferentes tipos celulares en el área subependimaria y vasos sanguíneos. (C) Las células endimarias poseen cilios (flechas amarillas) y microvellosidades (flechas blancas) en su superficie apical y se unen a través de uniones adherentes (flechas negras). (D) Célula endimaria (e), astrocito (b) y neuroblasto (a); la célula endimaria (e) posee un núcleo irregular y un citoplasma electrón-denso. (E) Células endimarias (en azul) con un proceso radial dirigido hacia los vasos sanguíneos. (F) Tres neuroblastos (a, en rojo) en el área subependimaria; poseen un núcleo heterocromático, y un citoplasma electrón-denso. (G y H) Astrocitos (b, en verde) en el área subependimaria; poseen un citoplasma electrón-lúcido con cuerpos electrón-densos (flechas amarillas) y algunos contactan el ventrículo (flechas negras en B, G y H). (I) Uniones adherentes entre células endimarias y astrocitos que contactan el ventrículo (flechas blancas). (J) Célula tipo C (en rosado); posee un núcleo irregular con pequeños grupos de heterocromatina y un citoplasma electrón-lúcido. (K) Axones de la cavidad ventricular (en amarillo) en contacto directo con células endimarias y astrocitos; poseen mitocondrias y vesículas electrón-densas en su interior. VL: ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo.



SVZ; sin embargo, en la EVL observamos un mayor número de procesos conductores de neuroblastos con una alta cantidad de microtúbulos (Figura 11G, en rojo), lo que probablemente se debe a que existe un alto número de neuroblastos en migración, en diferentes posiciones rostro-caudales. Además, observamos que los procesos conductores de los neuroblastos nunca hicieron contacto con los vasos sanguíneos; sin embargo, observamos pies de astrocitos contactando los vasos sanguíneos (Figura 11H, en verde). Por otro parte, observamos muy pocos astrocitos; algunos de ellos se localizan cerca de la línea de células endoteliales (Figura 11I y G, en verde) y la mayoría se localiza entre los grupos de neuroblastos y el parénquima adyacente (Figura 11B). De manera interesante, identificamos dos astrocitos que hacían contacto con el ventrículo (Figura 11I y J, en verde (b)), similares a los que observamos en la SVZ. En el área subependimaria, también observamos oligodendrocitos (Figura 11C, en amarillo), mientras que no observamos células tipo C en la EVL. Por último, también observamos axones en la cavidad ventricular de la EVL (Figura 11J, en amarillo y en naranja). Es más, estos axones fueron observados haciendo contacto sináptico con astrocitos que contactan el ventrículo (Figura 11K, flechas amarillas), lo que sugiere que las NSC de cobayo podrían ser reguladas por axones ventriculares, similar a lo que se ha descrito previamente (Tong y col., 2014).

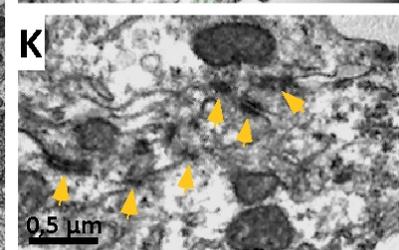
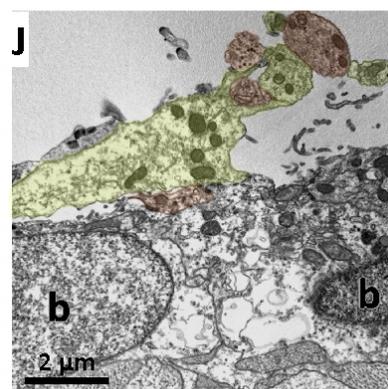
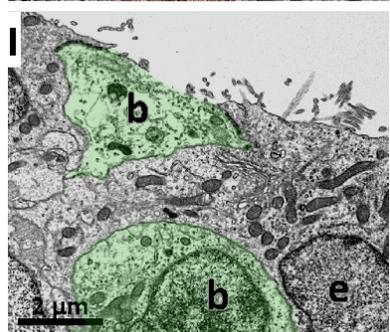
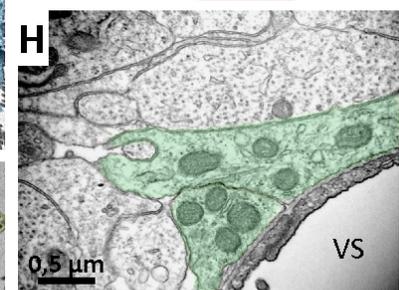
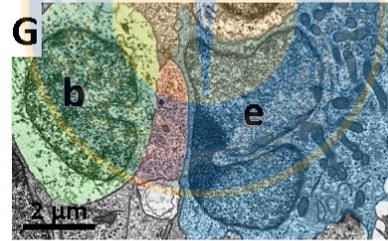
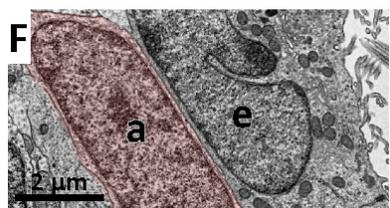
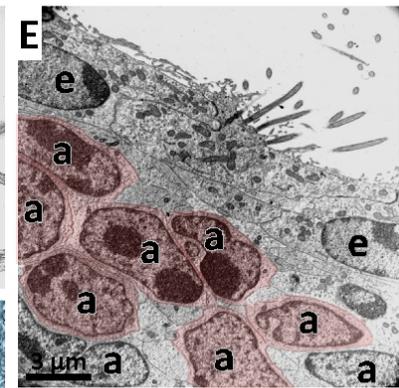
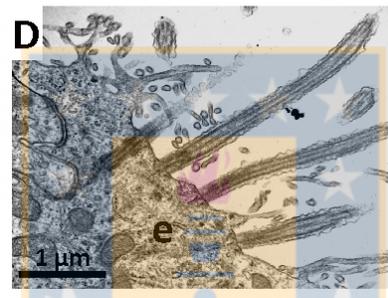
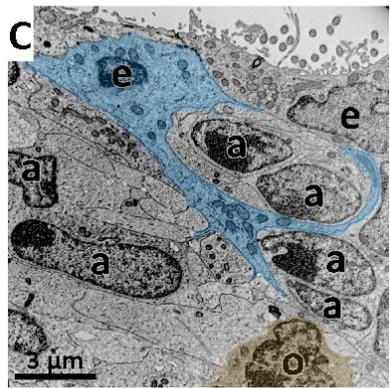
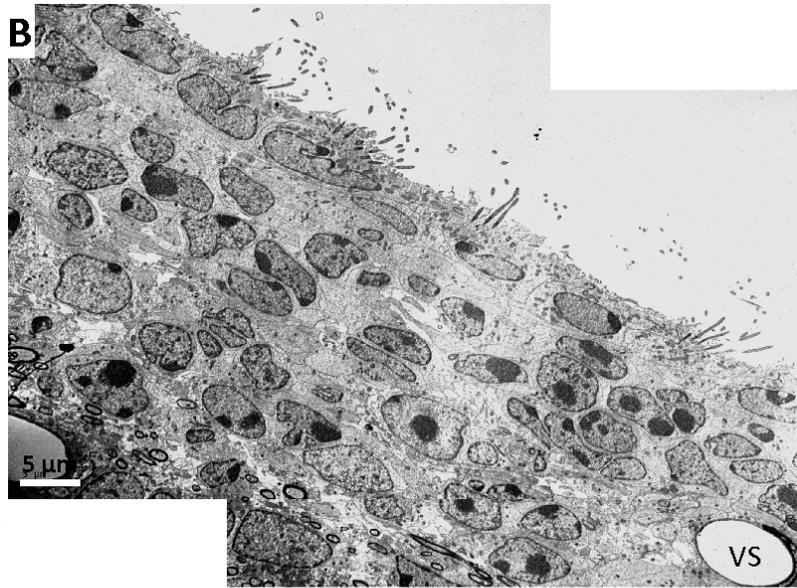
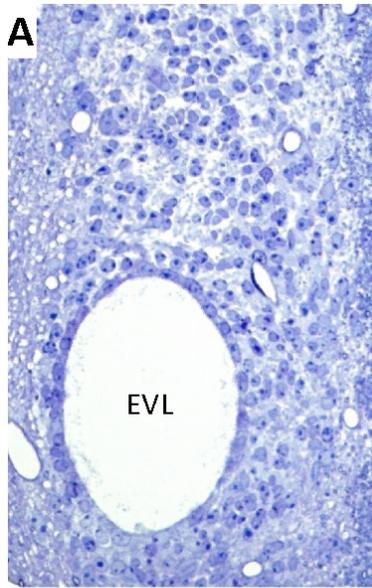
#### **5.1.4. La capacidad proliferativa y neurogénica se concentra en la SVZ y el envejecimiento reduce estas capacidades drásticamente.**

Para determinar si la SVZ del cerebro de cobayo alberga células con capacidad proliferativa como ha sido descrito en la SVZ del cerebro de ratón y para determinar si estas células también pueden ser encontradas a lo largo de la EVL, analizamos la capacidad



**Figura 11. Análisis ultraestructural de la EVL del cerebro de cobayo, usando microscopia electrónica de transmisión.**

(A) Corte semifino de la EVL teñido con azul de toluidina. (B) En la EVL se distinguen la línea de células endimarias, una gran cantidad de células en el área subependimaria y vasos sanguíneos. (C) Las células endimarias poseen una morfología similar a la morfología observada en la SVZ y algunas también poseen un proceso radial (en azul). Además, se observa un oligodendrocito (en amarillo). (D) Las células endimarias (e) poseen cilios y microvellosidades en su superficie apical. (E) En el área subependimaria, hay un gran número de neuroblastos altamente empaquetados (en rojo). (F) Los neuroblastos (a, en rojo) se localizaron por debajo de la línea de células endimarias (e); poseen un núcleo heterocromático y un citoplasma electrón-denso. (G) Un astrocito (en verde) separado de una célula endimaria (en azul) por el proceso conductor de un neuroblasto; los astrocitos poseen un núcleo eucromático y un citoplasma electrón-lúcido. (H) “Pies” de astrocitos (en verde) en contacto directo con los vasos sanguíneos. (I) Astrocito (b, en verde) haciendo contacto con el ventrículo. (J) Grupo de axones de la cavidad ventricular (en amarillo y en naranja) en contacto directo con la superficie apical de un astrocito; los axones poseen mitocondrias y vesículas electrón-densas en su interior. (K) Contactos sinápticos (flechas amarillas) entre un axón y un astrocito. EVL: extensión del ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo.



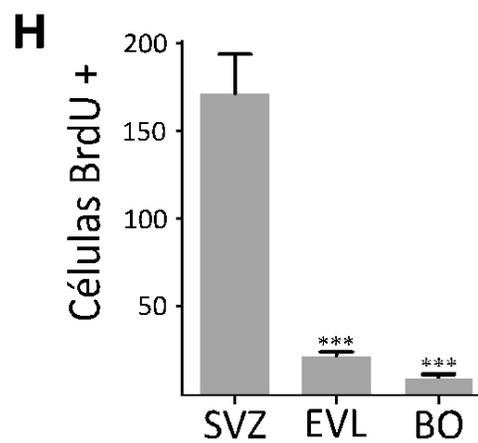
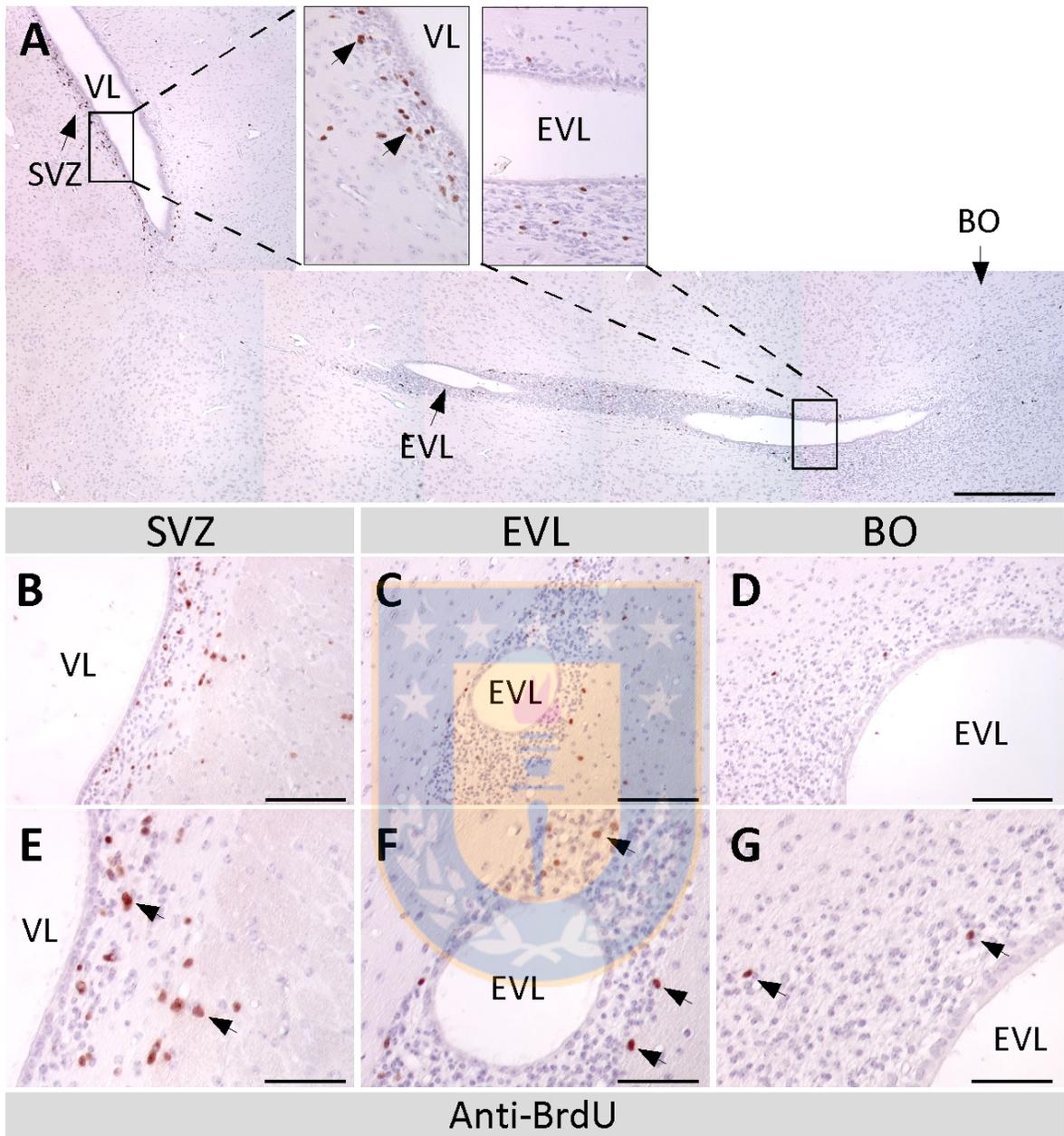
proliferativa de la SVZ, de la EVL y de la EVL en el BO, mediante la administración y marcaje *in vivo* con BrdU. Posterior al marcaje, realizamos un análisis de inmunolocalización en cortes frontales y sagitales utilizando anti-BrdU para detectar células en proliferación. Encontramos que las células BrdU positivas se localizan en el área subependimaria de la SVZ, de la EVL y del BO y que el número de estas células varía considerablemente a lo largo de las áreas analizadas, detectando abundantes células BrdU positivas en la SVZ (Figura 12A, inserto), mientras que solo algunas en la EVL (Figura 12A, inserto). Confirmamos los resultados utilizando cortes frontales de las tres áreas. En la SVZ, observamos varias células BrdU positivas bajo la línea de células endimarias (Figura 12B y E, flechas). En la EVL, incluyendo la EVL en el BO, observamos muy pocas células BrdU positivas (Figura 12C, D, F y G, flechas). A continuación, realizamos una cuantificación del número de células BrdU positivas en las tres áreas (Figura 12H). Encontramos que el número promedio de células BrdU positivas fue de  $171,53 \pm 10,01$  en la SVZ; sin embargo, el número promedio en la EVL y en el BO se redujo más de 10 veces (Figura 12H). En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad proliferativa se limita a la SVZ en el VL y que la EVL carece de esta propiedad.

A continuación, para determinar si existen cambios en la composición celular de la SVZ y de la EVL de cobayos de más edad, se analizaron animales de 6 y 12 meses de edad. En cortes frontales de la SVZ y de la EVL, se llevó a cabo un análisis de inmunolocalización con anti-vimentina para detectar células endimarias, con anti-tubulina  $\beta$ III para detectar neuroblastos y con anti-BrdU para detectar células en proliferación. En la SVZ de cobayos de 6 y 12 meses de edad, observamos que la ubicación de las células se mantuvo sin cambios; las células endimarias revistieron el ventrículo, y los neuroblastos y células BrdU positivas se localizaron bajo de la línea de células



**Figura 12. Detección de las células BrdU positivas (células tipo B y tipo C) en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.**

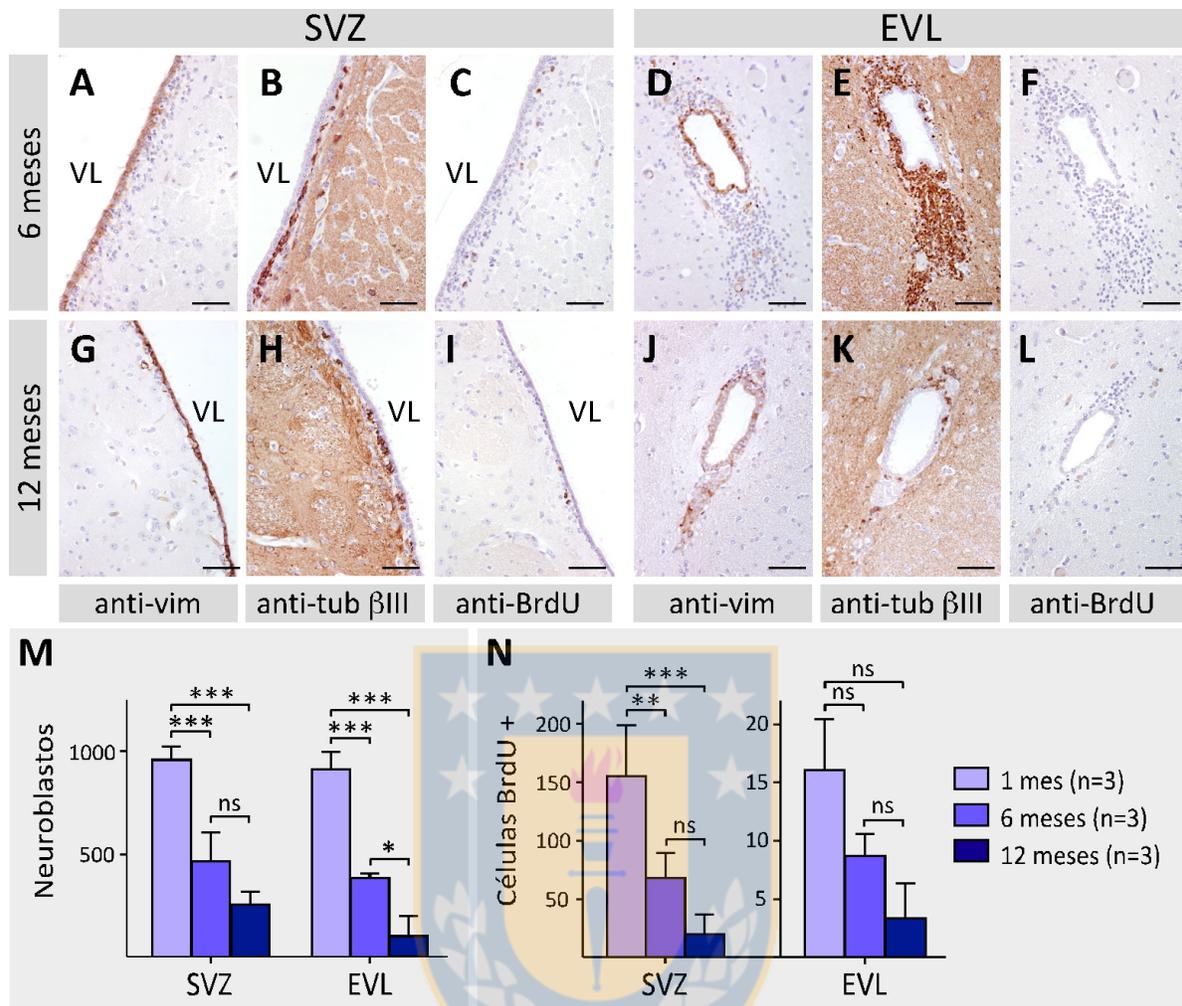
Las células BrdU positivas fueron detectadas con el anticuerpo anti-BrdU (1:500) en cortes sagitales (**A**) y frontales (**B – G**) de cerebro de cobayo. Se detectó una gran cantidad de células BrdU positivas en la SVZ (**A, B** y **E**, flechas), mientras que en la EVL (**A, C** y **F**, flechas) y en la EVL en el BO (**A, D** y **G**, flechas) se detectaron muy pocas. **E, F** y **G** mayores aumentos de **B, C** y **D**, respectivamente. Las células BrdU positivas fueron cuantificadas en las SVZ, en la EVL y en la EVL en el BO (**H**). Se encontró que el número de células BrdU positivas es más de 10 veces menor en la EVL y en la EVL en el BO en comparación al número de células en la SVZ. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola, \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3$ . VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. BO: bulbo olfatorio. Barras de aumento: A: 500  $\mu\text{m}$ , B – D: 100  $\mu\text{m}$ , E – G: 50  $\mu\text{m}$ .



ependimarias (Figura 13A – C). Sin embargo, en la SVZ de cobayos de 12 meses de edad, observamos que la cantidad de neuroblastos y de células BrdU positivas se redujo (Figura 13G – I). Del mismo modo, en la EVL de cobayos de 6 y 12 meses de edad, observamos que la cavidad ventricular se mantuvo abierta, y que la ubicación de las células se mantuvo sin cambios (Figura 13D – F). Sin embargo, el número de neuroblastos y células BrdU positivas se redujo dramáticamente en la EVL de animales de 12 meses de edad (Figura 13J – L). Para confirmar estos resultados, el número de neuroblastos (Figura 13M) y de células BrdU positivas (Figura 13N) fue cuantificado en la SVZ y en la EVL de cerebros de cobayos de 1, 6 y 12 meses de edad. Tanto el número neuroblastos como el de células BrdU positivas disminuyó progresivamente con la edad en la SVZ y en la EVL. Estos resultados demuestran que el nicho neurogénico de cobayo reduce su capacidad proliferativa y la génesis de neuroblastos con el aumento en la edad de los animales.

#### **5.1.5. Los neuroblastos que se originan en la SVZ, migran rodeando la EVL en dirección hacia el BO, donde se diferencian a neuronas periglomerulares y granulares.**

Para determinar si los neuroblastos que se generan en la SVZ, migran posteriormente al BO, administramos cinco pulsos de BrdU a tres grupos de cobayos, los que mantuvimos por 1, 5 o 10 días post-marcaje. Luego, realizamos un análisis de inmunolocalización con anti-BrdU en cortes frontales de los cerebros. Al día post-marcaje, observamos células BrdU positivas principalmente en la SVZ (Figura 14A) y muy pocas células a lo largo de la EVL (Figura 14B y C). A los 5 días post-marcaje, observamos una gran cantidad de células BrdU positivas distribuidas en la SVZ (Figura 14D), en la EVL



**Figura 13. Composición celular de la SVZ y de la EVL en cobayos de 6 y 12 meses de edad.**

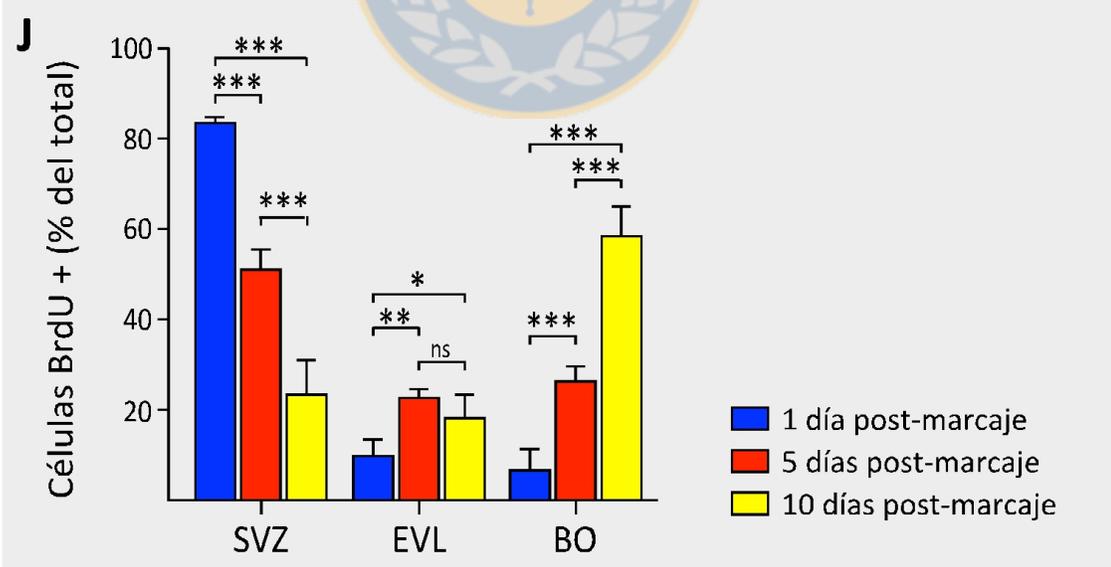
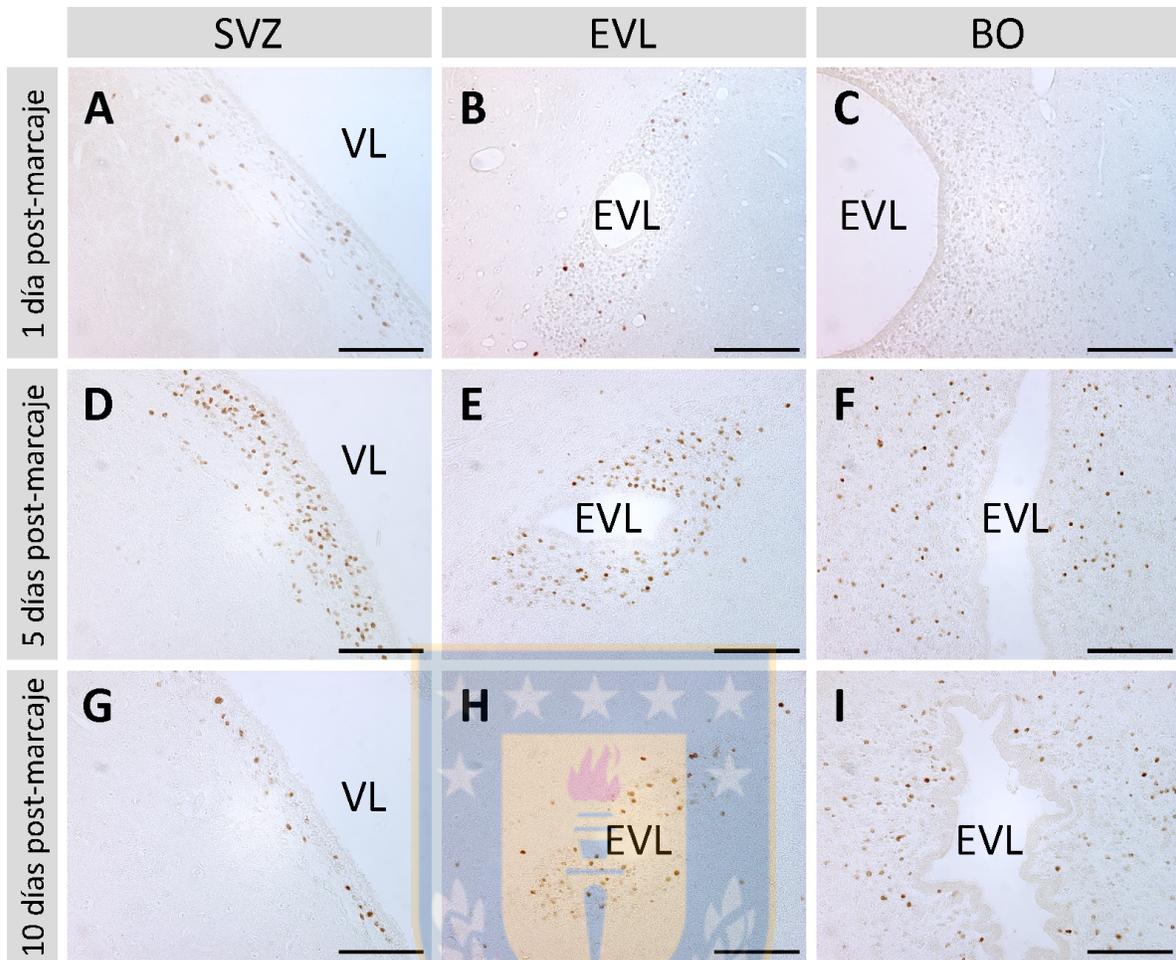
Cortes frontales de cerebro de cobayo adulto de 6 (A – F) y 12 (G – L) meses de edad fueron marcados con anti-vimentina (1:200) (A, G, D y J), anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000) (B, H, E y K) y anti-BrdU (1:500) (C, I, F y L). La cavidad ventricular de la EVL se mantuvo en animales viejos (D – F, J – L). Las células ependimarias revisten el VL (A y G) y la EVL (D y J) en animales viejos de igual manera a lo observado en animales jóvenes (1 mes de edad, figura). La cantidad de neuroblastos en la SVZ (B y H) y en la EVL (E y K) fue progresiva y dramáticamente reducida en cobayos viejos. Además, la cantidad de células proliferativas (células BrdU positivas) también se redujo en forma dramática en la SVZ (C y I) y en la EVL (F y L). Se cuantificó el número de neuroblastos (M) y el número de células BrdU positivas (N) en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayos adultos de 1, 6 y 12 meses de edad. En ambos casos, en neuroblastos y en células BrdU positivas, el número de células disminuye progresivamente en la SVZ y en la EVL a medida que aumenta la edad del animal. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3$  por edad. VL: ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. EVL: extensión del ventrículo lateral. Barra de aumento:  $50 \mu\text{m}$ .

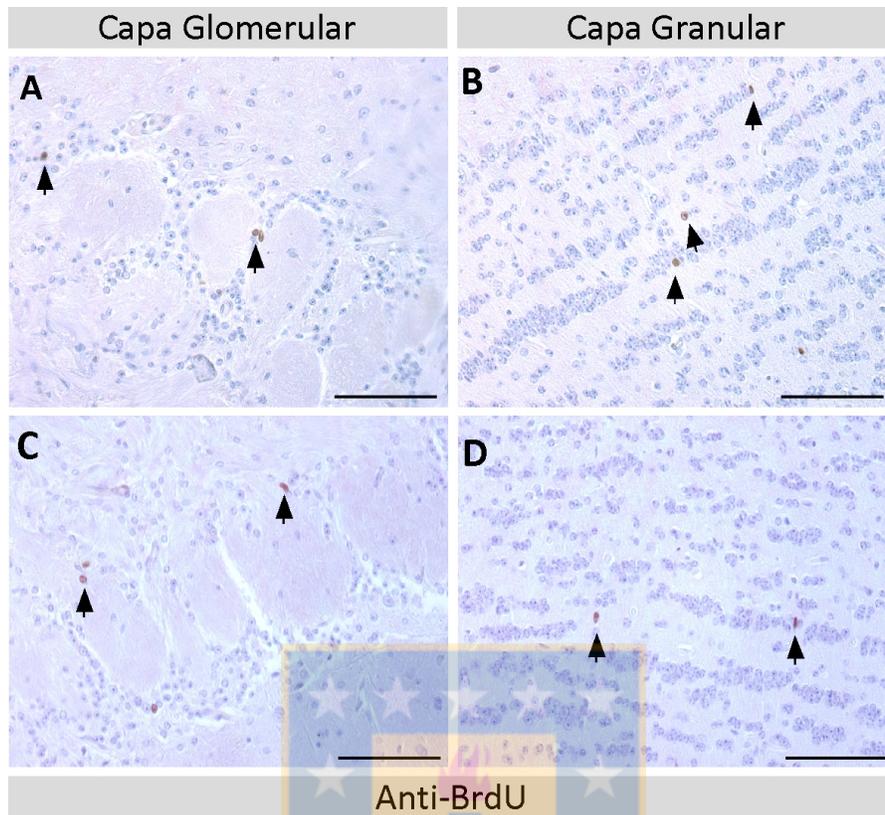
(Figura 14E) y en la EVL en el BO (Figura 14F). A los 10 días post-marcaje, observamos células BrdU positivas localizadas principalmente en la EVL en el BO (Figura 14I), y muy pocas células en la SVZ (Figura 14G). Confirmamos estos resultados mediante la cuantificación del número de células BrdU positivas en la SVZ, en la EVL y en la EVL en el BO y graficamos los datos como porcentaje del total de células BrdU positivas por animal (Figura 14J). Encontramos que el porcentaje de células BrdU positivas se redujo progresivamente en la SVZ y aumentó progresivamente en el BO a medida que trascurrieron los días después del marcaje con BrdU; sin embargo, en la EVL, el porcentaje de células BrdU positivas se mantuvo casi sin cambios (Figura 14F). Estos resultados muestran que los neuroblastos migran desde la SVZ (donde el porcentaje de células disminuye en el tiempo) hacia el BO (donde el porcentaje de células aumenta en el tiempo) y que la EVL en el cerebro de cobayo es una ruta migratoria (debido a que el porcentaje de células se mantiene en el tiempo). Posteriormente, analizamos el BO de los animales mantenidos hasta los 10 días post-marcaje y encontramos células BrdU positivas en la capa glomerular (Figura 15A y C, flechas) y la capa granular (Figura 15B y D, flechas) del BO. Este resultado sugiere que los neuroblastos que se generan en la SVZ del cerebro de cobayo dan origen a neuronas granulares y neuronas periglomerulares.



**Figura 14. Análisis de la migración de neuroblastos en el cerebro de cobayo adulto.**

Se inyectaron 5 pulsos de BrdU (50mg/Kg cada pulso) a tres grupos de cobayos, los que se analizaron a 1 (A – C), 5 (D – F) y 10 (G – I) días post-marcaje. Las células BrdU positivas fueron detectadas con el anticuerpo anti-BrdU (1:500). (A – C) A 1 día post-marcaje, las células BrdU positivas se observan principalmente en la SVZ (A) y pocas células BrdU positivas a lo largo de la EVL (B – C). (D – F) A 5 días post-marcaje, se observó una mayor cantidad de células BrdU positivas a lo largo de la EVL (E – F). (G – I) A los 10 días post-marcaje, se observó una menor cantidad de células en la SVZ (G) y una mayor cantidad en la EVL en el BO (I). (J) Se cuantificó el número de células BrdU positivas en la SVZ, en la EVL y en la EVL en el BO. El número de células BrdU positivas disminuyó progresivamente en la SVZ y aumento progresivamente en el BO al aumentar los días post-marcaje; sin embargo, en la EVL el número de células BrdU positivas prácticamente no varió, sugiriendo que los neuroblastos migran desde la SVZ hacia el BO a través de la EVL. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .  $n = 3$ . VL: ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. EVL: extensión del ventrículo lateral. BO: bulbo olfatorio. Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .





**Figura 15. Análisis del destino de neuroblastos generados la SVZ del cerebro de cobayo adulto.**

Se inyectaron 5 pulsos de BrdU (50mg/Kg cada pulso) a un grupo de cobayos, los que fueron analizados luego de 10 días después del marcaje. Las células BrdU positivas fueron detectadas con el anticuerpo anti-BrdU (1:500). Observamos que las células BrdU positivas se localizan en las capas glomerular (**A** y **C**) y granular (**B** y **D**) del BO, lo que sugiere que los neuroblastos generados en la SVZ dan origen a neuronas periglomerulares (**A** y **C**) y neuronas granulares (**B** y **D**). Barra de aumento: 100  $\mu$ m.

## **5.2. Capítulo 2. Estudio del efecto de la deficiencia en vitamina C en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo adulto.**

Existen numerosos estudios que involucran a la vitamina C como un modulador de la diferenciación y de la neurogénesis; sin embargo, se desconoce el efecto que tiene esta molécula en el nicho neurogénico localizado en la SVZ del cerebro adulto. A continuación, analizamos cuál es el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre la neurogénesis que se lleva a cabo en la SVZ, también incluyendo en el análisis, a la EVL. Este estudio se realizó utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia, además de marcaje *in vivo* con BrdU y análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión.

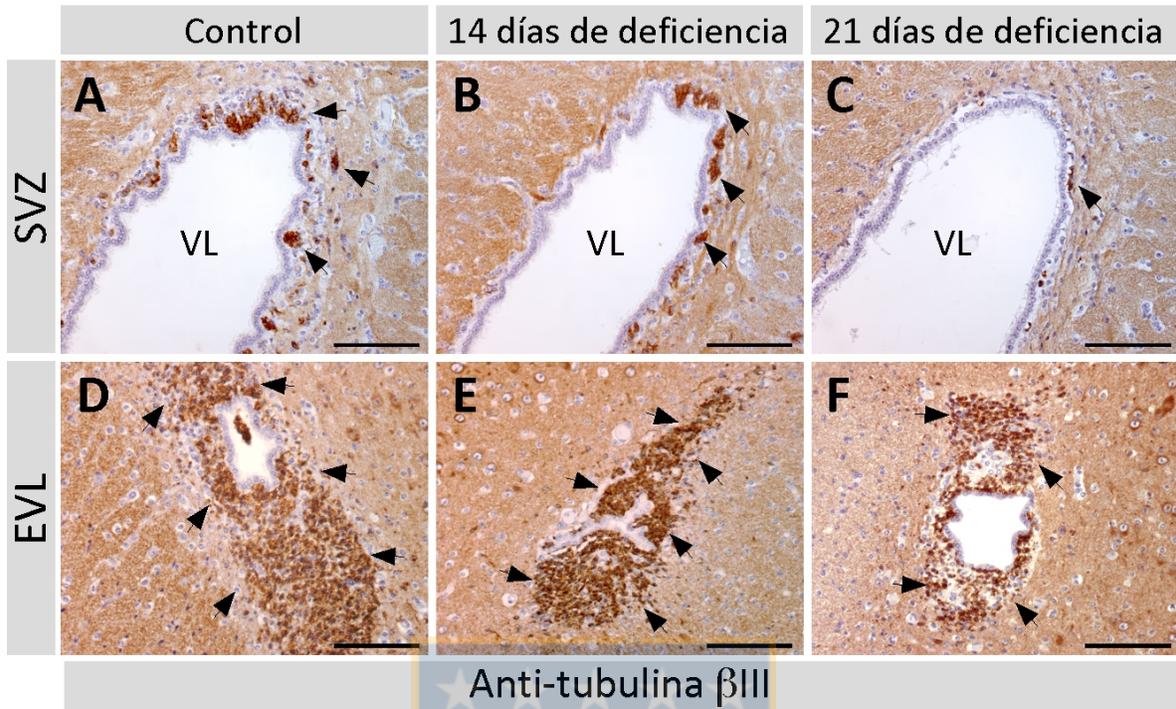
### **5.2.1. La deficiencia en vitamina C en cobayos adultos induce una disminución en la cantidad de neuroblastos y de células proliferativas en la SVZ y en la EVL.**

Para determinar si la deficiencia en vitamina C afecta la génesis de neuroblastos en la SVZ y la presencia de éstos en la EVL, realizamos un análisis de inmunolocalización utilizando el marcador de neuroblastos, anti-tubulina  $\beta$ III, en cortes frontales de la SVZ y de la EVL de un animal control, de un animal con 14 días de deficiencia en vitamina C y de un animal con 21 días de deficiencia en vitamina C. En la SVZ, observamos que los neuroblastos se localizan en el área subependimaria (Figura 16A, B y C, flechas), como fue descrito previamente, y que la cantidad de éstos se redujo progresivamente a medida que aumentaron los días de deficiencia en vitamina C (Figura 16A, B y C, flechas). En la EVL, los resultados fueron similares, los neuroblastos mantienen su localización subependimaria;

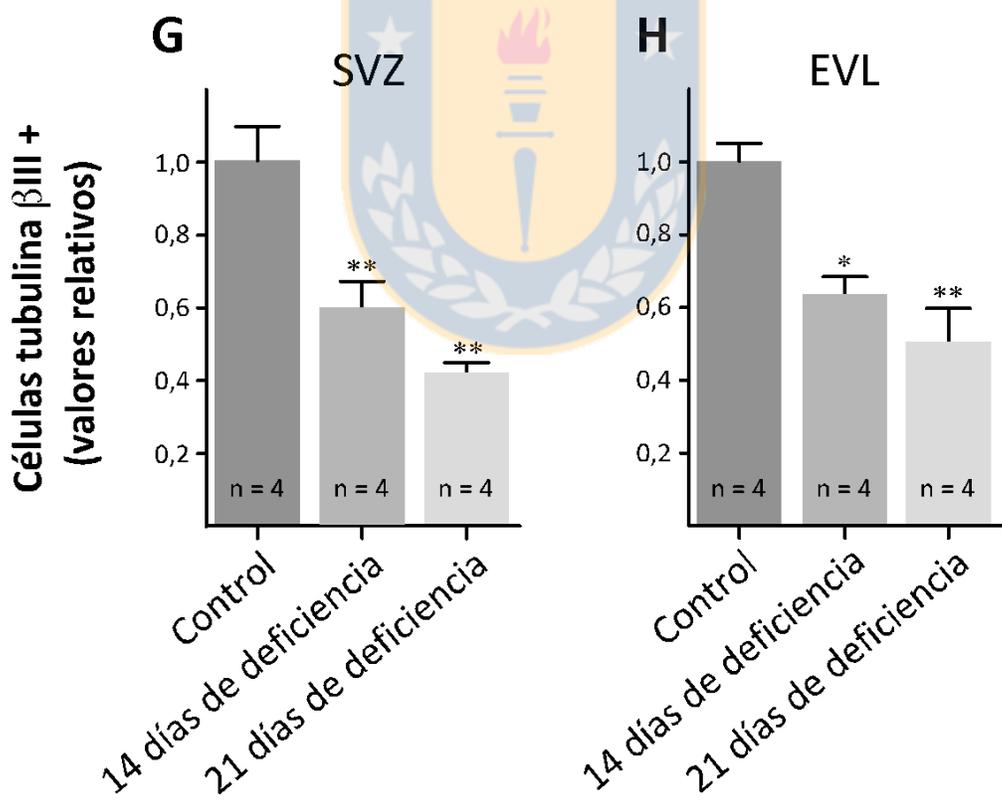


**Figura 16. Detección de neuroblastos en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.**

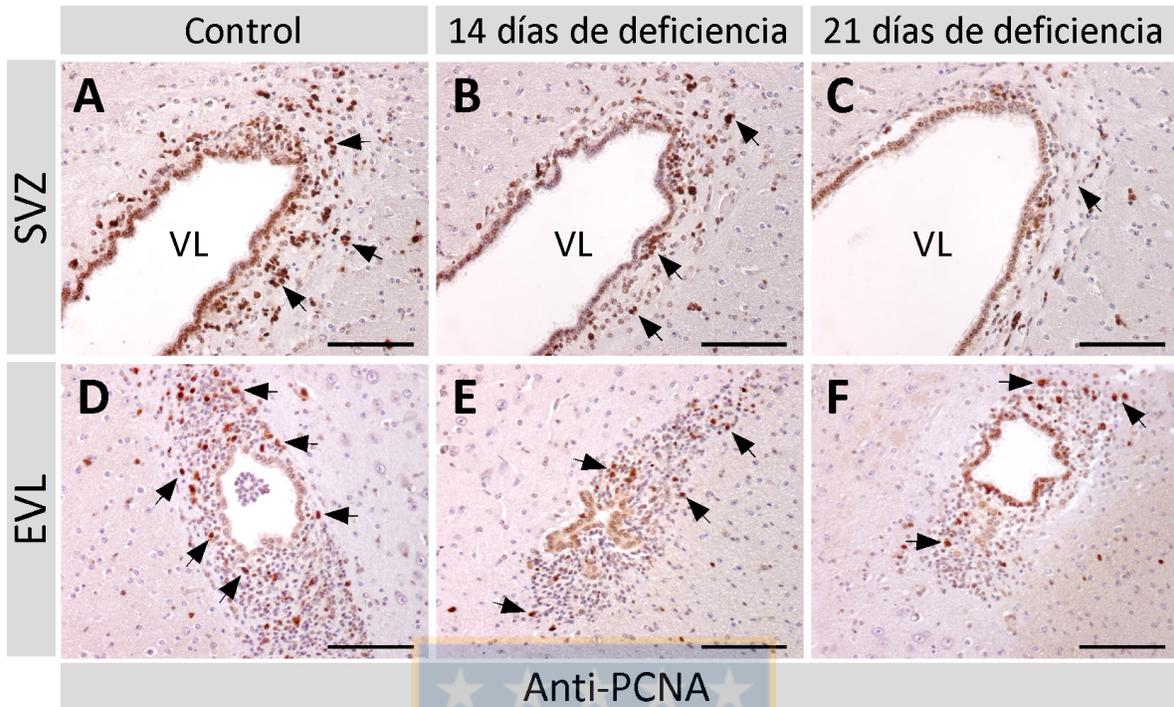
Cortes frontales de cerebro de cobayo control (**A** y **D**) y de cerebro de cobayo con 14 (**B** y **E**) y 21 (**C** y **F**) días de deficiencia en vitamina C, marcados con anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000). Los neuroblastos en la SVZ (**A** – **C**) y en la EVL (**D** – **F**) disminuyeron progresivamente a medida que aumentaron los días de deficiencia en vitamina C (flechas). (**G** y **H**) Los neuroblastos fueron cuantificados en la SVZ (**G**) y en la EVL (**H**) de animales control y animales con deficiencia en vitamina C. El número de neuroblastos disminuyó en forma progresiva desde el animal control hasta el animal con 21 días de deficiencia tanto en la SVZ como en la EVL. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola y el post-test Bonferroni \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 12$ . VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. Barra de aumento:  $100 \mu\text{m}$ .



Anti-tubulina  $\beta$ III



sin embargo, la cantidad de éstos disminuye progresivamente a medida que aumentaron los días de deficiencia en vitamina C (Figura 16D, E y F, flechas). Para confirmar estas observaciones, cuantificamos el número de neuroblastos en la SVZ (Figura 16G) y en la EVL (Figura 16H) en las tres situaciones experimentales. Encontramos, tanto en la SVZ como en la EVL, que la disminución de neuroblastos es progresiva y significativa a medida que aumentaron los días de deficiencia en vitamina C y que en cobayos con 21 días de deficiencia esta disminución alcanza el  $41,67 \pm 0,05\%$  en la SVZ (Figura 16G) y el  $49,92 \pm 0,19\%$  en la EVL (Figura 16H). Para determinar si la disminución de neuroblastos en animales deficientes en vitamina C se relaciona con una disminución de las células proliferativas, se realizó un análisis de inmunolocalización con el marcador anti-PCNA para detectar las células proliferativas en cortes frontales de la SVZ y en la EVL de cerebros de cobayos deficientes en vitamina C. En la SVZ, observamos que las células PCNA positivas se localizan en el área subependimaria (Figura 17A, flechas) y que la cantidad de ellas, al igual que lo observado con los neuroblastos, disminuye progresivamente a medida que aumentan los días de deficiencia en vitamina C (Figura 17A, B y C, flechas). En la EVL, también observamos una disminución de las células PCNA positivas en animales deficientes en vitamina C (Figura 17D, E y F). Para corroborar las observaciones con el marcador anti-PCNA, realizamos un marcaje *in vivo* con BrdU para detectar en forma específica células en la fase S del ciclo celular. Luego, realizamos un análisis de inmunolocalización en cortes frontales de la SVZ y de la EVL de cerebros de cobayos deficientes en vitamina C y cuantificamos el número de células BrdU positivas presentes en estas áreas. Observamos que tanto en la SVZ (Figura 18A, B y C) como en la EVL (Figura 18D, E y F) la cantidad de células BrdU positivas disminuye en los animales deficientes en vitamina C. Mediante la cuantificación, encontramos que en la SVZ hay una



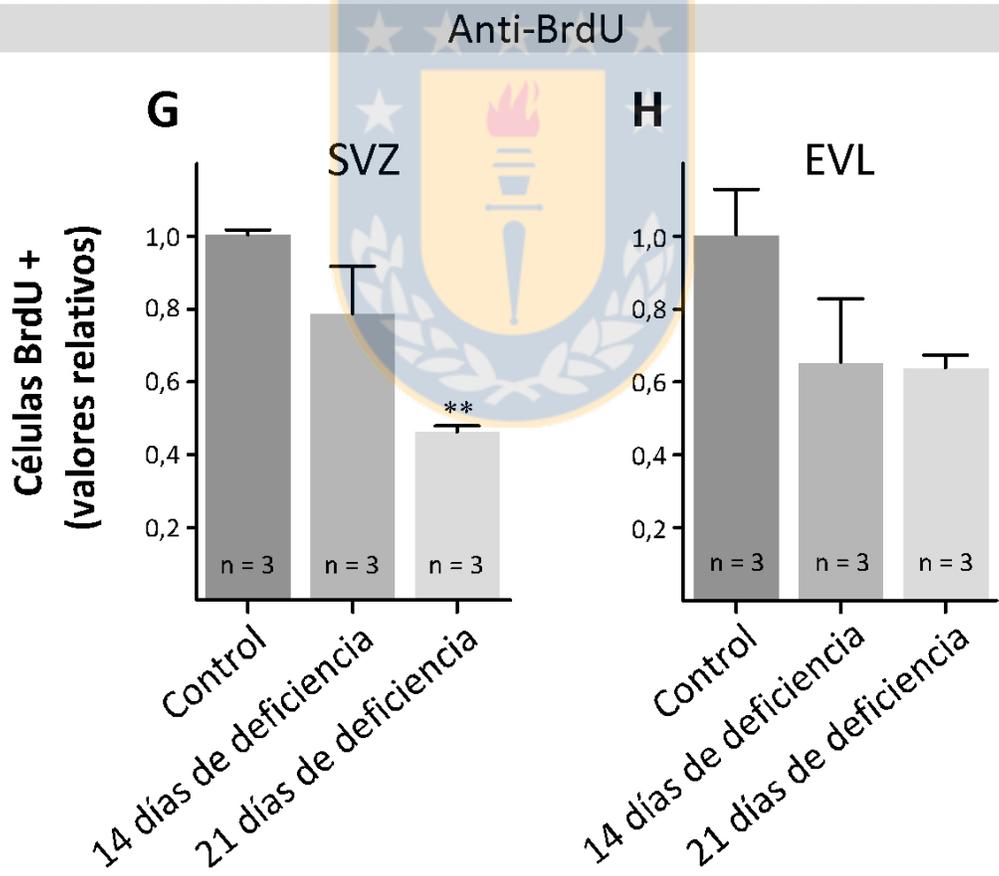
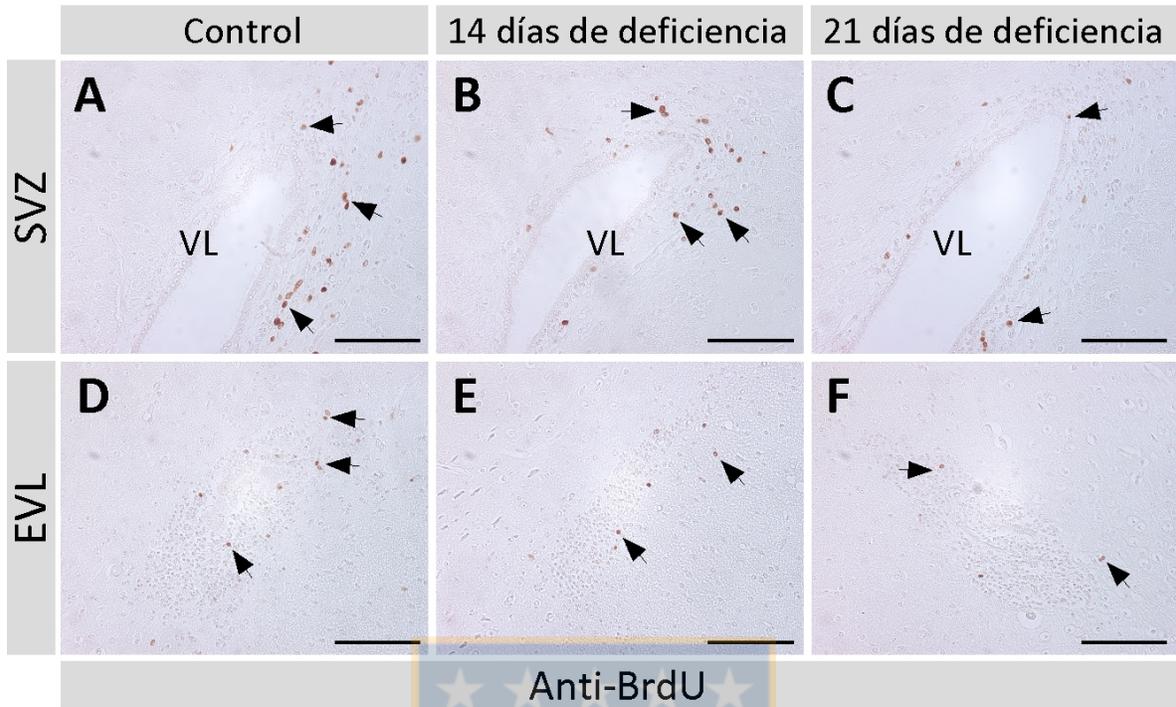
**Figura 17. Detección de las células PCNA positivas (células tipo B y tipo C) en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.**

Cortes frontales de cerebro de cobayo control (A y D) y de cerebro de cobayo con 14 (B y E) y 21 (C y F) días de deficiencia en vitamina C, marcados con anti-PCNA (1:100) como marcador de proliferación. (A – C) En la SVZ, las células PCNA positivas (flechas) disminuyeron en forma progresiva a medida que aumentaron los días de deficiencia en vitamina C. (D – F) En la EVL, las células PCNA positivas (flechas) disminuyeron en cobayos con deficiencia en vitamina C (E y F). VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. n = 12. Barra de aumento: 100  $\mu$ m.



**Figura 18. Detección de las células BrdU positivas (células tipo B y tipo C) en el cerebro de cobayos adultos deficientes en vitamina C.**

Cortes frontales de cerebro de cobayo control (**A** y **D**) y de cerebro de cobayos de 14 (**B** y **E**) y 21 (**C** y **F**) días de deficiencia en vitamina C, marcados con anti-BrdU (1:200) como marcador de proliferación. (**A – C**) Muchas células BrdU positivas se observan en la SVZ de un cobayo control (**A**), pero disminuyen en forma progresiva en cobayos de 14 (**B**) y 21 (**C**) días en deficiencia en vitamina C (flechas). (**D – F**) Pocas células BrdU positivas se observan en la EVL de cobayos control (**D**) y aún menos en la EVL de cobayos con deficiencia en vitamina C (**E** y **F**) (flechas). (**G** y **H**) Las células BrdU positivas se cuantificaron en la SVZ (**G**) y en la EVL (**H**) de cobayos control y con deficiencia en vitamina C. El número de células BrdU positivas disminuyó en cobayos con deficiencia en vitamina C. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando el test ANOVA de una cola y el post-test de Bonferroni, \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 9$ . VL: ventrículo lateral. EVL: extensión del ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular. Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .



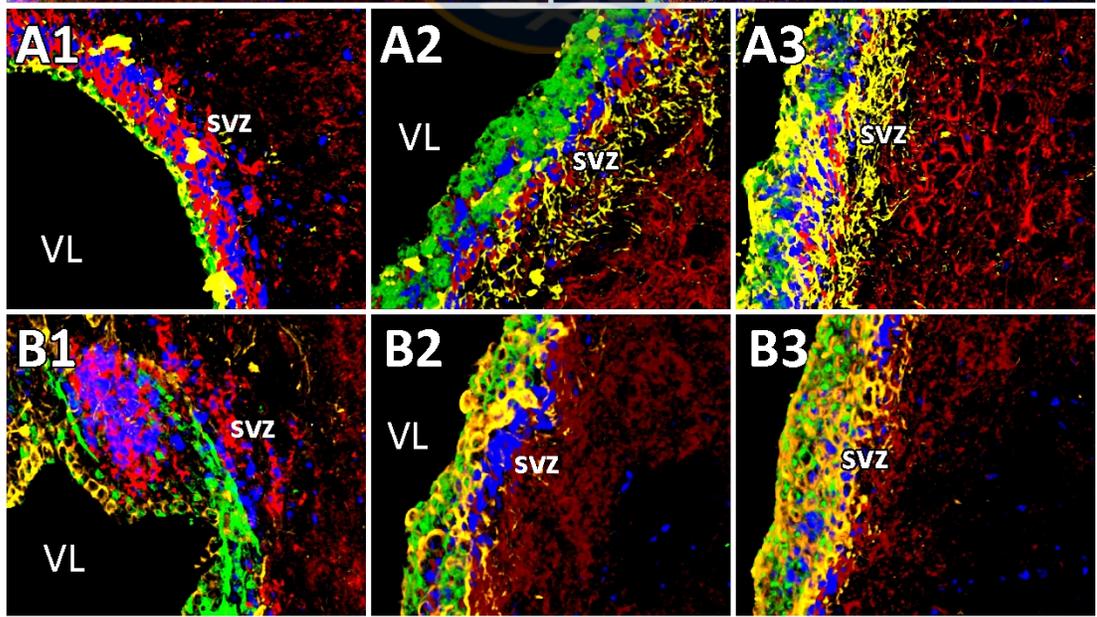
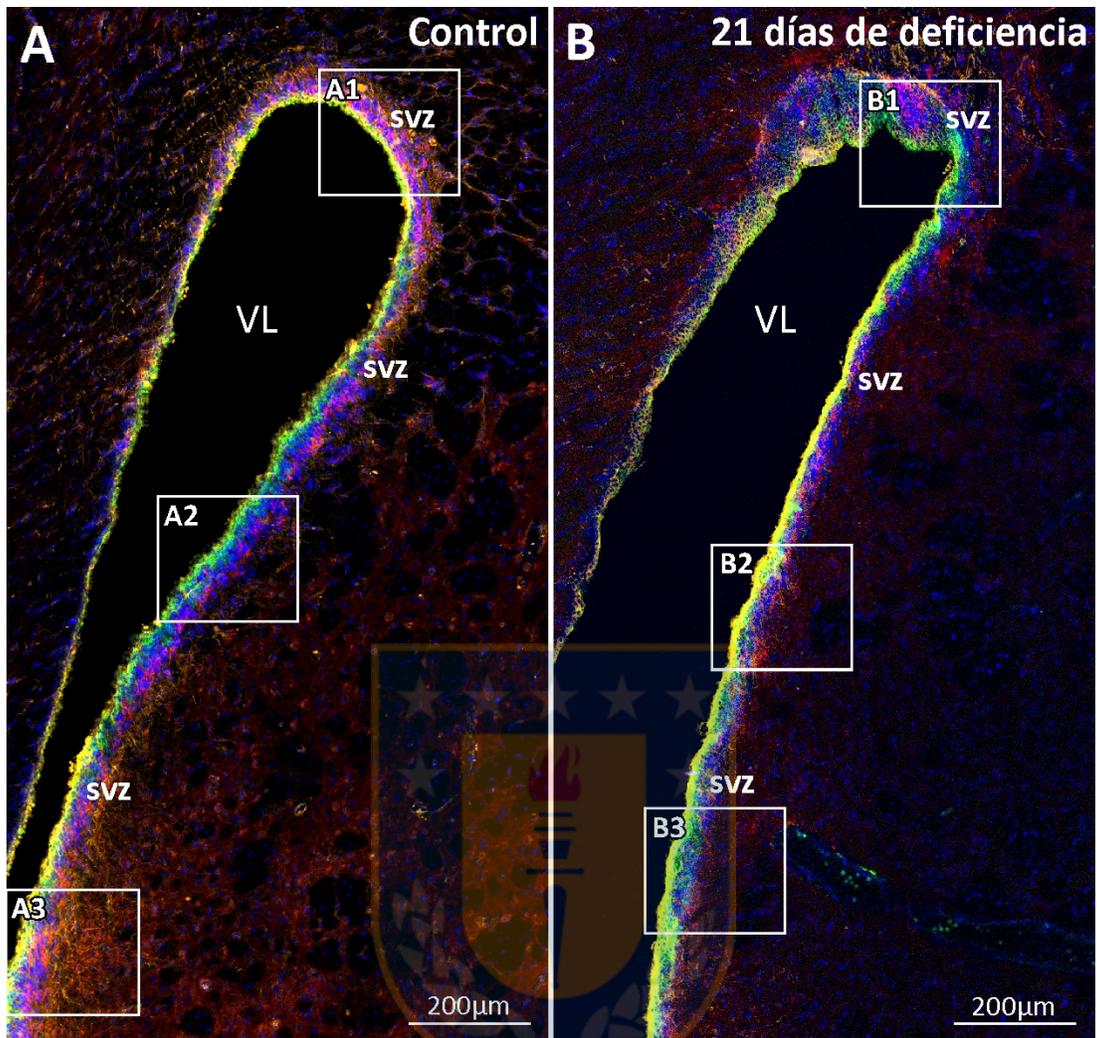
disminución significativa de las células BrdU positivas a los 21 días de deficiencia en vitamina C (Figura 18G), mientras que en la EVL, encontramos que existe una tendencia a la disminución de las estas células en animales con deficiencia (Figura 18H).

Posteriormente, para definir si la deficiencia en vitamina C provoca alteraciones en la distribución celular de la SVZ en el cerebro de un cobayo, se realizó un análisis de inmunofluorescencia en cortes frontales de la SVZ del cerebro de un animal control y de un animal con 21 días de deficiencia en vitamina C, utilizando múltiples marcadores, anti-tubulina  $\beta$ III para detectar neuroblastos, anti-vimentina para detectar células endoteliales y células gliales, isolectina B4 para detectar células endoteliales y Hoechst para detectar núcleos y luego, se realizaron proyecciones en tres dimensiones (3D) en el plano Z utilizando un microscopio confocal espectral (Figura 19). Con bajo aumento, observamos que la inmunorreacción de anti-vimentina fue más pareja a lo largo de la SVZ del cerebro de cobayo con 21 días de deficiencia en vitamina C (Figura 19B, en amarillo) en comparación a la SVZ control (Figura 19A, en amarillo). También observamos que los neuroblastos se localizan principalmente en el área dorsal del VL (Figura 19A1 y B1, en rojo); sin embargo, en la SVZ del cobayo control también observamos neuroblastos en el área medial (Figura 19A2) y en el área ventral del VL (Figura 19A3), mientras que no observamos neuroblastos en estas dos regiones en la SVZ del cobayo con deficiencia en vitamina C (Figura 19B2 y B3). Adicionalmente, también realizamos el mismo análisis en la EVL (Figura 20A y B) y observamos una diferencia importante en la densidad de neuroblastos que se organizan alrededor de la cavidad ventricular (Figura 20A2 y B2), siendo mucho menor en cobayos con 21 días de deficiencia en vitamina C (Figura 20B2). Por otro lado, también fue posible observar una diferencia en la cantidad de células gliales entre la dos condiciones (Figura 20A1 y B1).



**Figura 19. Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la SVZ del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.**

Proyecciones en el eje Z, reconstrucción en 3D y *tile scanning*, usando múltiples marcadores, anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000), anti-vimentina (1:100), isolectina B4 (1:10) y Hoechst 33258 (1:1000). (A) Distribución glial y neuronal de la SVZ de un cobayo control. (A1 – A3) Mayor aumento del área dorsal (A1), medial (A2) y ventral (A3) del VL en la imagen (A). (B) Distribución glial y neuronal de la SVZ de un cobayo con 21 días de deficiencia en vitamina C. (B1 – B3) Mayor aumento del área dorsal (B1), medial (B2) y ventral (B3) del VL en la imagen (B); se observó que la distribución de las células gliales fue diferente en comparación con el control y que la cantidad de neuroblastos (rojo) en las tres áreas analizadas fue menor. VL: ventrículo lateral. SVZ: zona subventricular.

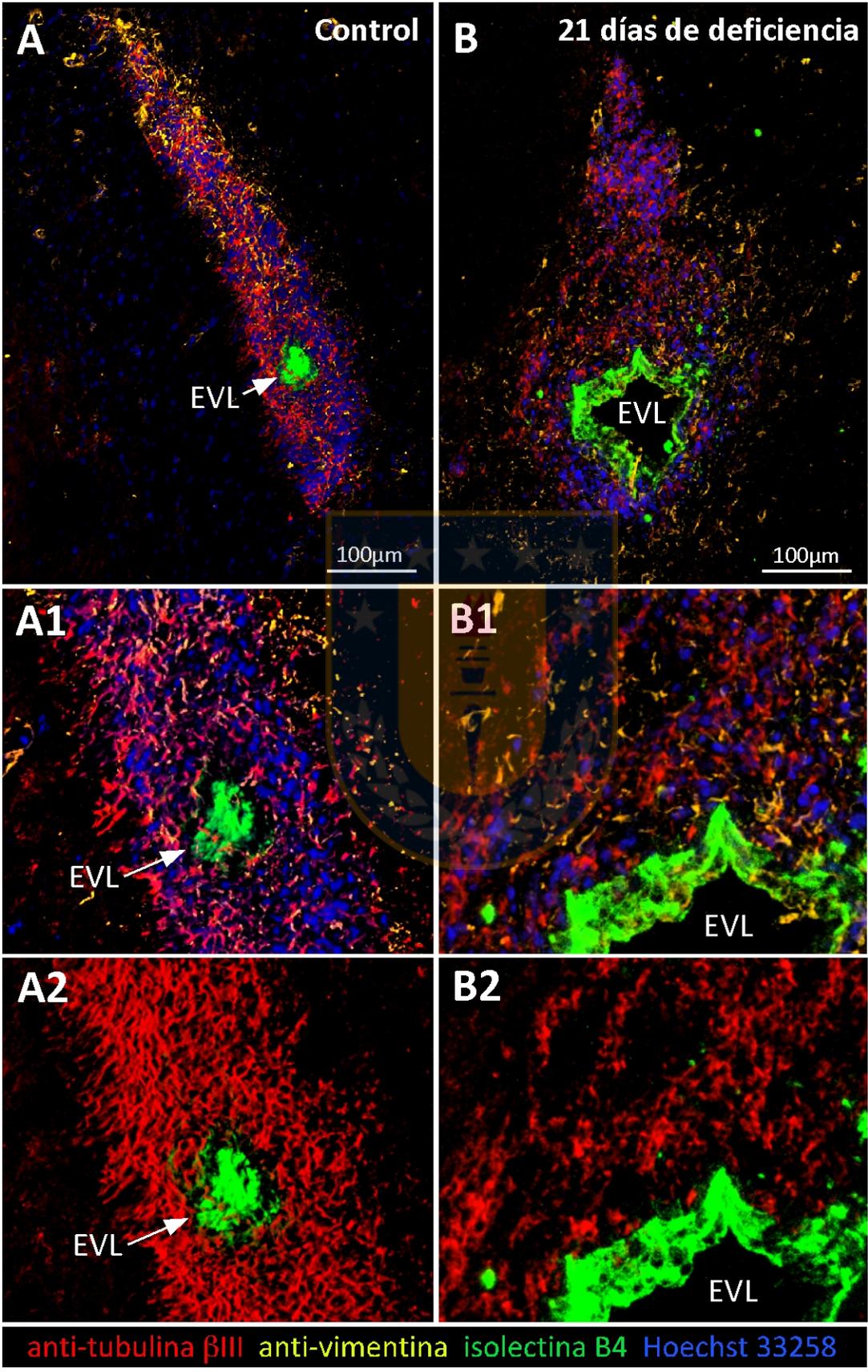


anti-tubulina  $\beta$ III anti-vimentina isolectina B4 Hoechst 33258



**Figura 20. Análisis confocal espectral de la distribución neuronal y glial en la EVL del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.**

Proyecciones en el eje Z, reconstrucción en 3D y *tile scanning*, usando múltiples marcadores, anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000), anti-vimentina (1:100), isolectina B4 (1:10) y Hoechst 33258 (1:1000). **(A)** Distribución de células gliales y neuronales en la EVL del cerebro de un cobayo control. **(A1)** Mayor aumento de la EVL en la imagen (A). **(A2)** Imagen (A1) sin marca para núcleos y células gliales. **(B)** Distribución glial y neuronal en la EVL del cerebro de un cobayo con 21 días de deficiencia en vitamina C. **(B1)** Mayor aumento de la EVL en la imagen (B). **(B2)** Imagen (B1) sin marca para núcleos y células gliales; se observó que la densidad de los neuroblastos (rojo) fue mucho menor que en el control; sin embargo, la cantidad de células gliales (amarillo) fue similar. EVL: extensión del ventrículo lateral.



Para demostrar que la disminución de neuroblastos no se encuentra restringida a un área en particular, sino más bien se observa a lo largo de toda SVZ o a lo largo de toda la EVL, tomamos un corte (7  $\mu\text{m}$ ) cada 5 cortes desde el seriado de un cobayo control y desde el seriado de un cobayo con deficiencia en vitamina C, y de esta manera, reconstruimos en tres dimensiones una región de 560  $\mu\text{m}$  de longitud de la EVL. Posteriormente, realizamos un análisis de inmunolocalización en los cortes seleccionados utilizando anti-tubulina  $\beta\text{III}$  para marcar los neuroblastos, y por último, apilamos y reconstruimos las imágenes obtenidas utilizando el *software* IMARIS® (Figura 21). Con este experimento corroboramos que efectivamente la disminución de neuroblastos se observa a lo largo de toda la EVL en el cerebro de cobayos con deficiencia en vitamina C (Figura 21F, G y H) al comparar con la EVL del animal control (Figura 21B, C y D). Adicionalmente, al cuantificar las áreas de inmunorreacción positivas para tubulina  $\beta\text{III}$  en cada plano en ambas condiciones, encontramos que en promedio las áreas positivas para tubulina  $\beta\text{III}$  son un 55,37% menor en el animal con deficiencia en vitamina C con respecto al control (Figura 21I), resultado que reproduce las cuantificaciones del número de neuroblastos en la Figura 16.

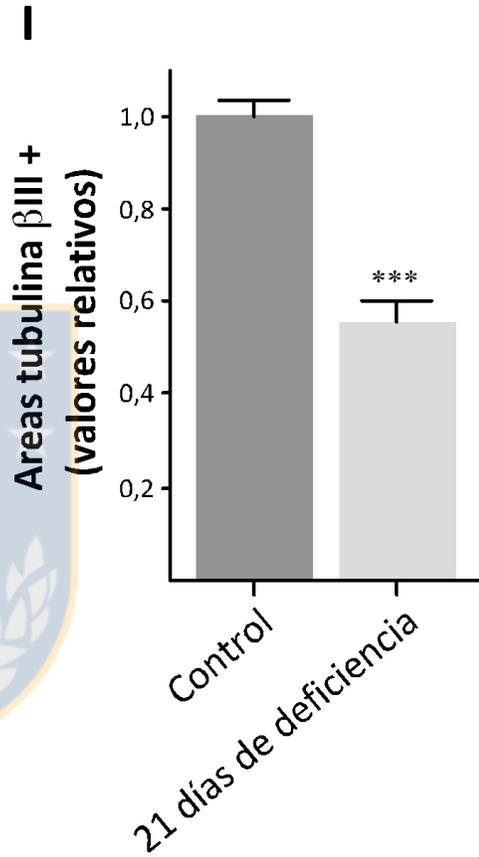
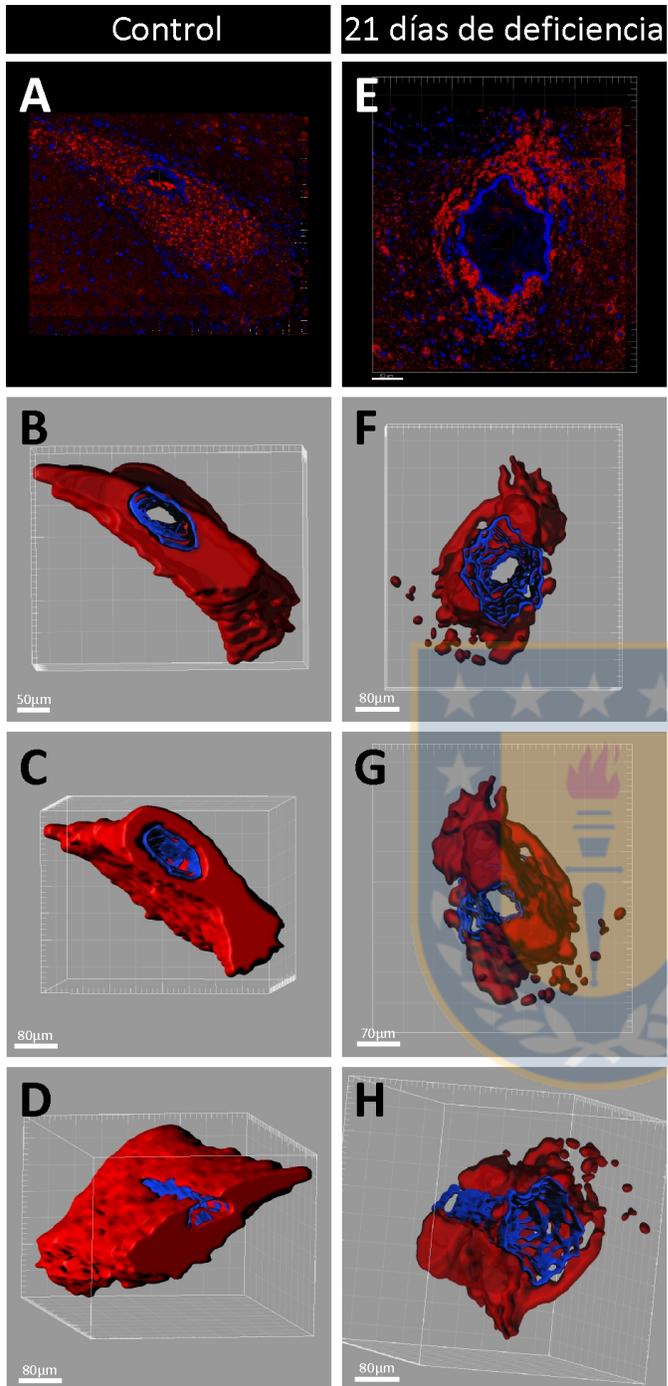
### **5.2.2. La deficiencia en vitamina C altera la morfología de células, y la localización y composición celular en la SVZ y en la EVL de cerebro de cobayo adulto.**

Para determinar si la deficiencia en vitamina C provoca alteraciones en la morfología de las células del nicho neurogénico o en la citoarquitectura de la SVZ o EVL, estudiamos y comparamos por microscopía electrónica de transmisión, la ultraestructura de la SVZ y de la EVL del cerebro de cobayos control y cobayos con deficiencia en vitamina C.



**Figura 21. Reconstrucción en tres dimensiones del área ocupada por los neuroblastos en la EVL de un cobayo control y uno con 21 días de deficiencia en vitamina C.**

Reconstrucción en 3D de 16 cortes frontales apiladas, marcadas con el anticuerpo anti-tubulina  $\beta$ III (rojo, 1:1000) y hematoxilina (azul). Cada corte tiene 7  $\mu$ m de grosor y está separado del corte siguiente por 28  $\mu$ m, reconstruyéndose, de esta forma, una región de 560  $\mu$ m por medio del *software* IMARIS®. (A) Cortes originales de la EVL de un cobayo control apilados. (B – D) Diferentes ángulos del resultado del apilamiento de la imagen (A) reconstruido en 3D. (E) Cortes originales de la EVL de un cobayo con 21 días de deficiencia en vitamina C apilados. (F – H) Diferentes ángulos del resultado del apilamiento de la imagen (E) reconstruido en 3D. (I) Las áreas anti-tubulina  $\beta$ III positivas de la EVL se midieron usando el *software* IMARIS®. Las áreas en la EVL de un cobayo con 21 días de deficiencia en vitamina C disminuyeron a un 55,37% del control. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó usando el test Wilcoxon, \*\*\* P < 0,001.

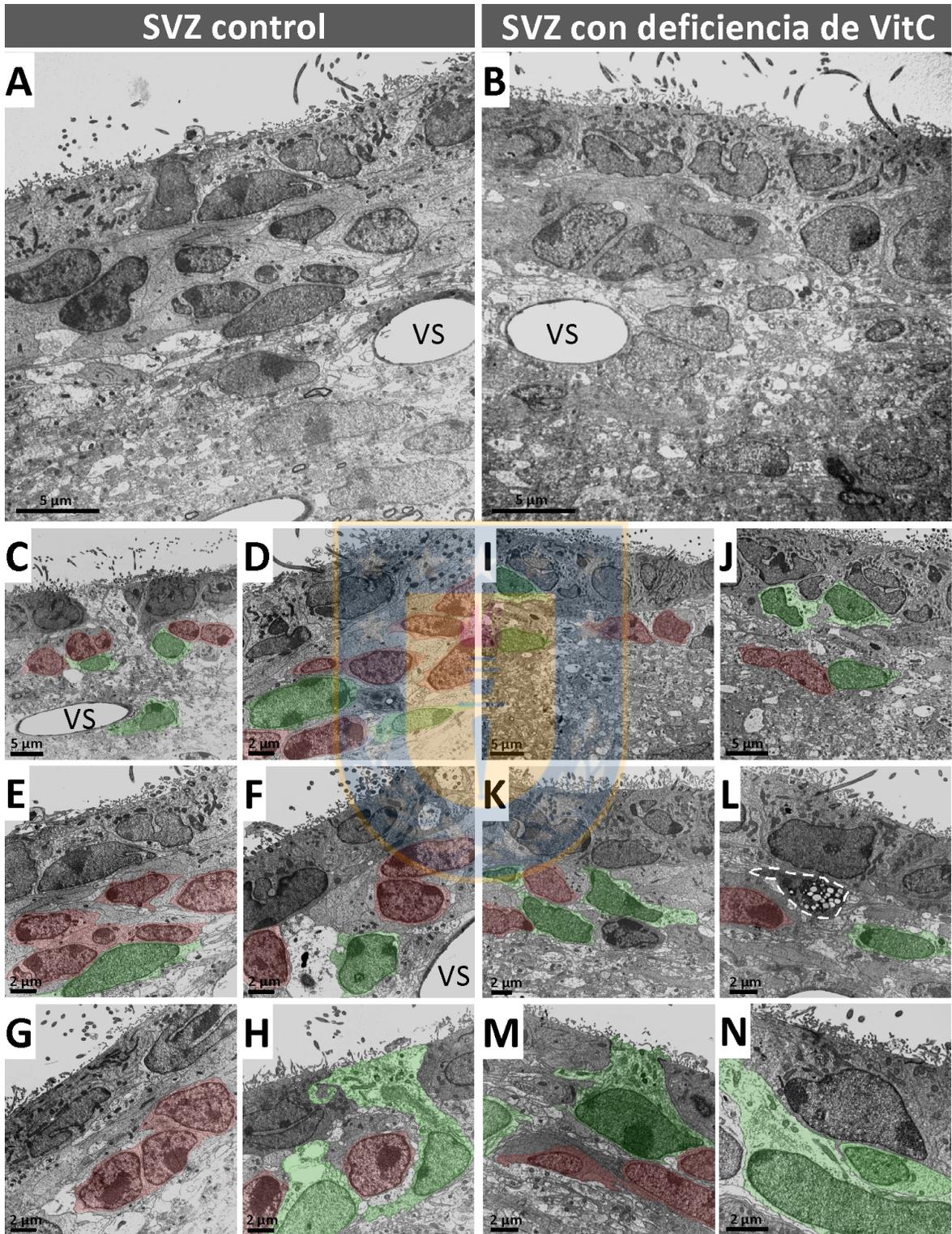


Tal como fue descrito previamente en la sección 1.3., los diferentes tipos celulares presentes en la SVZ y en la EVL fueron identificados de acuerdo a sus características ultraestructurales, tanto en el cerebro de cobayos control como en el cerebro cobayos con deficiencia en vitamina C. De esta forma, en la SVZ control identificamos a las células endoteliales por la presencia de cilios y microvellosidades en su superficie apical, por su núcleo irregular y su citoplasma electrón-denso (Figura 22C – H); identificamos a los neuroblastos por su núcleo heterocromático y su escaso citoplasma electrón-denso (Figura 22C – H, células en rojo); e identificamos a los astrocitos por su núcleo eucromático y su citoplasma electrón-lúcido (Figura 22C – H, células en verde); las células de tipo C se identificaron por su citoplasma electrón-lúcido y su núcleo grande e irregular con numerosos cúmulos pequeños de cromatina condensada; sin embargo, no encontramos células tipo C en las imágenes seleccionadas para la figura. Ahora bien, al comparar la SVZ control y la SVZ del animal con deficiencia en vitamina C, observamos que no existen grandes diferencias en cuanto a la morfología de las células. En la SVZ deficiente (Figura 22B, I – N), las células endoteliales mantienen sus cilios y microvellosidades apicales, y sus núcleos se observan tan irregulares como en la SVZ control, y los neuroblastos (Figura 22I – N, células en rojo) y los astrocitos (Figura 22I – N, células en verde) también mantienen sus características ultraestructurales distintivas. En relación a la citoarquitectura de la SVZ de animales deficientes, observamos que aún cuando las diferentes células de la SVZ mantienen su localización característica, la cantidad de células formando parte de la arquitectura celular es evidentemente menor al comparar con el control (Figura 22B, I – N). Observamos que el tipo celular que disminuye en la SVZ de animales deficientes en vitamina C, es el neuroblasto, mientras que la cantidad de astrocitos y de células endoteliales se mantiene sin variaciones.



**Figura 22. Análisis ultraestructural de la SVZ de cerebros de cobayos deficientes en vitamina C.**

(A, C – H) Cortes ultrafinos de la SVZ del cerebro de un cobayo control; se distinguen la línea de células endoteliales ciliadas y diferentes tipos celulares en el área subependimaria (A). Las células endoteliales presentan cilios y microvellosidades apicales, un núcleo irregular y un citoplasma electrón-denso (C – H). En la zona subependimaria, los neuroblastos (en rojo) poseen un núcleo heterocromático y un citoplasma escaso y electrón-denso (C – H); los astrocitos (en verde) poseen un núcleo eucromático, un citoplasma electrón-lúcido y con frecuencia hacen contacto con el ventrículo (C – H); las células de tipo C no se observan en este set de imágenes. (B, I – N) Cortes ultrafinos de la SVZ de un cerebro de cobayo con deficiencia en vitamina C; la distribución de las células fue similar a la SVZ control; sin embargo, las cantidades de éstas fueron alteradas. Se observa una reducción de la cantidad de neuroblastos al comparar con el control y, por lo consiguiente, las células subependimarias son principalmente astrocitos (I – N). Sin embargo, se observaron menos astrocitos haciendo contacto con el ventrículo (I – N). Célula apoptótica (línea discontinua) (L). LV: ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo.

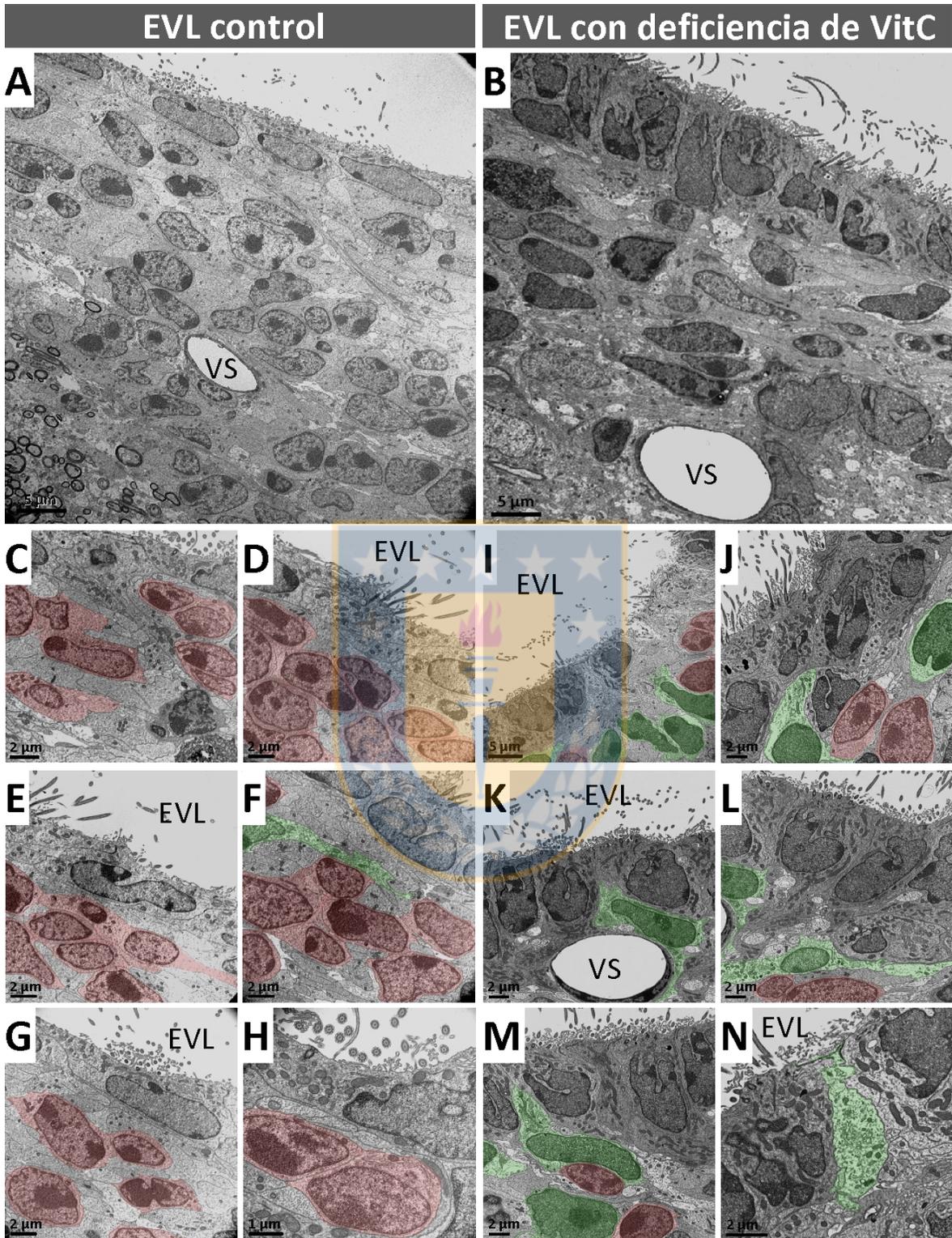


A continuación, finalizamos nuestro análisis utilizando la microscopía electrónica de transmisión, comparando la ultraestructura de la EVL del cerebro de cobayos control y cobayos con deficiencia en vitamina C. De la misma forma que se realizó para la SVZ, identificamos las diferentes células que forman parte de la EVL de acuerdo a sus características ultraestructurales descritas antes. De esta forma, a diferencia de lo observado en la SVZ, al comparar la EVL en ambas condiciones, encontramos importantes diferencias en cuanto a la morfología de las células. En la EVL de animales deficientes en vitamina C, observamos que las células endimarias presentan un forma cúbica y un núcleo muy irregular (Figura 23B, I – N), mientras que en la EVL control las células endimarias se presentan con una forma más plana y con un núcleo más regular (Figura 23A, C – H). En el área subependimaria, la morfología de las células también varía, observándose núcleos con tamaño y forma más regular en la EVL control (Figura 23A, C – H) en comparación a la EVL de un animal deficiente en vitamina C (Figura 23B, I – N). En la citoarquitectura de la EVL de animales deficientes también encontramos importantes variaciones al comparar con la citoarquitectura de la EVL control. Primero, observamos una gran disminución en la cantidad de neuroblastos en la EVL de animales deficientes (Figura 23B, I – N, células en rojo), mientras que los astrocitos parecieron aumentar su número (Figura 23B, I – N, células en verde). Esta variación en la cantidad de células tiene como consecuencia un variación en la localización de estas células en el área subependimaria, mientras que en la EVL control son los neuroblastos lo que se localizan justo por debajo de la línea de células endimarias (Figura 23A, C – H, células en rojo), en la EVL de un animal deficiente en vitamina C observamos que son los astrocitos los que toman esta ubicación (Figura 23B, I – N, células en verde). Estos resultados en conjunto, demuestran la importancia de la vitamina C en el proceso neurogénico y en la mantención de la citoarquitectura de los nichos neurogénicos.



**Figura 23. Análisis ultraestructural de la EVL del cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.**

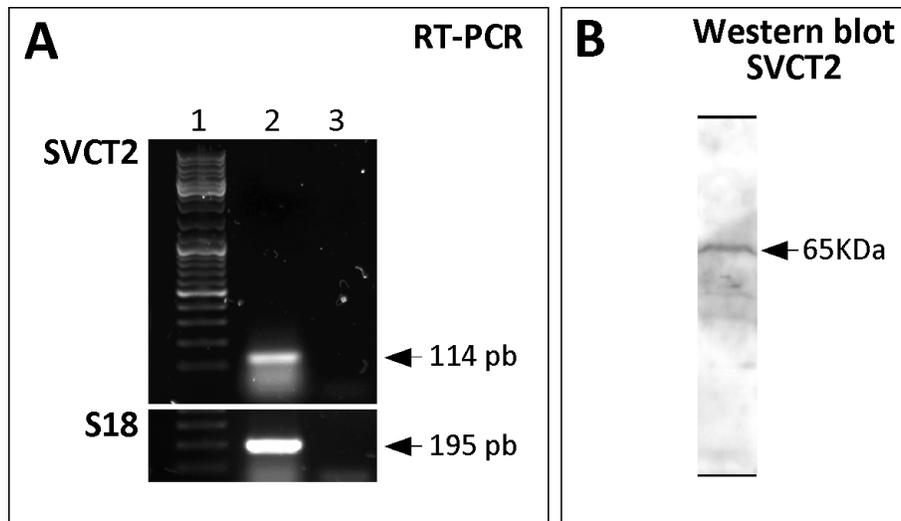
(**A, C – H**) Cortes ultrafinos de la EVL del cerebro de un cobayo control; se distinguen la línea de células endimarias ciliadas y una gran cantidad de células en el área subependimaria (**A**). Los neuroblastos (en rojo) y los astrocitos (en verde) presentan una morfología similar a la descrita en la SVZ control; sin embargo, el núcleo de las células endimarias es más regular en la EVL (**C – H**) en comparación a la SVZ control. La mayoría de las células subependimarias corresponden a neuroblastos (**C – H**). (**B, I – N**) Cortes ultrafinos de la EVL de un cerebro de cobayo con deficiencia en vitamina C; la distribución de células fue similar a la LVE control; sin embargo, la cantidad de células se redujo dramáticamente y la morfología de los núcleos de las células endimarias está alterada en forma considerable (**I – N**). El tipo de celular que se redujo fueron los neuroblastos (células en rojo), mientras que el número de astrocitos (células en verde) aumentó (**I – N**). EVL: extensión del ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo.



### **5.2.3. El transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayo, y su expresión a nivel de mensajero aumenta en cobayos deficientes de vitamina C.**

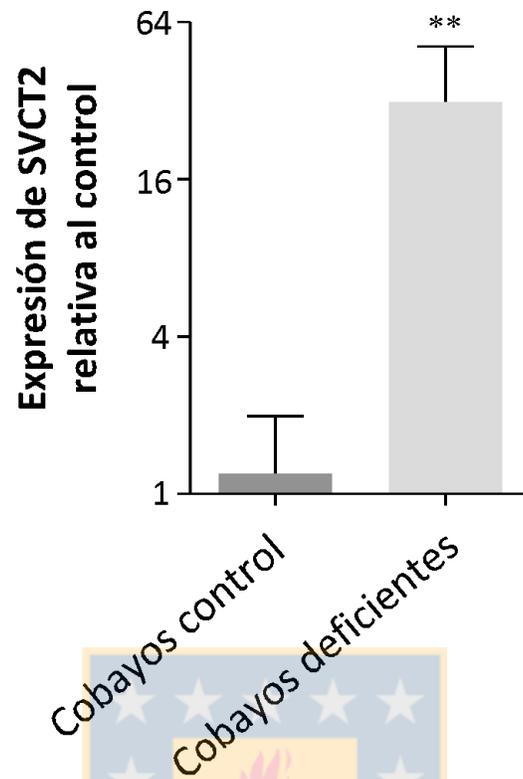
Para determinar si el ARN mensajero del transportador de vitamina C, SVCT2, es expresado en el cerebro de cobayo adulto, realizamos un análisis de RT-PCR convencional de un extracto de ARN total de corteza cerebral de cobayo, utilizando partidores específicos para amplificar un segmento del ARN mensajero de SVCT2 de cobayo. Detectamos un transcrito único de 114 pb, que corresponde al tamaño esperado (Figura 24A, surco 2). Adicionalmente, utilizamos partidores específicos para amplificar un segmento del ARN mensajero de la proteína *housekeeping*, S18, de cobayo, detectando un transcrito único de 195 pb, que corresponde al tamaño esperado (Figura 24A, surco 2). Posteriormente, para determinar si la proteína, SVCT2, es expresada en el cerebro de cobayo adulto, realizamos un ensayo de Western blot utilizando un extracto de proteínas totales de corteza cerebral de cobayo y un anticuerpo policlonal purificado por afinidad que reconoce el extremo N-terminal de SVCT2 de rata y humano, el anticuerpo anti-SVCT2 G19. Mediante este ensayo, detectamos una banda de un tamaño de 65 kDa aproximadamente (Figura 24B), que está de acuerdo al tamaño descrito para esta proteína en otras especies.

Para determinar cuál es el efecto de la deficiencia en vitamina C, sobre el nivel de expresión de su transportador, SVCT2, en el cerebro de cobayo, realizamos un RT-PCR en tiempo real a partir de extractos de ARN mensajero de cerebro de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C. Estos extractos se obtuvieron a partir de tres áreas del cerebro: la SVZ, la EVL y la corteza cerebral, las que a su vez se obtuvieron mediante el método de microdissección láser. Determinamos que el nivel de expresión del ARN mensajero para SVCT2 en cobayos deficientes en vitamina C es significativamente



**Figura 24. Expresión de SVCT2 en la corteza cerebral de cobayo adulto.**

(A) RT-PCR convencional, utilizando partidores específicos para amplificar un segmento de 114 pb del ARN mensajero SVCT2 y partidores específicos para amplificar un segmento de 195 pb del ARN mensajero de la proteína *housekeeping*, S18. **Surco 1:** marcador de tamaño molecular de 100 pb. **Surco 2:** ADN copia de corteza cerebral de cobayo adulto. **Surco 3:** control negativo con H<sub>2</sub>O. (B) Western blot para detectar SVCT2 en un extracto de proteínas totales (150µg) de corteza cerebral de cobayo adulto, utilizando el anticuerpo, anti-SVCT2 G19 (1:200). Se observa una banda de un tamaño de 65 KDa aproximadamente.



**Figura 25. Análisis del nivel de expresión del ARN mensajero de SVCT2 en el cerebro de cobayos control y en el cerebro de cobayos deficientes en vitamina C.**

RT-PCR en tiempo real para determinar el nivel de expresión del ARN mensajero para SVCT2 relativo a la expresión del ARN mensajero del gen *housekeeping*, S18, en extractos de SVZ, EVL y corteza cerebral de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C, obtenidos por microdissección láser. El nivel de expresión del ARN mensajero para SVCT2 en cobayos deficientes en vitamina C es significativamente mayor al nivel de expresión en cobayos control. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SD. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados, de tres experimentos independientes. \*\*  $P < 0,01$ .  $n = 3$  animales por condición.

mayor al nivel de expresión en animales control (Figura 25). Estos resultados sugieren que la condición de deficiencia en vitamina C en el cerebro de cobayos adultos, induce un aumento en el nivel de expresión del ARN mensajero para SVCT2.

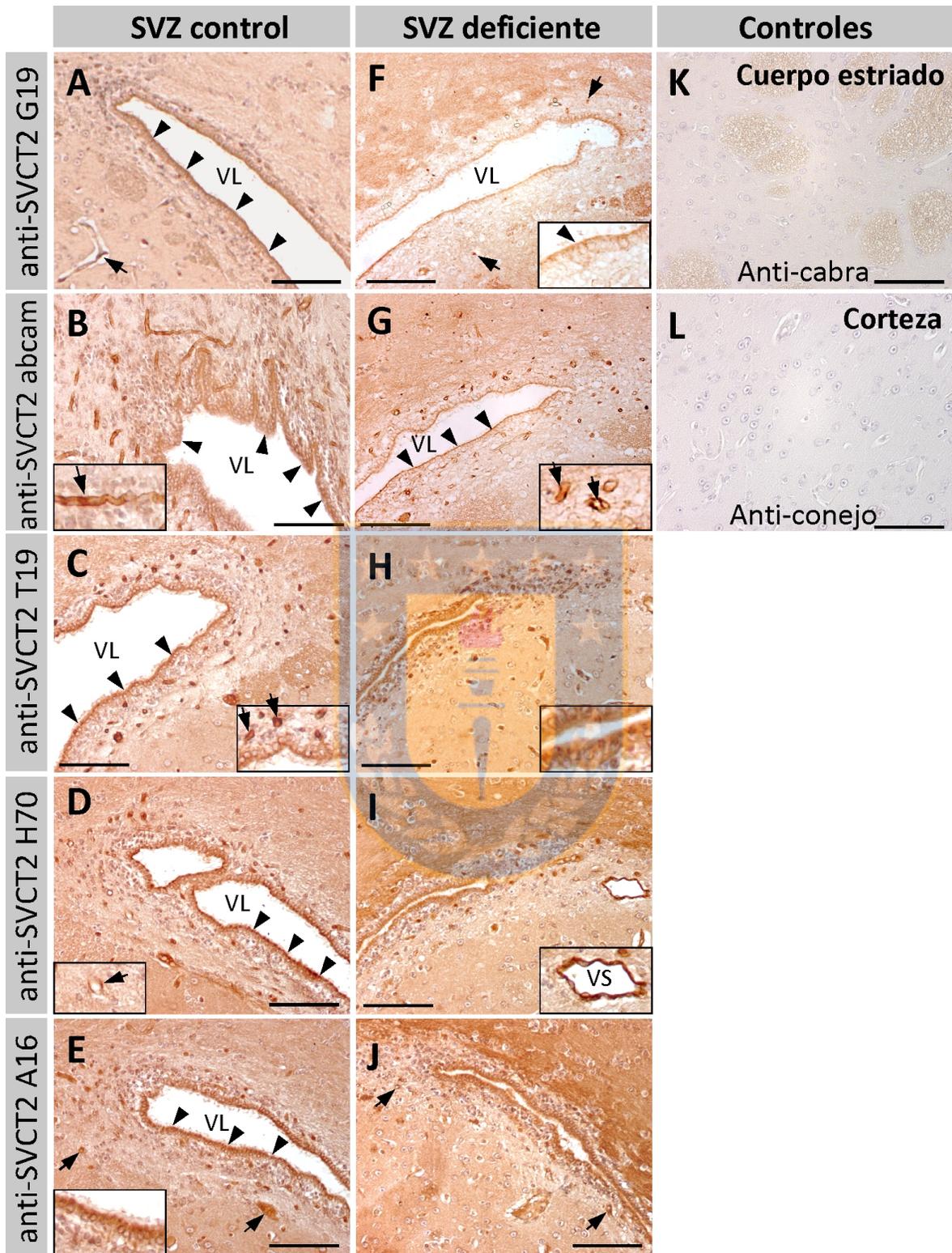
#### **5.2.4. SVCT2 se expresa en células endoteliales, en neuronas y en vasos sanguíneos del cerebro de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C.**

Una vez que demostramos que SVCT2 se expresa a nivel de ARN mensajero y proteína en el cerebro de cobayo, quisimos determinar la localización de SVCT2 en el cerebro de cobayo y si existen diferencias con el cerebro de cobayos deficientes en vitamina C. Para esto realizamos un análisis de inmunolocalización en cortes frontales de cerebros de cobayo control y deficiente, utilizando 5 anticuerpos disponibles para SVCT2: anti-SVCT2 G19, abcam, T19, H70 y A16. Para cada uno de los anticuerpos utilizados, analizamos dos regiones del cerebro: el ventrículo lateral, donde se encuentra la SVZ (Figura 26), y la corteza cerebral (Figura 27). En la región del ventrículo de animales control, observamos que los anticuerpos marcan principalmente a las células endoteliales (Figura 26A – E, puntas de flecha e inserto en E), mientras que en la SVZ propiamente tal no se define claramente el marcaje de algún tipo celular; sin embargo, detectamos una inmunorreacción para SVCT2 en vasos sanguíneos cercanos al área ventricular (Figura 26A – E, flechas e insertos en B, C y D). En animales deficientes, determinamos que la reactividad de los anticuerpos es muy similar a lo observado en el control, marcando principalmente células endoteliales (Figura 26F – J, puntas de flecha e insertos en F y H) y vasos sanguíneos (Figura 26F – J, flechas e insertos en G e I). Para confirmar la especificidad de la reacción, se analizaron controles negativos sin anticuerpo primario



**Figura 26. Expresión y localización de SVCT2 en la SVZ del cerebro de cobayos control y cobayos deficientes en vitamina C.**

Análisis de inmunolocalización del transportador, SVCT2, en la SVZ del cerebro de cobayos control (A – E) y de cobayos deficientes en vitamina C (F – J), utilizando 5 anticuerpos anti-SVCT2 diferentes: G19 (A y F dilución 1:50), abcam (B y G, dilución 1:100), T19 (C y H, dilución 1:50), H70 (D e I, dilución 1:50) y A16 (E y J, dilución 1:50). Se observa que los diferentes anticuerpos marcan células endoteliales (A – J, puntas de flecha) y vasos sanguíneos en la SVZ (A – J, flechas) tanto en la SVZ control como en la SVZ deficiente. Controles negativos sin anticuerpo primario, utilizando el secundario anti-cabra (K) y el secundario anti-conejo (L). VL: ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo. Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .



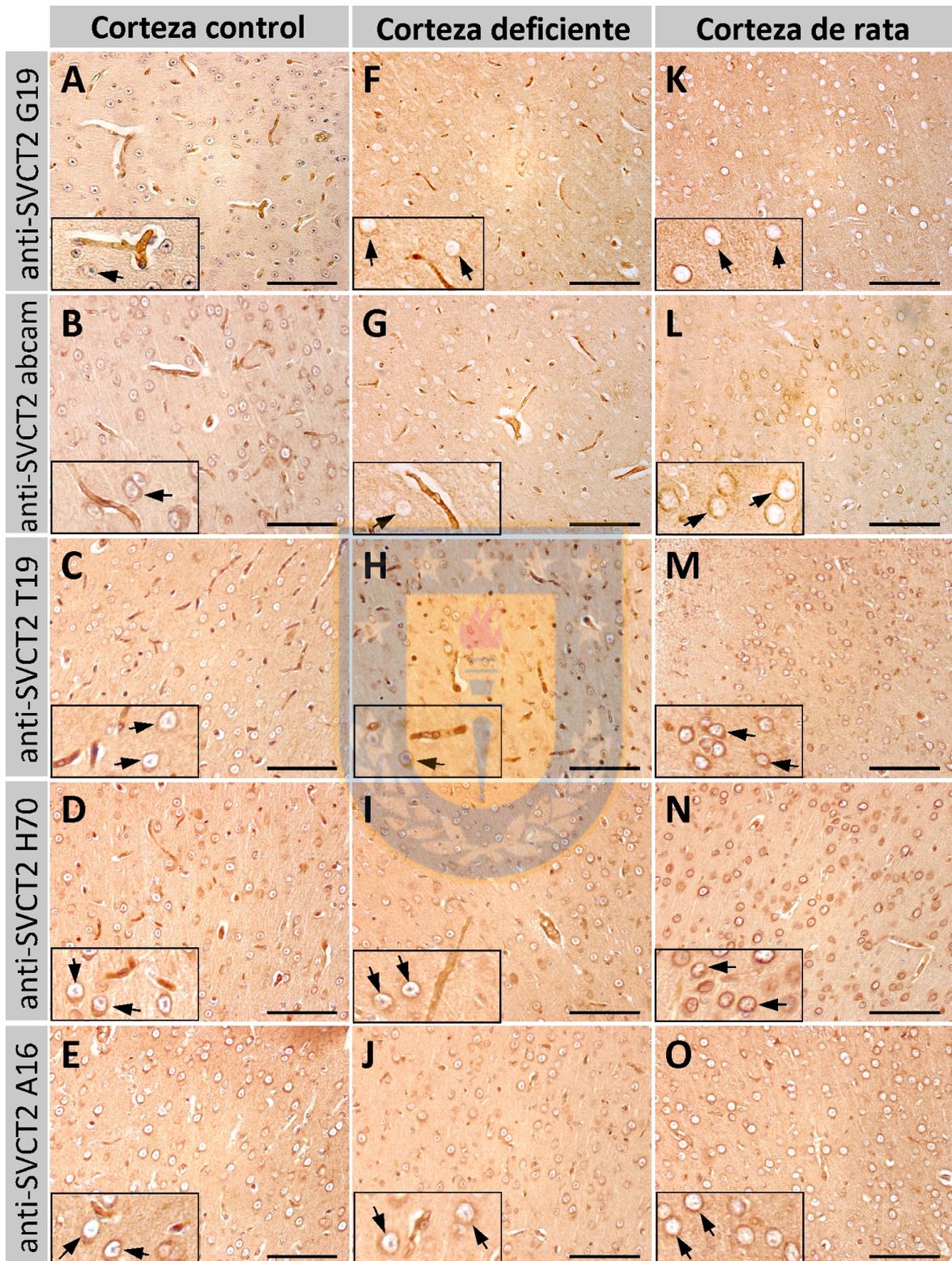
(Figura 26K y L). Determinamos que el anticuerpo secundario anti-cabra, utilizado para los anticuerpos primarios anti-SVCT2 G19, T19 y A16, marca en forma tenue los fascículos de los axones del cuerpo estriado (Figura 26K) y que el anticuerpo secundario anti-conejo, utilizado para los anticuerpos primarios anti-SVCT2 abcam y H70, no reaccionó con el tejido (Figura 26L). En cuanto a la región de la corteza cerebral de cobayos control, observamos una clara reactividad en vasos sanguíneos (Figura 27A – E, insertos) y una marca más tenue en el soma de las neuronas corticales (Figura 27A - E, flechas en insertos). En animales deficientes, la expresión y localización de SVCT2 fue muy similar (Figura 27F – J, insertos y flechas). Luego, para comparar nuestros resultados en la corteza cerebral de cobayo, analizamos cortes frontales de corteza cerebral de rata (Figura 27K – O). Definimos que los anticuerpos marcan los somas de las neuronas corticales en el cerebro de rata y lo hacen con mayor intensidad que lo observado en la corteza de cobayo; sin embargo, los anticuerpos no marcan los vasos sanguíneos en el cerebro de rata (Figura 27K – O, flechas en insertos). Además, determinamos que si bien los diferentes anticuerpos marcan las mismas estructuras, la intensidad de la inmunorreacción varía con cada anticuerpo; por ejemplo, los vasos sanguíneos son marcados intensamente con el anticuerpo anti-SVCT2 T19 en cerebro de cobayo (Figura 27C y H), mientras que los somas de las neuronas corticales son marcados de forma más clara con el anticuerpo anti-SVCT2 H70 en cerebro de rata (Figura 27N).

A continuación, nos preguntamos si la expresión de SVCT2 también ocurre en los vasos sanguíneos del cerebro humano. Esta pregunta surge del hecho de que los seres humanos y los cobayos tienen en común la incapacidad de sintetizar vitamina C, por lo tanto, estas especies podrían tener en común características relacionadas a la distribución e incorporación de vitamina C en diversos órganos, como por ejemplo, el cerebro. Para



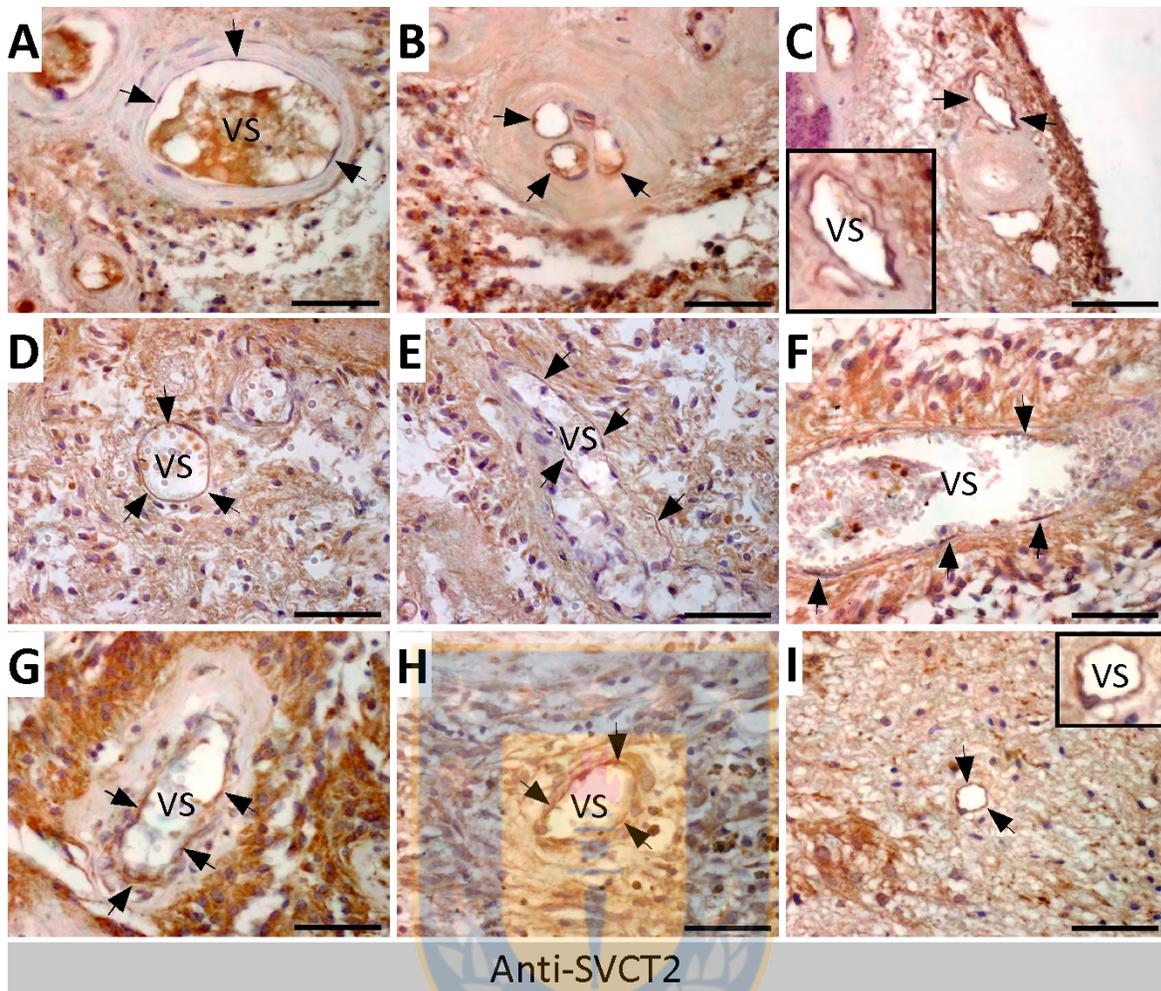
**Figura 27. Expresión y localización de SVCT2 en la corteza cerebral de cobayos control y de cobayos deficientes en vitamina C.**

Análisis de inmunolocalización del transportador, SVCT2, en la corteza del cerebro de cobayos control (A – E) y de cobayos deficientes en vitamina C (F – J) y de la corteza cerebral de rata (K – O), utilizando 5 anticuerpos anti-SVCT2 diferentes: G19 (A, F y K, dilución 1:50), abcam (B, G y L, dilución 1:100), T19 (C, H y M, dilución 1:50), H70 (D, I y N, dilución 1:50) y A16 (E, J y O, dilución 1:50). Se observa que los diferentes anticuerpos marcan somas de neuronas (A – J, flechas en insertos) y vasos sanguíneos (A – J, insertos) en la corteza cerebral de cobayos control y deficientes. En los controles de corteza cerebral de rata, los anticuerpos solo marcan somas de neuronas (K – O, flechas en insertos). Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .



contestar a esta interrogante, llevamos a cabo un análisis de inmunolocalización utilizando el anticuerpo, anti-SVCT2 T19, en cortes de cerebro humano derivados del tejido de tres tumores cerebrales humanos diferentes (Figura 28). Utilizamos el anticuerpo anti-SVCT2 T19, ya que fue el anticuerpo que marcó en forma más clara los vasos sanguíneos en el cerebro de cobayo (Figura 27C y H). De esta forma, determinamos que SVCT2 se expresa en diversos tipos celulares presentes en los tumores cerebrales humanos y que efectivamente, los vasos sanguíneos de diferentes calibres del cerebro humano expresan SVCT2 (Figura 28, flechas e insertos). Además, en algunos vasos sanguíneos notamos que la expresión de SVCT2 en la pared del vaso se presenta de una manera discontinua (Figura 28F, flechas).

Posteriormente, para estudiar en qué tipo de vasos sanguíneos se expresa SVCT2 en los cerebros de cobayos control y deficientes en vitamina C, realizamos un análisis de inmunofluorescencia utilizando múltiples marcajes: anti-GLUT1, que se expresa en células endoteliales del cerebro; anti-vimentina, que se expresan en células musculares lisas y anti-SVCT2 T19. En el cerebro de cobayos control, determinamos que la gran mayoría de los vasos sanguíneos expresan GLUT1 (Figura 29A, E, I, M y Q); que algunos vasos sanguíneos expresan vimentina (Figura 29B, F, J y N flecha) y otros no la expresan (Figura 29B y D, puntas de flecha); y que numerosos vasos sanguíneos expresan SVCT2 (Figura 29C, G, K, O y S, flechas), pero no todos (Figura 29C, G, K, O y S, puntas de flecha). Observamos que todos los vasos sanguíneos que expresan vimentina, también expresan SVCT2 (Figura 29D, H, L y P), y que algunos vasos sanguíneos que expresan GLUT1, no expresan SVCT2 (Figura 29A – D y Q – T, puntas de flecha). Cabe señalar, que al observar las imágenes de superposición (Figura 29D y H, flecha) da la impresión de que algunos vasos sanguíneos que expresan SVCT2, no expresan GLUT1; sin embargo, al observar con



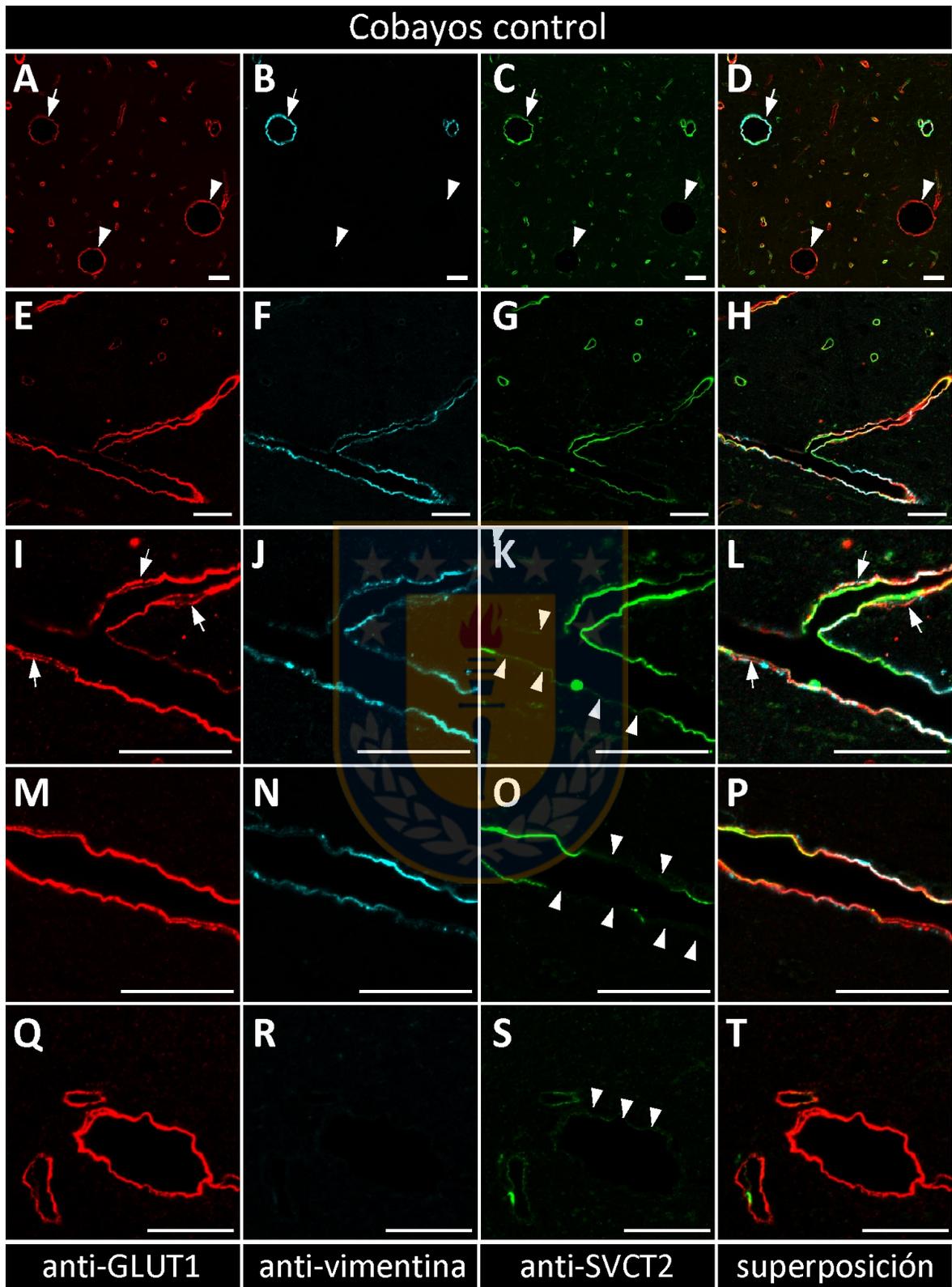
**Figura 28. Expresión y localización de SVCT2 en vasos sanguíneos de tumores cerebrales humanos.**

Análisis de inmunolocalización del transportador, SVCT2, en tres tumores cerebrales humanos diferentes: primer tumor (A – C), segundo tumor (D – H) y tercer tumor (I). Para la detección se utilizó el anticuerpo anti-SVCT2 T19 (1:50), observándose la expresión de SVCT2 en diversos tipos celulares presentes en los tumores cerebrales humanos y también, en los vasos sanguíneos de diferentes calibres (A – I, flechas). Adicionalmente, en algunos vasos sanguíneos se observa una expresión discontinua en la pared del vaso (F, flechas). VS: vaso sanguíneo. Barra de aumento: 50  $\mu$ m.

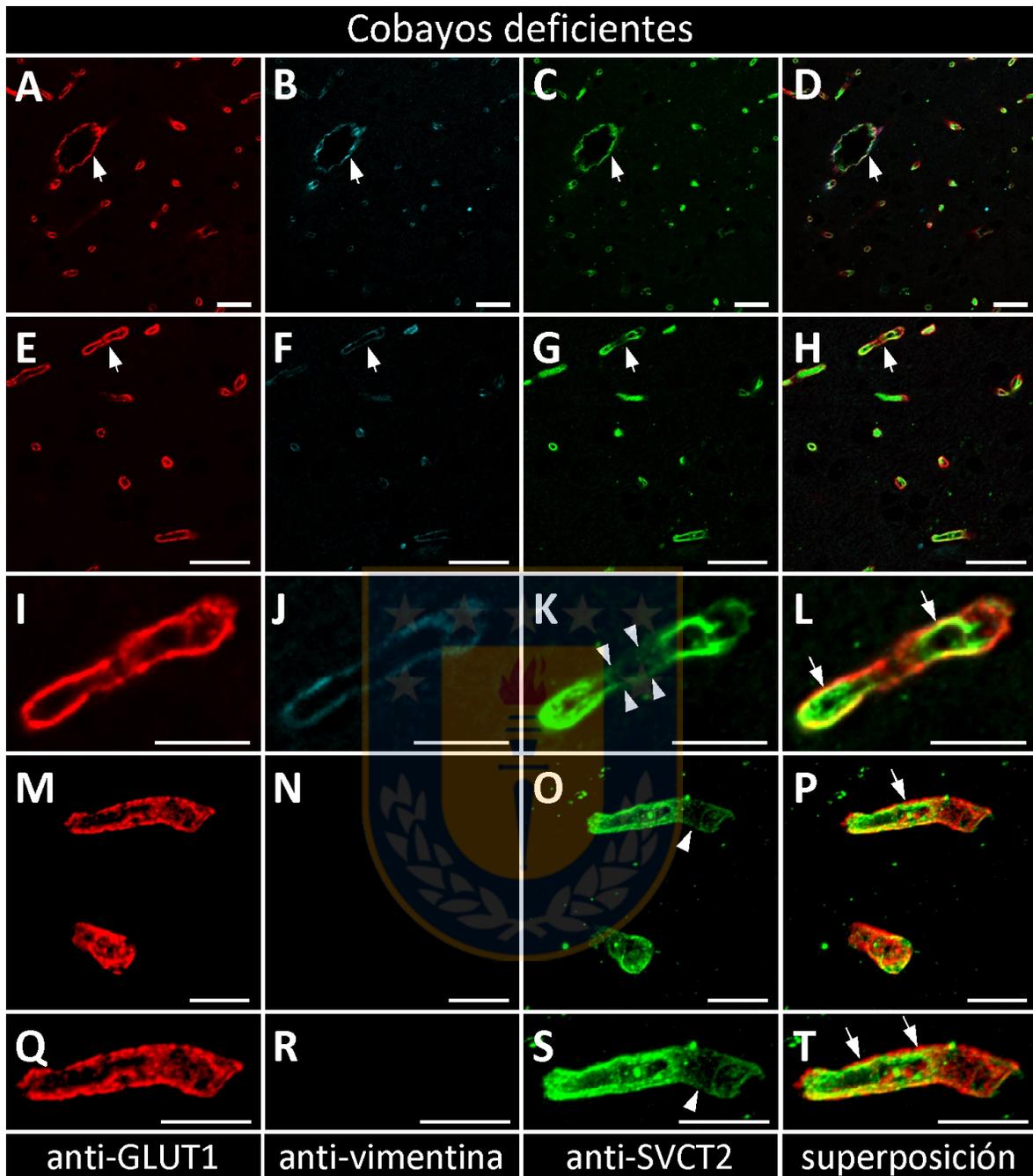


**Figura 29. Análisis de colocalización entre SVCT2, GLUT1 y vimentina en vasos sanguíneos de cerebro de cobayo control.**

Análisis de inmunofluorescencia, utilizando múltiples marcajes, anti-GLUT1 (1:100, rojo), anti-vimentina (1:200, cian) y anti-SVCT2 T19 (1:50, verde). La gran mayoría de los vasos sanguíneos expresan GLUT1 (**A, E, I, M y Q**), algunos vasos de mayor calibre expresan vimentina (**B, F, J y N**) y la mayoría expresa SVCT2 (**C, G, K, O y S**). Hay vasos sanguíneos que expresan GLUT1, pero no expresan SVCT2 (**A – D y Q – T**, puntas de flecha), y en vasos de mayor calibre, SVCT2 se expresa de una forma discontinua en la pared de los vasos (**G, K y O**, puntas de flecha). Se observa que GLUT1 tiene una localización luminal y abluminal (**I**, flechas), mientras que SVCT2 presenta una localización luminal (**K y L**, flechas). Barra de aumento: 50  $\mu\text{m}$ .



detención, podemos concluir que la baja expresión de GLUT1 en algunos vasos sanguíneos se ve enmascarada por una alta expresión de SVCT2. Comprobamos que la expresión de SVCT2 se presenta de manera discontinua en la pared de vasos sanguíneos de un mayor calibre en el cerebro de cobayo (Figura 29G, K y O, puntas de flecha), similar a lo observado previamente en los vasos sanguíneos de tumores de cerebro humano (Figura 28). Finalmente, definimos que la expresión de GLUT1 ocurre tanto en la cara luminal como en la abluminal de los vasos sanguíneos (Figura 29I – L, flechas), mientras que SVCT2 se observa principalmente en la cara luminal de vaso (Figura 29L, flechas). Las observaciones fueron similares en cerebro de cobayos deficientes (Figura 30), donde la mayoría de los vasos sanguíneos expresan GLUT1 (Figura 30A, E, I, M y Q); algunos vasos de mayor calibre expresan vimentina (Figura 30B, F y J, flechas); la mayoría de los vasos expresa SVCT2 y la expresión se presenta de una forma discontinua en un mismo vaso (Figura 30G, K, O y S, puntas de flecha). También, definimos que la expresión de SVCT2 se presenta en la cara luminal, mientras que GLUT1 se muestra en la cara abluminal de los vasos sanguíneos (Figura 30L, P y T, flechas). En conjunto, estos resultados indican que en el cerebro de cobayo adulto control y deficiente, SVCT2 es expresado en capilares sanguíneos (anti-vimentina -) y en arterias medianas (anti-vimentina +) y que la expresión ocurre principalmente en la cara luminal del vaso sanguíneo.



**Figura 30. Análisis de colocalización entre SVCT2, GLUT1 y vimentina en vasos sanguíneos de cerebro de cobayo deficientes en vitamina C.**

Análisis de inmunofluorescencia, utilizando múltiples marcajes, anti-GLUT1 (1:100, rojo), anti-vimentina (1:200, cian) y anti-SVCT2 T19 (1:50, verde). De la misma forma que en el cerebro control, la mayoría de los vasos sanguíneos expresa GLUT1 (A, E, I, M y Q) y SVCT2 (C, G, K, O y S). SVCT2 se expresa en forma discontinua en la pared de los vasos (H, L, P y T, flechas), y por otro lado, se observa que GLUT1 tiene una localización abluminal (L, P y T, flechas), mientras que SVCT2 presenta una localización luminal (L, P y T, flechas). Barra de aumento: A – H: 30  $\mu$ m, I – T: 10  $\mu$ m.

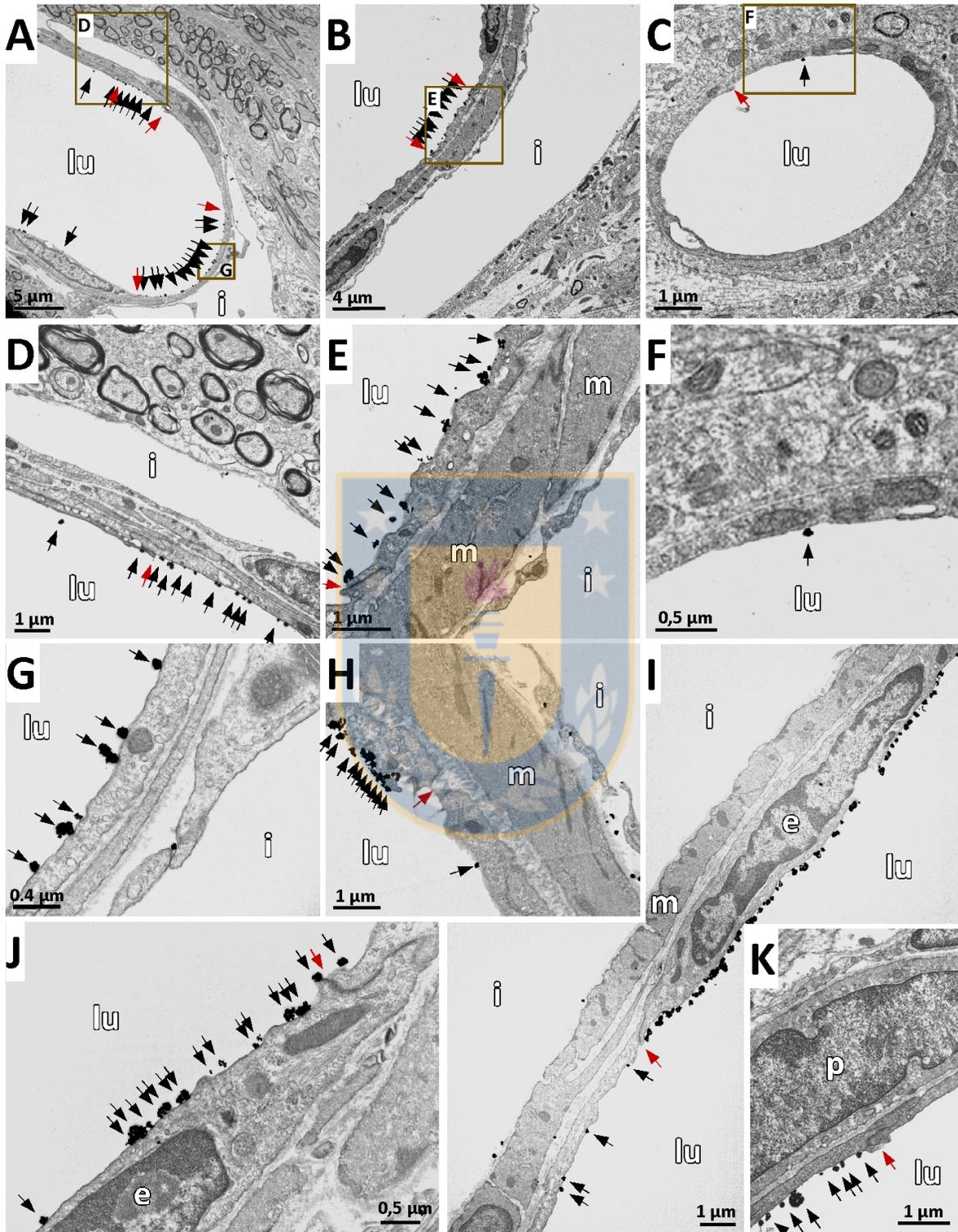
vasos sanguíneos de mayor calibre, con espacio perivascular (Figura 31A, B, D, E y G – I, flechas negras) y de los vasos sanguíneos de menor calibre, sin espacio perivascular (Figura 31C, F, J y K, flechas negras). Por otro lado, corroboramos nuestros hallazgos por microscopía óptica al observar que las partículas de oro se distribuyen en forma discontinua en la pared del vaso (Figura 31). Definimos que esta discontinuidad se produce debido a que en un mismo vaso sanguíneo, algunas células endoteliales expresan SVCT2 y otras no lo expresan (Figura 31, flechas rojas indican límites intercelulares y flechas negras indican partículas de oro). En el cerebro de cobayos deficientes (Figura 32) las observaciones fueron similares a las del cerebro de cobayos control (Figura 31); SVCT2 se expresa en la superficie luminal de las células endoteliales de vasos sanguíneos (Figura 32A – I, flechas negras), y también, se localiza en vesículas al interior de estas células (Figura 32J, flechas), indicando que el transportador se compartimentaliza. Además, determinamos que la expresión de SVCT2 también se presenta en forma discontinua en la pared de los vasos del cerebro de cobayos deficientes (Figura 32A – I, flechas rojas indican límites intercelulares). Finalmente, hay que señalar que en la microfotografías de vasos sanguíneos de animales deficientes (Figura 32) da la impresión que hay una menor expresión de SVCT2 que en los vasos sanguíneos de cobayos control (Figura 31); sin embargo, esto se debe a que en los cortes ultrafinos del cerebro de animales deficientes no encontramos vasos sanguíneos de mayor calibre, con espacio perivascular, que son los que expresan SVCT2 en un nivel mayor.

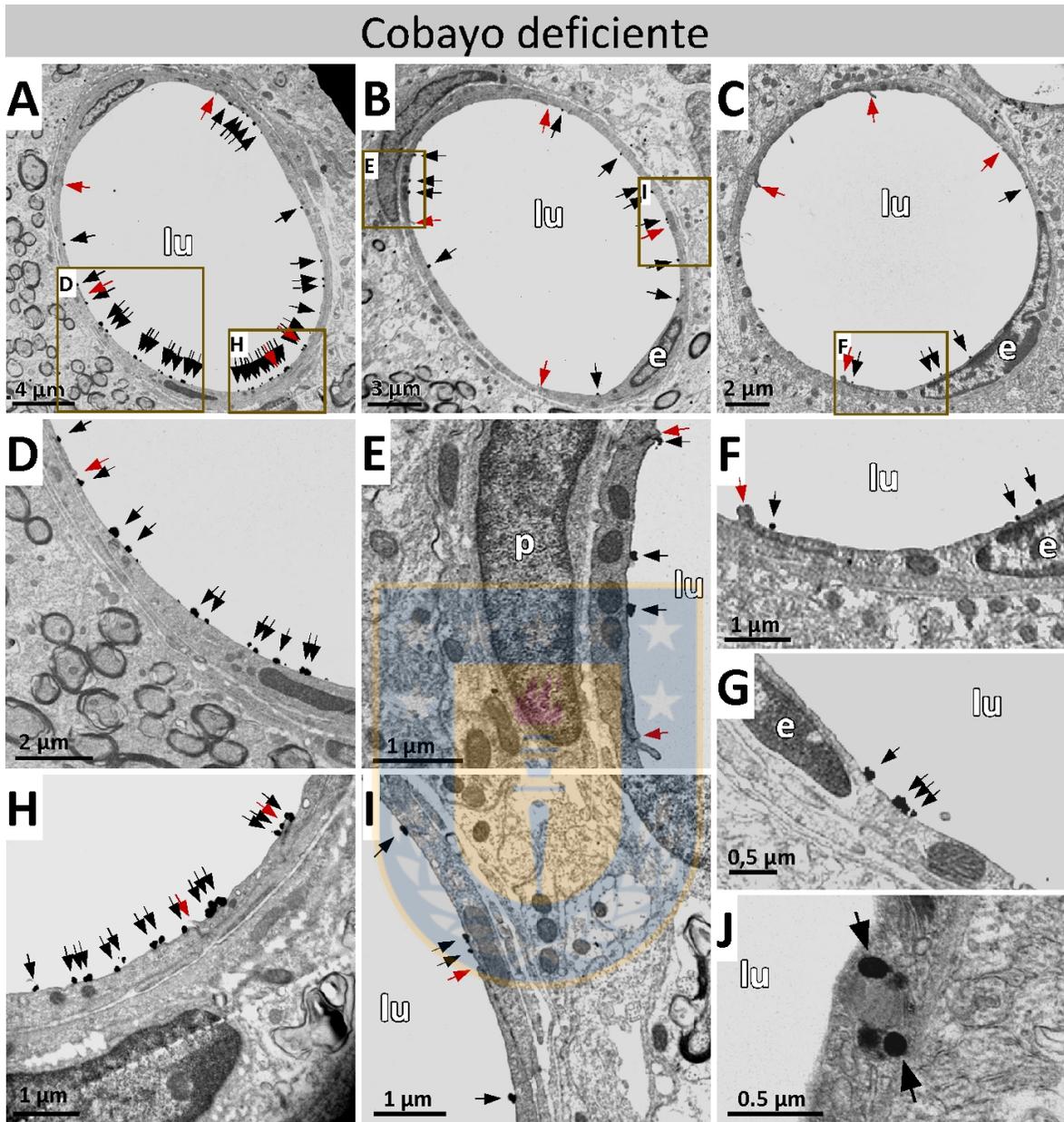


**Figura 31. Análisis inmunoultraestructural de la localización de SVCT2 en vasos sanguíneos del cerebro de cobayo control.**

Análisis de la localización de SVCT2 en el cerebro de cobayo control, por *immunogold* y microscopía electrónica de transmisión, utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 T19 (1:50). Se observa que SVCT2 se expresa en la superficie luminal de células endoteliales de vasos sanguíneos de diferentes calibres: vasos sanguíneos grandes con espacio perivascular (**A, B, D, E** y **G – I**, flechas) y en vasos sanguíneos pequeños sin espacio perivascular (**C, F, J** y **K**, flechas). Además, se observa que SVCT2 (flechas negras) se expresa solo en algunas células endoteliales de la pared de cada vaso sanguíneo (**A, B, D** y **G – K**, flechas rojas indican límites intercelulares). e: célula endotelial. m: célula muscular. p: pericito. lu: lumen. i: espacio perivascular.

# Cobayo control





**Figura 32. Análisis inmunoultraestructural de la localización de SVCT2 en vasos sanguíneos del cerebro de cobayo deficiente en vitamina C.**

Análisis de la localización de SVCT2 en los vasos sanguíneos del cerebro de cobayo deficiente en vitamina C, por *immunogold* y microscopía electrónica de transmisión, utilizando el anticuerpo anti-SVCT2 T19 (1:50). SVCT2 se expresa en la superficie luminal de células endoteliales de vasos sanguíneos pequeños sin espacio perivascular (A – I, flechas) y también, se localiza en vesículas intracelulares de células endoteliales (J, flechas). Las flechas rojas indican los límites intercelulares de células endoteliales. e: célula endotelial. p: pericito. lu: lumen.

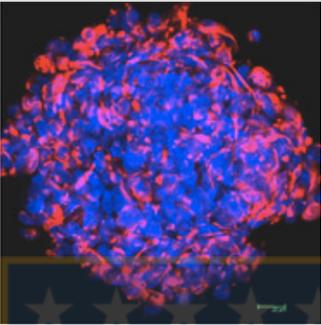
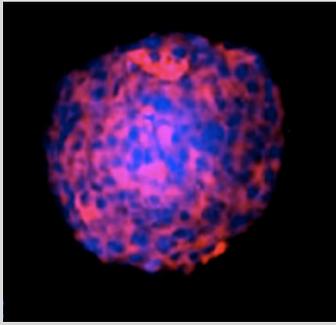
### **5.3. Capítulo 3. Generación y caracterización de un modelo de glioblastoma multiforme inducido en la SVZ del cerebro de cobayos adultos.**

Existen numerosos estudios que demuestran una relación directa entre el origen, frecuencia y malignidad de los gliomas con la SVZ; sin embargo, cuando se realizan modelos de xenoinjertos de gliomas, éstos se inducen principalmente en el cuerpo estriado y no en una región más idónea, como sería la SVZ. Por esta razón, en este capítulo describimos la generación y la caracterización de un modelo de glioblastoma multiforme (GBM) inducido en la SVZ del cerebro de cobayo adulto. En primer lugar, describimos las características inmunocitoquímicas de las células tumorales utilizadas para la inducción de los GBMs, luego analizamos histopatológicamente los tumores generados y, por último, estudiamos el efecto del tumor sobre la composición celular de la SVZ.

#### **5.3.1. Las células de glioblastoma multiforme humano, U87 – MG y C3, expresan marcadores neuronales, gliales y troncales.**

Para la inducción de los GBMs en la SVZ del cerebro de cobayos adultos se utilizaron dos líneas celulares: la línea celular U87 – MG, una línea comercial de GBM humano, y la línea celular C3, que corresponde a una línea aislada en nuestro laboratorio desde un GBM subventricular humano. Ambas líneas celulares presentan algunas características en común (Tabla 4); fueron aisladas de pacientes varones, presentan morfología epitelial y tienen la capacidad de formar neurósferas *in vitro* (Pastor, 2011; Yu y col., 2008).

**Tabla 4.**

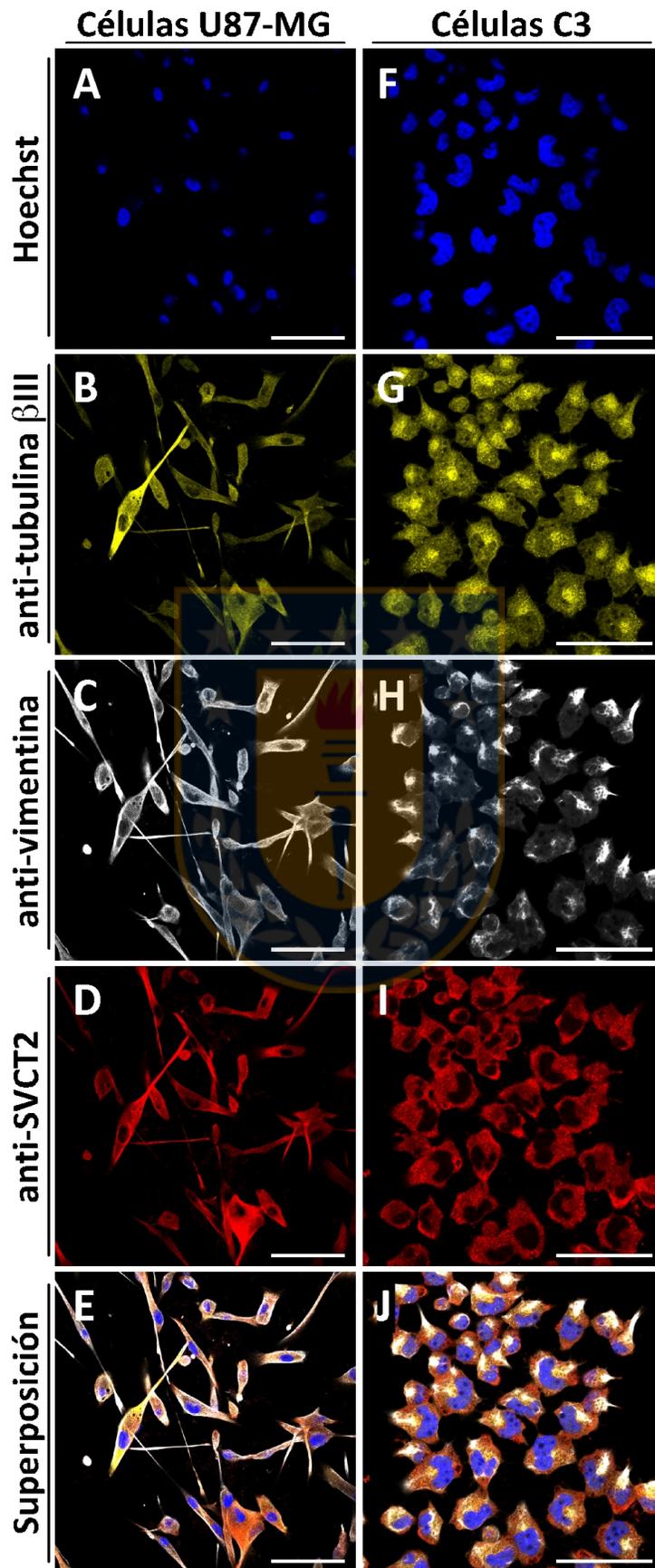
	<b>Células U87 – MG</b>	<b>Células C3</b>
Organismo	Humano	Human
Género	Varón	Varón
Tejido	Cerebro	Cerebro
Edad del paciente	44 años	15 años
Tipo de tumor	GBM parenquimal	GBM subventricular
Morfología	Epitelial	Epitelial
Capacidad de formar neurósferas.		

Para definir la expresión de diferentes tipos de marcadores en ambas líneas celulares, se realizó un análisis inmunocitoquímico (Figura 33). Determinamos que las células U87 – MG expresan el marcador neuronal, tubulina  $\beta$ III (Figura 33B); el marcador glial, vimentina (Figura 33C); y el transportador de vitamina C, SVCT2 (Figura 33D). Por otro lado, determinamos que las células C3, similar a las células U87 – MG, expresan tubulina  $\beta$ III (Figura 33G), vimentina (Figura 33H), y el transportador de vitamina C, SVCT2 (Figura 33I). Adicionalmente, detectamos que ambos tipos celulares expresan el marcador de células madre, anti-nestina (dato no presentado). Estos resultados demuestran que ambos tipos celulares exhiben múltiples linajes, y además, sugieren que ambas líneas presentan características de células madre, por la expresión de nestina y por la capacidad de formar neurósferas *in vitro*, lo que ha sido previamente descrito para células de GBM humano.



**Figura 33. Expresión de marcadores de múltiples linajes en las células U87 – MG y en las células C3.**

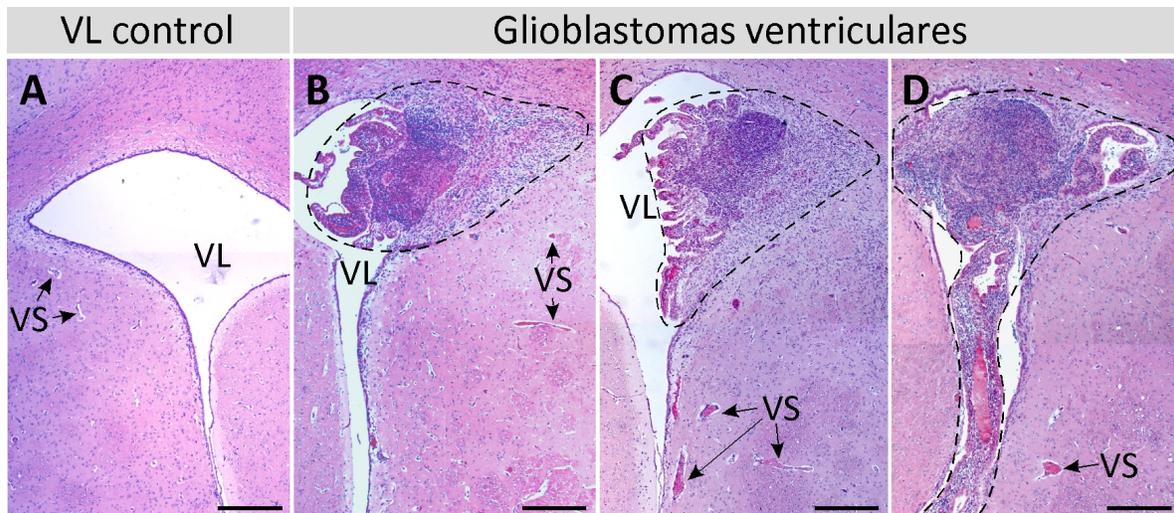
Análisis inmunocitoquímico de las células U87 – MG (**A – E**) y de las células C3 (**F – J**), utilizando el marcador nuclear, Hoechst (1:1000) (**A y F**) y los anticuerpos anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000) (**B y G**), anti-vimentina (1:100) (**C y H**), y anti-SVCT2 (1:50) (**D e I**). Se observa que tanto las células U87 – MG como las células C3 son células que exhiben múltiples linajes, expresando marcadores neuronales y gliales. Adicionalmente, ambas líneas celulares expresan el transportador de vitamina C, SVCT2. Superposición (**E y J**). Barras de aumento: 50  $\mu$ m.



### **5.3.2. El modelo de GBM subventricular en el cerebro de cobayo reproduce las principales características histopatológicas de los GBMs humanos.**

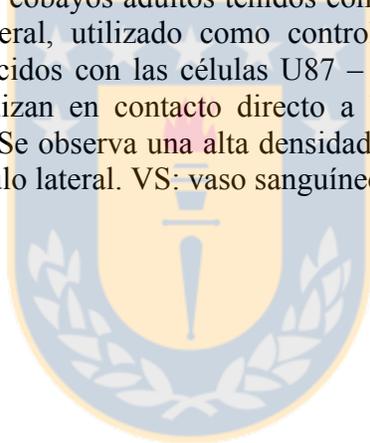
Indujimos GBMs humanos inyectando un millón de células U87 – MG en la SVZ de cerebros de cobayos adultos, mediante la utilización de un marco estereotáxico. Los tumores se dejaron desarrollar durante dos semanas y al cabo de este periodo, los animales fueron sacrificados. Analizamos cortes frontales del cerebro de los cobayos en la región en que se generó el tumor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina-cromótopo en una primera fase (Figura 34). Observamos que los tumores inducidos se localizan en contacto directo con la SVZ y que presentan un gran tamaño, ocupando parte de la cavidad de los VLs (Figura 34B, C y D, línea punteada). En algunos casos, observamos que los tumores que ocupan la cavidad de los VLs se fusionan con los plexos coroideos que se encuentran con normalidad en esta cavidad (Figura 34B, C y D). Por otra parte, observamos que los tumores presentan una alta densidad celular o hipercelularidad, lo que es evidenciado por una coloración púrpura oscura en el área del tumor, dada a su vez, por una alta densidad de núcleos celulares teñidos con hematoxilina (color púrpura) (Figura 34B, C y D). La hipercelularidad corresponde a una de las características histopatológicas observadas en los GBMs humanos (Holland, 2000).

Además, determinamos que en el modelo tumoral se produce una infiltración de células de la microglía (Figura 35A, inserto y flechas), denotada por la presencia de un alto número de células eosinófilas en el área tumoral, las que además, son detectadas en forma específica por el marcador de células de la microglía, isolectina B4 (ver más adelante). En áreas muy bien delimitadas del tumor, observamos que también se produce una infiltración linfocitaria (Figura 35B, inserto y flechas), la cual fue definida por la presencia de



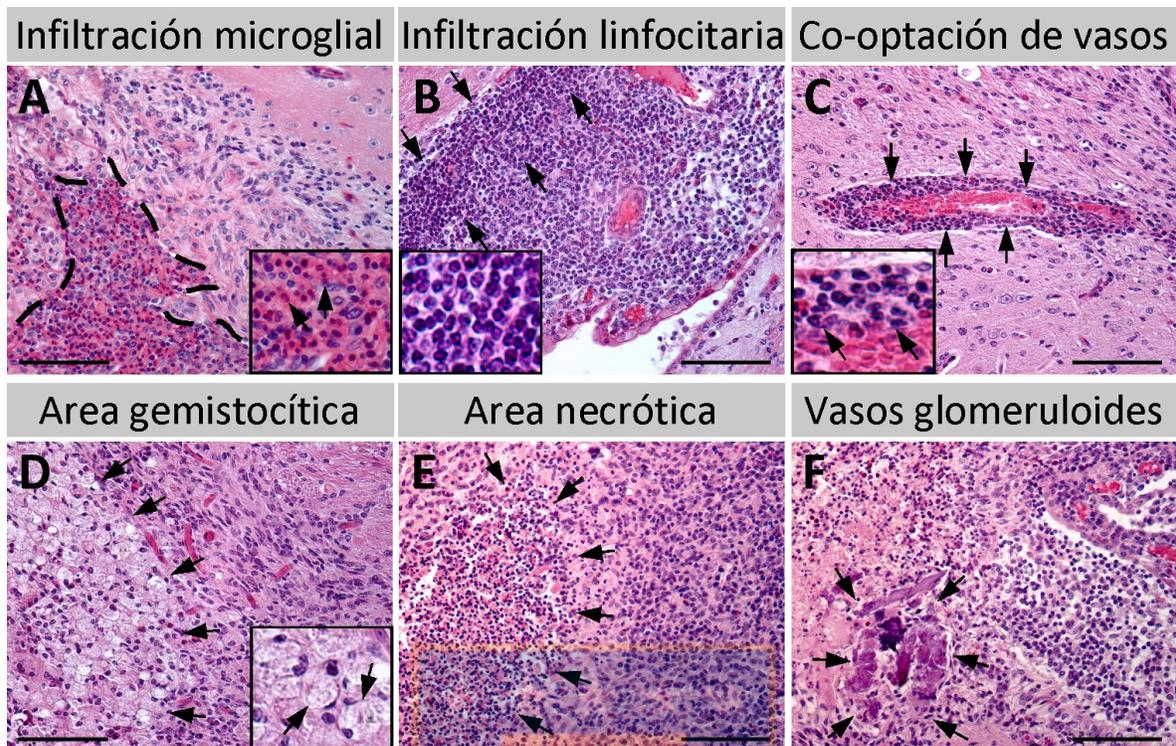
**Figura 34. Análisis del modelo de GBM inducido en la SVZ del cerebro de cobayo con las células U87 – MG.**

Cortes frontales del cerebro de cobayos adultos teñidos con hematoxilina-cromótopo (A – D). (A) Ventriculo contra-lateral, utilizado como control interno. (B – D) Diferentes tumores (línea punteada) inducidos con las células U87 – MG en la SVZ del cerebro de cobayo. Los tumores se localizan en contacto directo a la SVZ, ocupando parte de la cavidad del ventrículo lateral. Se observa una alta densidad celular y una alta presencia de vasos sanguíneos. VL: ventrículo lateral. VS: vaso sanguíneo. Barra de aumento: 300  $\mu$ m.



linfocitos, células de tamaño y forma homogénea, y con una relación núcleo/citoplasma muy elevada (Figura 35B, inserto). Por otro lado, observamos que las células tumorales cooptan vasos sanguíneos cercanos al área tumoral (Figura 35C, inserto y flechas), lo que está relacionado a la capacidad de estas células de utilizar los vasos sanguíneos como una vía de migración para invadir diferentes regiones del cerebro. También encontramos áreas bien definidas con presencia de gemistocitos (Figura 35D, inserto y flechas), los que corresponden a células tumorales de mayor tamaño, con un citoplasma grande y claro, y con un núcleo excéntrico (Figura 35D, inserto), y que están relacionados a un peor pronóstico para los pacientes con GBM. Observamos áreas de necrosis (Figura 35E, flechas), evidenciadas por la presencia de células dañadas, núcleos fragmentados y una fragilidad mayor en cuanto a la preservación de la estructura del tejido (Figura 35E, flechas). Cabe destacar, que la necrosis junto a la vasculatura glomeruloide son las dos características histopatológicas más distintivas de los GBMs humanos. La vasculatura glomeruloide también fue observada en el modelo (Figura 35F, flechas), ésta se presenta en formas y tamaños muy diversos, pero se caracteriza por la presencia de “parches” de colágeno dispuestos de forma irregular (Figura 35F, flechas). En conjunto, estos resultados demuestran que el modelo de GBM humano, generado en el cerebro de cobayo adulto, es capaz de reproducir las principales características histopatológicas de los GBMs.

Continuando con el análisis histopatológico, mediante la tinción tricrómica de Masson determinamos que luego de dos semanas desde su inducción, el modelo de GBM presenta una matriz extracelular rica en fibras de colágeno (Figura 36A – H, fibras en azul). Luego, mediante la generación de segundos armónicos – una tecnología que permite detectar colágeno en una muestra sin necesidad de ser previamente marcado – comprobamos la presencia de colágeno en las muestras de GBM, detectándose



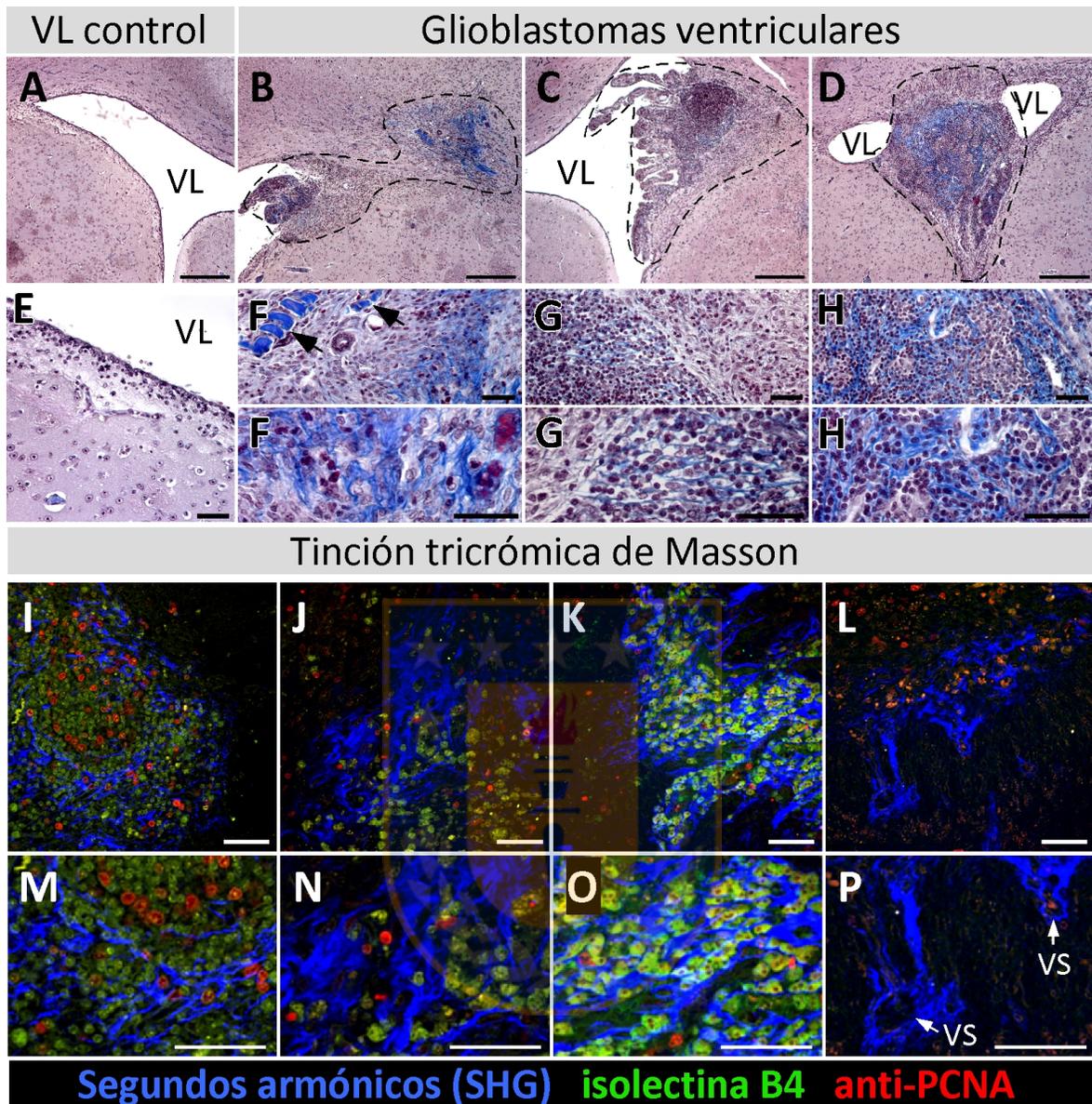
**Figura 35. Análisis de las principales características histopatológicas del modelo de GBM subventricular en cerebro de cobayo.**

Cortes frontales de GBMs generados en la SVZ del cerebro de cobayo, teñidos con hematoxilina-cromótopo (A – F). Se demuestra que el modelo de GBM subventricular reproduce las principales características de los GBMs en el cerebro humano; se reproduce la infiltración microglial (A, inserto y flechas), la infiltración linfocitaria (B, inserto y flechas), la co-optación de vasos sanguíneos (C, inserto y flechas), la presencia de gemistocitos (D, inserto y flechas), la presencia de regiones necróticas (E, flechas) y la presencia de vasculatura glomeruloide (F, flechas). Barra de aumento: 100  $\mu$ m.

exclusivamente en el área tumoral (Figura 36I – P, fibras en azul). La capacidad de generar una matriz extracelular rica en colágeno ha sido vinculada a la capacidad invasiva de las células tumorales. Adicionalmente, confirmamos la presencia de vasculatura glomeruloide en el modelo, ya que el colágeno que forma parte de esta vasculatura se tiñe de azul intenso (Figura 36F, flechas), y por otro lado, observamos que la red de colágeno presente en el tumor se conecta con los vasos sanguíneos adyacentes (Figura 36L y P), sugiriendo que las células tumorales utilizan la matriz de colágeno para migrar hacia los vasos sanguíneos, y así, co-optarlos.

### **5.3.3. El modelo GBM subventricular induce una gliosis reactiva, una infiltración microglial y un aumento en la cantidad de neuroblastos en el SVZ.**

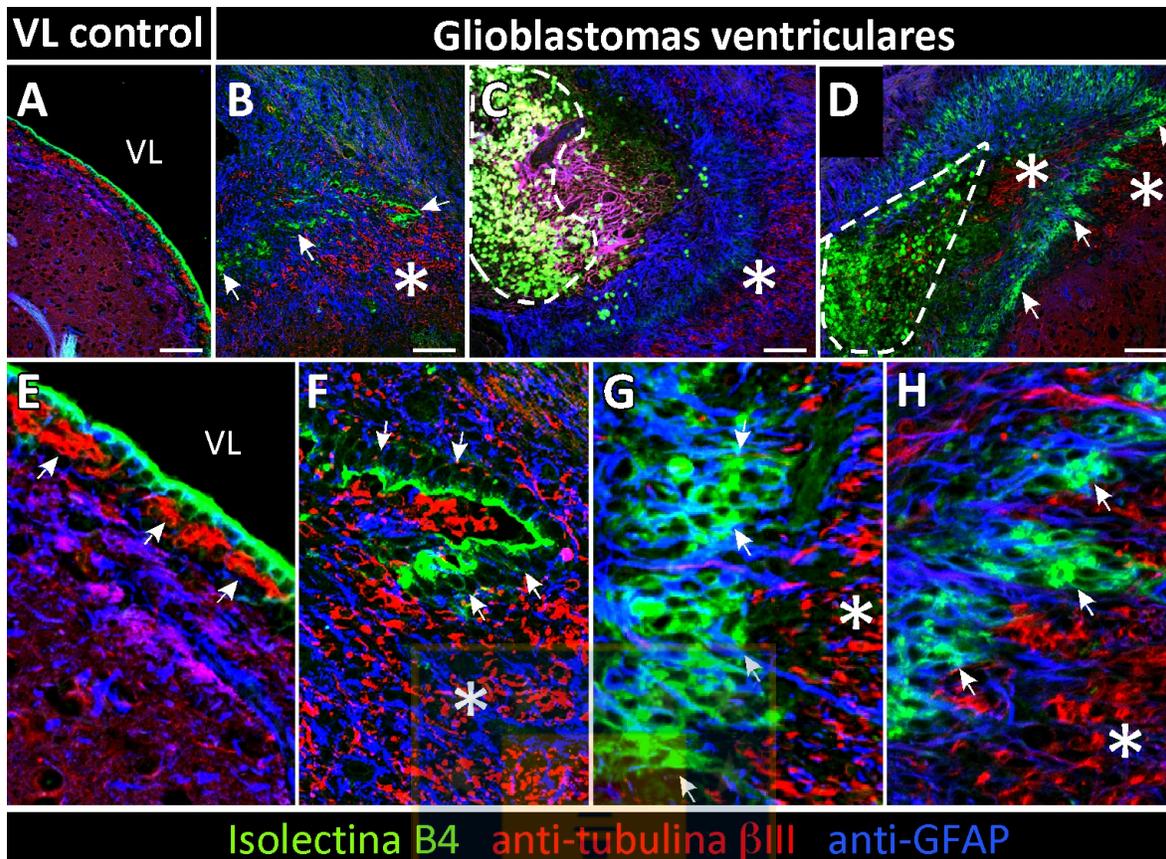
Con el objetivo de determinar las características inmunohistoquímicas del modelo de GBM y cómo éste altera la estructura normal de la SVZ, realizamos un análisis de inmunofluorescencia con múltiples marcadores: anti-tubulina  $\beta$ III para detectar células con linaje neuronal, anti-GFAP para detectar células gliales e isolectina B4 para detectar células endoteliales y microglía. En la SVZ control (zona contra-lateral) observamos una línea de células endoteliales (Figura 37A y E, en verde), pequeños grupos de neuroblastos localizados debajo de la línea de las células endoteliales (Figura 37A y E, en rojo, flechas) y astrocitos co-distribuidos con los neuroblastos (Figura 37A y E, en azul). En la SVZ tumoral, donde fue implantado el GBM, observamos un incremento en la cantidad de astrocitos alrededor de la masa del tumor, indicando la presencia de una gliosis reactiva inducida por la presencia del tumor (Figura 37B – D y F – H, en azul). Determinamos que el tumor fue infiltrado por células de la microglía (Figura 37C y D, en verde, línea



**Figura 36. Análisis de la matriz extracelular de colágeno en el modelo de GBM subventricular en cerebro de cobayo.**

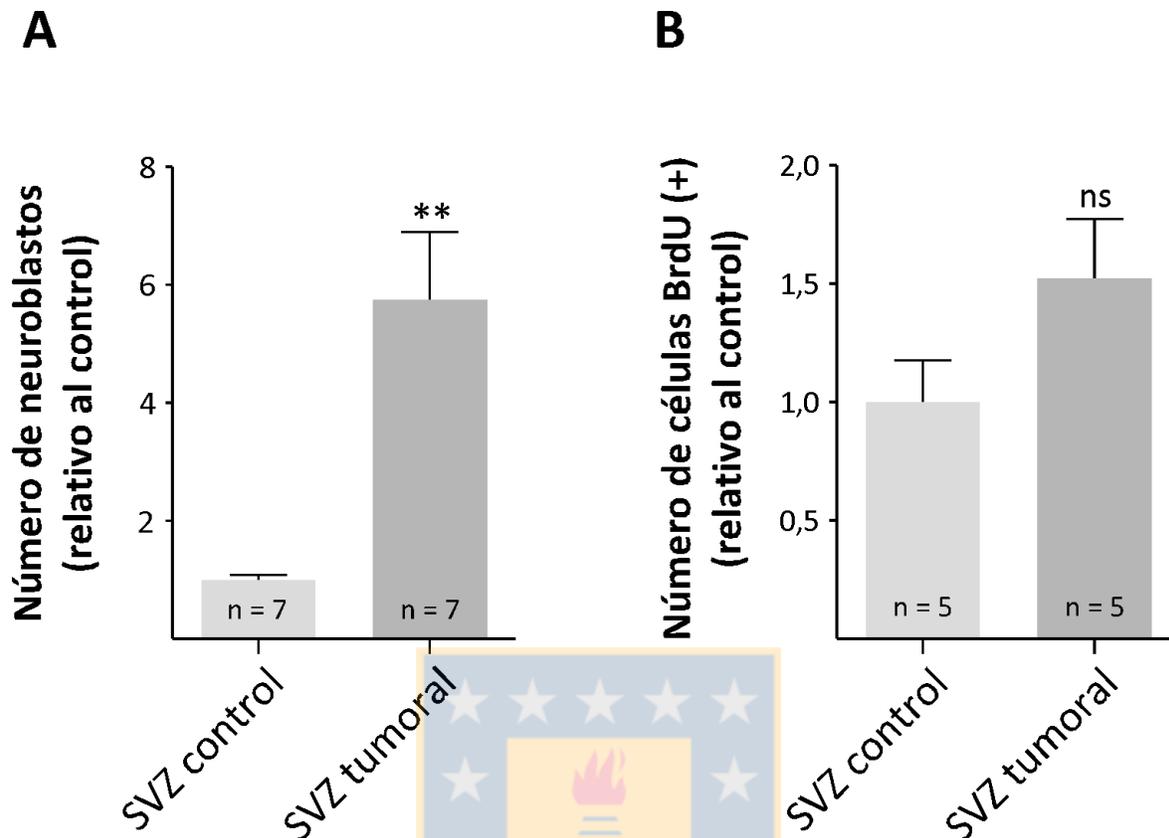
Cortes frontales de GBMs inducidos con las células U87 – MG en la SVZ de cerebros de cobayo, teñidos con la tinción tricrómica de Masson (A – H) y también, analizados por generación de segundos armónicos (SHG) (I – P). (A) Ventriculo contra-lateral utilizado como SVZ control. Mediante la tinción histológica (A – H) y por SHG (I – L), detectamos que los tumores presentan una matriz extracelular rica en colágeno (tinción azul). Adicionalmente, se observa la presencia de vasculatura glomeruloide (F, flechas) y la conexión de la red de colágeno tumoral con vasos sanguíneos adyacentes al tumor (P). (E, F, G y H) Mayores aumentos de A, B, C y D, respectivamente. (M, N, O y P) Mayores aumentos de I, J, K y L, respectivamente. Barras de aumento: A – D: 300  $\mu$ m, E – P: 50  $\mu$ m.

punteada), lo que corrobora los resultados del análisis histopatológico (Figura 35A). Además, notamos que la migración de células tumorales hacia la cavidad de los VLs o la migración de astrocitos reactivos hacia la masa del tumor, provoca una disrupción de la línea de células endoteliales, las que pierden su organización característica como un epitelio cúbico simple (Figura 37B – D y F – H, en verde, flechas). Por otra parte, también encontramos una cantidad muy abundante de neuroblastos localizados en la SVZ adyacente al tumor (Figura 37B – D y F – H, en rojo, asteriscos), una cantidad mucho mayor que en la SVZ control (Figura 37A y E, en rojo, flechas). Para confirmar esta observación, cuantificamos el número de neuroblastos en la SVZ adyacente al tumor y en la SVZ control. Determinamos que existe un aumento significativo de alrededor de 6 veces en el número de neuroblastos adyacentes al tumor con respecto al control (Figura 38A). Posteriormente, nos preguntamos si este aumento en el número de neuroblastos está relacionado a un aumento en la proliferación de células precursoras en la SVZ. Cuantificamos el número de células BrdU positivas en la SVZ adyacente al tumor y en la SVZ control y determinamos que el número de células BrdU positivas presenta una tendencia no significativa al aumento (Figura 38B), sugiriendo que el aumento en el número de neuroblastos no se debe a un aumento en la proliferación; lo cual podría estar más relacionado a una quimioatracción de los neuroblastos hacia el tumor.



**Figura 37. Análisis histopatológico del modelo de GBM inducido en la SVZ del cerebro de cobayo.**

Detección de diferentes tipos células por inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal, utilizando anti-GFAP como marcador glial (1:500, azul), anti-tubulina  $\beta$ III (1:1000, rojo) como marcador neuronal, e isolectina B4 (1:10, verde) como marcador de células endimarias y de la microglía. (A y E) Ventrículo contra-lateral control; se observa la línea de células endimarias (verde) y las agrupaciones de neuroblastos (flechas). (B – D y F – H) Tres tumores inducidos con las células U87 – MG en la SVZ de cerebro de cobayo; se observa una alta infiltración microglial en tumor (C y D, línea punteada), una disrupción de la línea de células endimarias (B, D, F, G y H, flechas), un alto número de neuroblastos adyacentes al tumor (B – D y F – H, asterisco) y una gliosis reactiva rodeando al tumor (B – D y F – H, azul). E, F, G y H, mayores aumentos de A, B, C y D, respectivamente. VL: ventrículo lateral. Barra de aumento: 100  $\mu$ m.



**Figura 38. Cuantificación de neuroblastos y células BrdU positivas en la SVZ adyacente al tumor.**

Cuantificación del número de neuroblastos y de células BrdU positivas en la SVZ control (ventrículo contra-lateral control) y en la SVZ adyacente al tumor en cortes frontales de cerebro de cobayo. Se observa que el número de neuroblastos aumenta más de 5 veces en la SVZ adyacente al tumor con respecto al control (**A**); sin embargo, solo se muestra una tendencia al aumento en el número de células BrdU positivas (**B**). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos pareados, \*\*  $P < 0,01$ .

#### **5.4. Capítulo 4. Estudio del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la progresión de un glioblastoma multiforme humano en el cerebro de cobayo adulto.**

El efecto de vitamina C sobre la progresión tumoral es controversial, los primeros trabajos reportaron varios casos donde el tratamiento con grandes dosis de vitamina C aumentaba el tiempo de supervivencia promedio de los pacientes (Cameron y Pauling, 1976; Drisko y col., 2003). Sin embargo, estudios clínicos posteriores demostraron que no hay diferencias significativas en el tiempo de supervivencia de pacientes con cáncer tratados con altas dosis de vitamina C y tratados con un placebo (Creagan y col., 1979; Moertel y col., 1985). En la mayoría de los casos, los estudios se han enfocado en los efectos de las altas dosis de vitamina C; sin embargo, muy pocos han estudiado el efecto de la deficiencia en vitamina C en la progresión tumoral. Es más, existen pocos estudios que han abordado el efecto de la vitamina C en la progresión de tumores cerebrales como los gliomas y no existen estudios en este contexto que se hayan realizado en gliomas localizados en la SVZ. Mediante un análisis histopatológico, en este capítulo estudiamos el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre varios parámetros de progresión tumoral en un modelo de GBM inducido en la SVZ de cerebro de cobayos. Para este propósito, utilizamos técnicas histológicas, análisis por inmunofluorescencia, cuantificación de células y medición de áreas y volúmenes.

#### **5.4.1. La deficiencia en vitamina C posee un efecto anti-tumoral, reduciendo entre otros, la vasculatura glomeruloide y la infiltración de células de la microglía.**

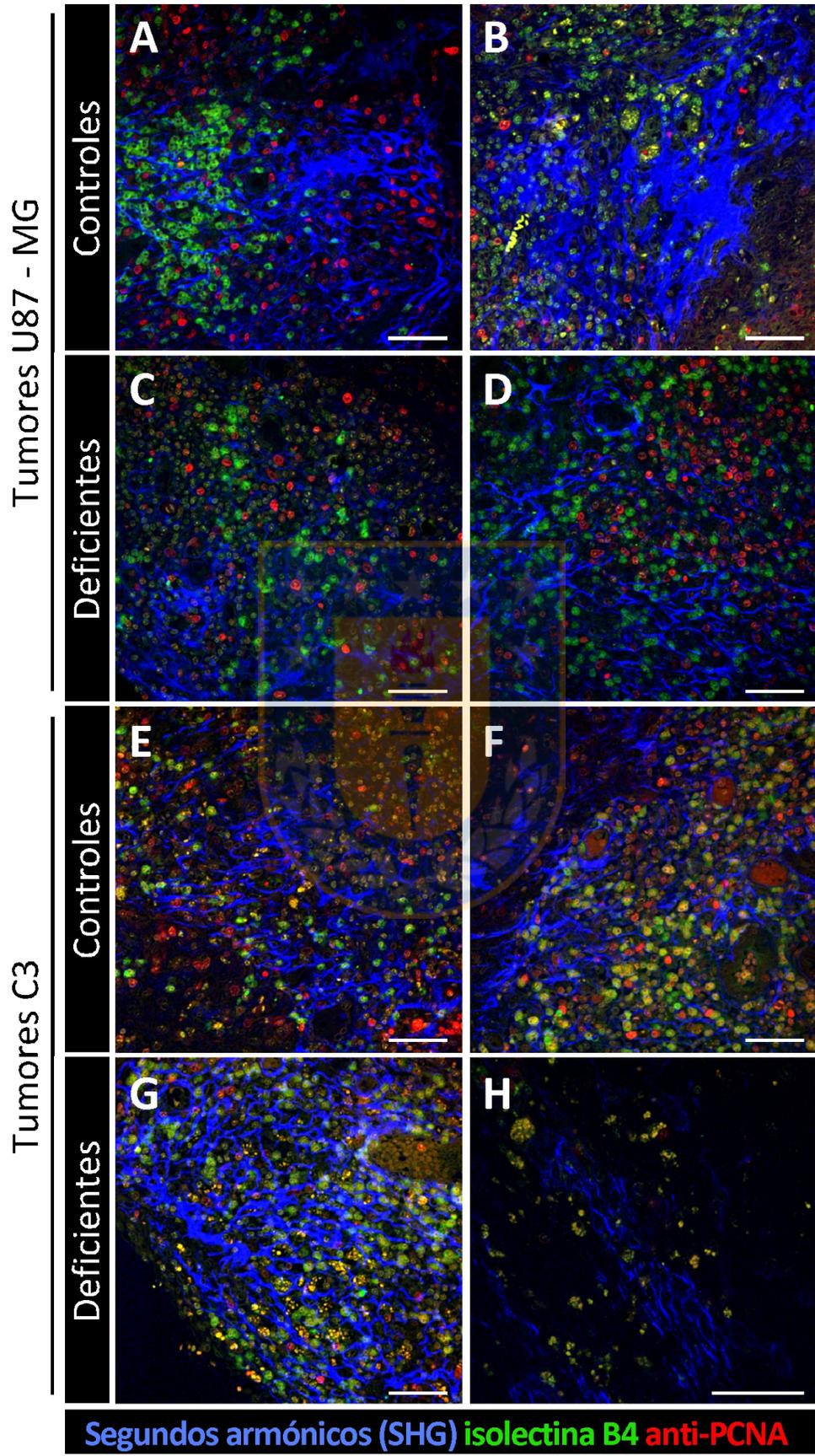
Para definir el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre diferentes parámetros histopatológicos asociados a la progresión tumoral de un GBM, generamos 46 GBMs, de los cuales, 14 fueron inducidos con células U87 – MG en cobayos control, 13 fueron inducidos con células U87 – MG en cobayos con deficiencia en vitamina C, 9 fueron inducidos con células C3 en cobayos control y 10 fueron inducidos con células C3 en cobayos con deficiencia en vitamina C.

En una primera instancia, para determinar si la deficiencia en vitamina C afecta la generación de una matriz extracelular de colágeno, analizamos cortes frontales de tumores U87 – MG y tumores C3 en las condiciones deficiente y control (Figura 39). En tumores U87 – MG, determinamos que en la condición de deficiencia en vitamina C se mantiene la generación de la matriz extracelular de colágeno (Figura 39C y D, fibras en azul); sin embargo, la densidad en la deposición de las fibras es levemente menor en comparación a la condición control (Figura 39A y B, fibras en azul). En tumores C3, determinamos que la deposición de colágeno fue menor que en tumores U87 – MG (Figura 39E y F), y por otro lado, en la condición de deficiencia observamos un tumor con mayor (Figura 39G) y otro con menor deposición de colágeno (Figura 39H) que en los tumores en la condición control. De esta forma, en tumores U87 – MG la deficiencia de vitamina C afectó de forma leve la generación y deposición de colágeno; sin embargo, los resultados no nos permitieron establecer diferencias en tumores C3 en las condiciones control y deficiente.



**Figura 39. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la generación de la matriz extracelular de colágeno.**

Detección de colágeno mediante generación de segundos armónicos en cortes frontales de tumores inducidos con células U87 – MG (A – B) y con células C3 (E – H), marcados con Isolectina B4 para detectar células de la microglía y anti-PCNA para detectar células proliferativas. Se observa que en los tumores U87 – MG en condiciones de deficiencia en vitamina C (C y D, fibras en azul) y en tumores C3 en la misma condición (G y H, fibras en azul) se generó una matriz de colágeno en un nivel comparable a sus respectivos controles (A, B, y E, F, fibras en azul). Barra de aumento: 50  $\mu$ m.

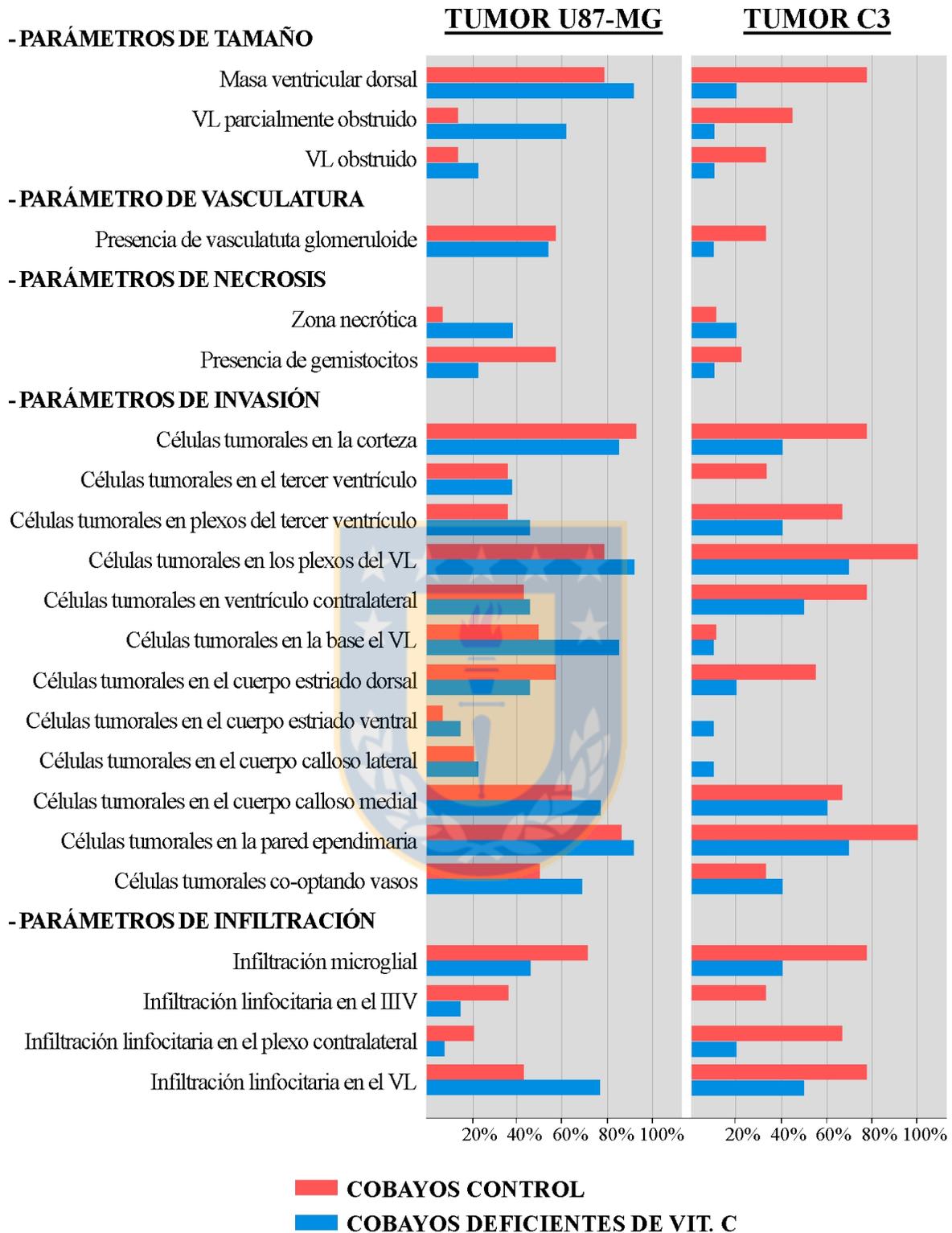


A continuación, analizamos 22 parámetros histopatológicos en cada uno de los cortes del seriado de cada uno de los tumores generados (46 tumores). De esta forma, para cada condición experimental, determinamos el porcentaje de los tumores en que observamos la presencia de cada uno de los 22 parámetros (Figura 40); por ejemplo, en tumores inducidos con células U87 – MG determinamos que existe una masa ventricular dorsal en un 80% de los tumores en cobayos control (Figura 40, barras en rojo) y en un 92% de los tumores en cobayos deficientes (Figura 40, barras en azul); sin embargo, en tumores inducidos con células C3, determinamos que existe una masa ventricular dorsal en un 78% de los tumores en cobayos control y en solo un 20% de los tumores en cobayos deficientes en vitamina C (Figura 40). Para facilitar el análisis de la figura 40 y debido que no es posible describir en detalle cada uno de los 22 parámetros, dividimos los parámetros en 5 grupos: parámetros de tamaño, parámetros de vasculatura, parámetros de necrosis, parámetros de invasión y parámetros de infiltración (Figura 40). En general, en los tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos deficientes en vitamina C encontramos lo siguiente: que el porcentaje de los tumores que presentan los parámetros de tamaño fue más alto en comparación al porcentaje de los tumores control, luego que el porcentaje de los tumores que presentan los parámetros de invasión y de vasculatura se mantuvo sin una variación importante en comparación al control, y que el porcentaje de los tumores que presentan los parámetros de infiltración fue más bajo en comparación al porcentaje de los tumores control. En relación a los parámetros de necrosis, encontramos que el porcentaje de los tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos deficientes en vitamina C que presentaba el parámetro de zona necrótica fue más alto en comparación al porcentaje de los tumores control; sin embargo, ocurrió lo contrario en el caso del parámetro de presencia de gemistocitos, los que como se señaló más arriba, están asociados a un peor pronóstico. Con



**Figura 40. Comparación de las características histopatológicas de glioblastomas multiformes inducidos en la SVZ de cobayos control y de cobayos con deficiencia en vitamina C.**

Se indujeron 46 GBM, de los cuales 14 fueron inducidos con células U87 – MG (primera columna de resultados) en cobayos control (barras en rojo) y 13 en cobayos con deficiencia en vitamina C (barras en azul), por otra parte, 9 GBM fueron inducidos con células C3 (segunda columna de resultados) en cobayos control (barras en rojo) y 10 en cobayos con deficiencia en vitamina C (barras en azul). A continuación, se analizaron 22 parámetros histopatológicos en cada uno de los cortes del seriado de cada uno de los tumores inducidos. Los parámetros fueron divididos en 5 grupos: parámetros de tamaño, parámetros de vasculatura, parámetros de necrosis, parámetros de invasión y parámetros de infiltración. En general, en tumores U87 – MG inducidos en cobayos con deficiencia en vitamina C, los parámetros de tamaño e invasión fueron más altos, los parámetros de necrosis y vascularización se mantuvieron sin variación, mientras que los parámetros de infiltración fueron más bajos. En tumores C3, los parámetros de necrosis no variaron; sin embargo, los parámetros de tamaño, de invasión, de infiltración y de vascularización fueron menores en cobayos con deficiencia en vitamina C.



respecto a los tumores inducidos con células C3, los resultados fueron muy diferentes. En los tumores inducidos con células C3 en cobayos deficientes en vitamina C encontramos que el porcentaje de los tumores que presentaban los parámetros de necrosis no varió; sin embargo, encontramos que el porcentaje de los tumores que presentaban los parámetros de tamaño, de vasculatura, de invasión y de infiltración, fue más bajo en comparación al porcentaje de los tumores control. A continuación, describimos en detalle los parámetros más relevantes.

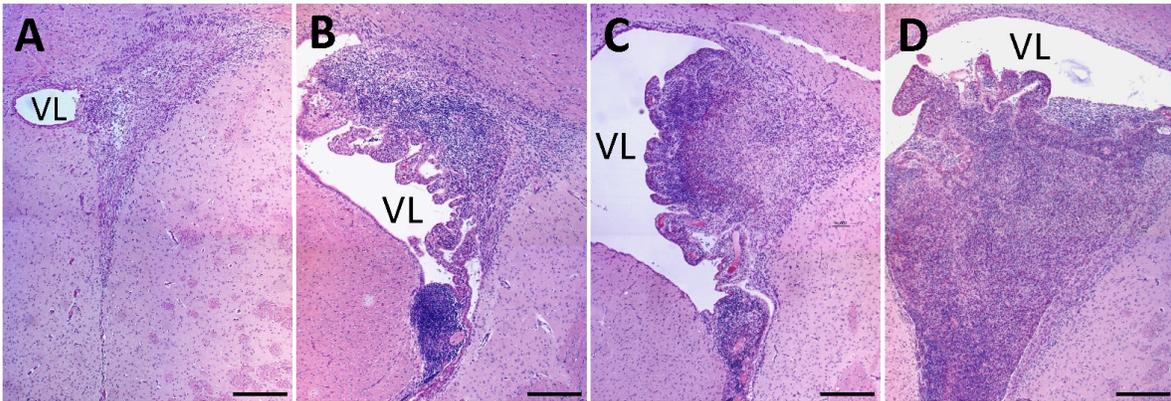
Como fue señalado más arriba, en tumores inducidos con células U87 – MG determinamos que existe una masa ventricular dorsal en un 80% de los tumores en cobayos control y en un 92% de los tumores en cobayos deficientes. A continuación, con el objetivo de analizar en forma más detallada el parámetro de masa ventricular dorsal, presentamos imágenes de 8 tumores representativos inducidos con células U87 – MG (Figura 41), 4 de ellos inducidos en cobayos control (Figura 41A – D) y 4 inducidos en cobayos deficientes en vitamina C (Figura 41E – H). En estas imágenes encontramos, tanto en la condición control como en la condición de deficiencia en vitamina C, una gran masa tumoral localizada principalmente en la región dorsal del VL. Además, notamos que el tamaño de estas masas tumorales es similar en ambas condiciones. Para confirmar esta última observación, realizamos una medición del área de los tumores, considerando el corte histológico donde cada tumor presentaba mayor tamaño (Figura 41I). Encontramos que el promedio de las áreas de los tumores U87 – MG en cobayos control fue de  $0,947 \pm 0,14$  mm<sup>2</sup> y el promedio de las áreas de los tumores U87 – MG en cobayos deficientes en vitamina C fue de  $1,042 \pm 0,16$  mm<sup>2</sup> (Figura 41I), confirmando que el tamaño de masas tumorales es igual en ambas condiciones. Con respecto a los tumores inducidos con células C3, determinamos que existe una masa ventricular dorsal en un 78% de los tumores en



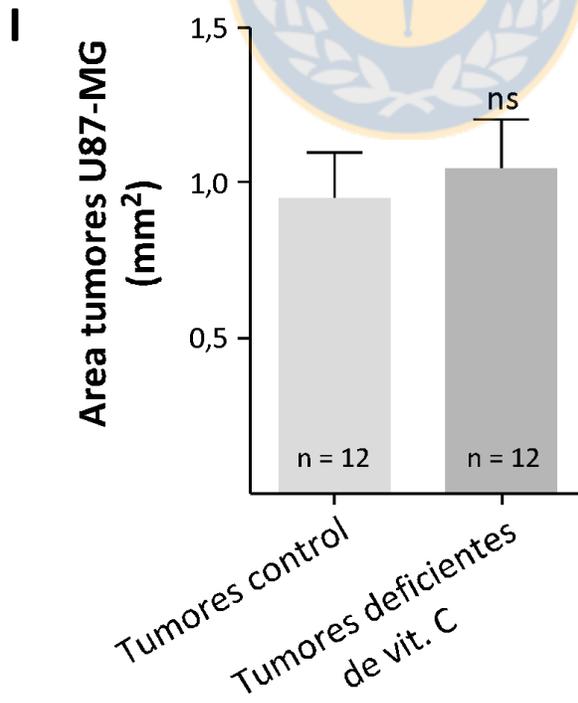
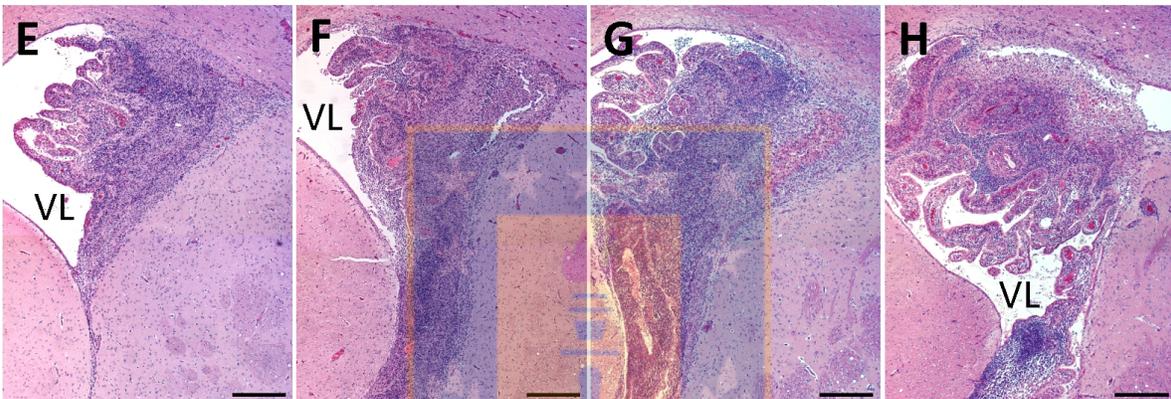
**Figura 41. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de masa ventricular dorsal en tumores U87 – MG.**

Cortes frontales de 4 tumores representativos, inducidos con células U87 – MG en el cerebro de cobayos adultos controles (**A, B, C y D**) y cortes frontales de 4 tumores representativos, inducidos con células U87 – MG en el cerebro de cobayos adultos con deficiencia en vitamina C (**E, F, G y H**) teñidos con hematoxilina-cromótopo. Se observa que los tumores se localizaron en la cavidad de los VL, principalmente en la parte dorsal de los VL, en contacto con la SVZ. Además, se observa que los tumores inducidos en animales controles (**A, B, C y D**) y los tumores inducidos en animales deficientes en vitamina C (**E, F, G y H**) presentan un tamaño similar en su masa tumoral ventricular. (**I**) Se cuantificó el área de las masas tumorales y se determinó que éstas son equivalentes en tumores U87 – MG inducidos en cobayos control y en tumores U87 – MG inducidos en cobayos deficientes en vitamina C. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados,  $n = 24$ . ns: no significativo. VL: ventrículo lateral. Barra de aumento: 300  $\mu$ m.

Tumores U87-MG control



Tumores U87-MG deficientes de vit. C



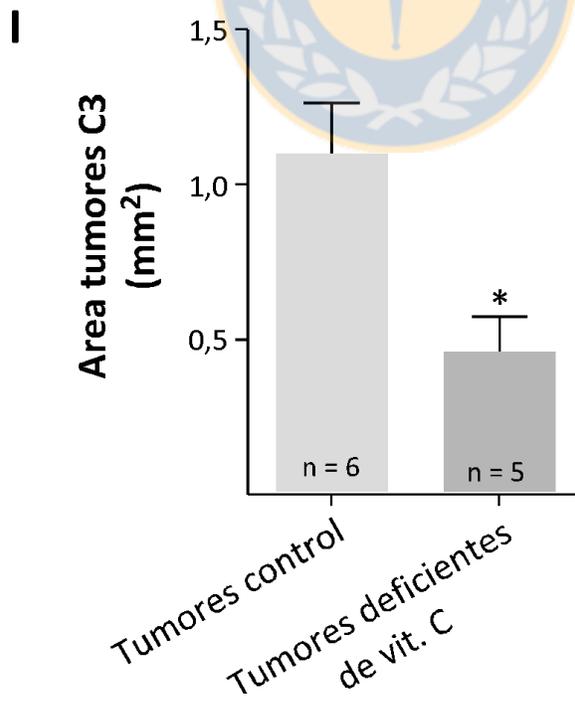
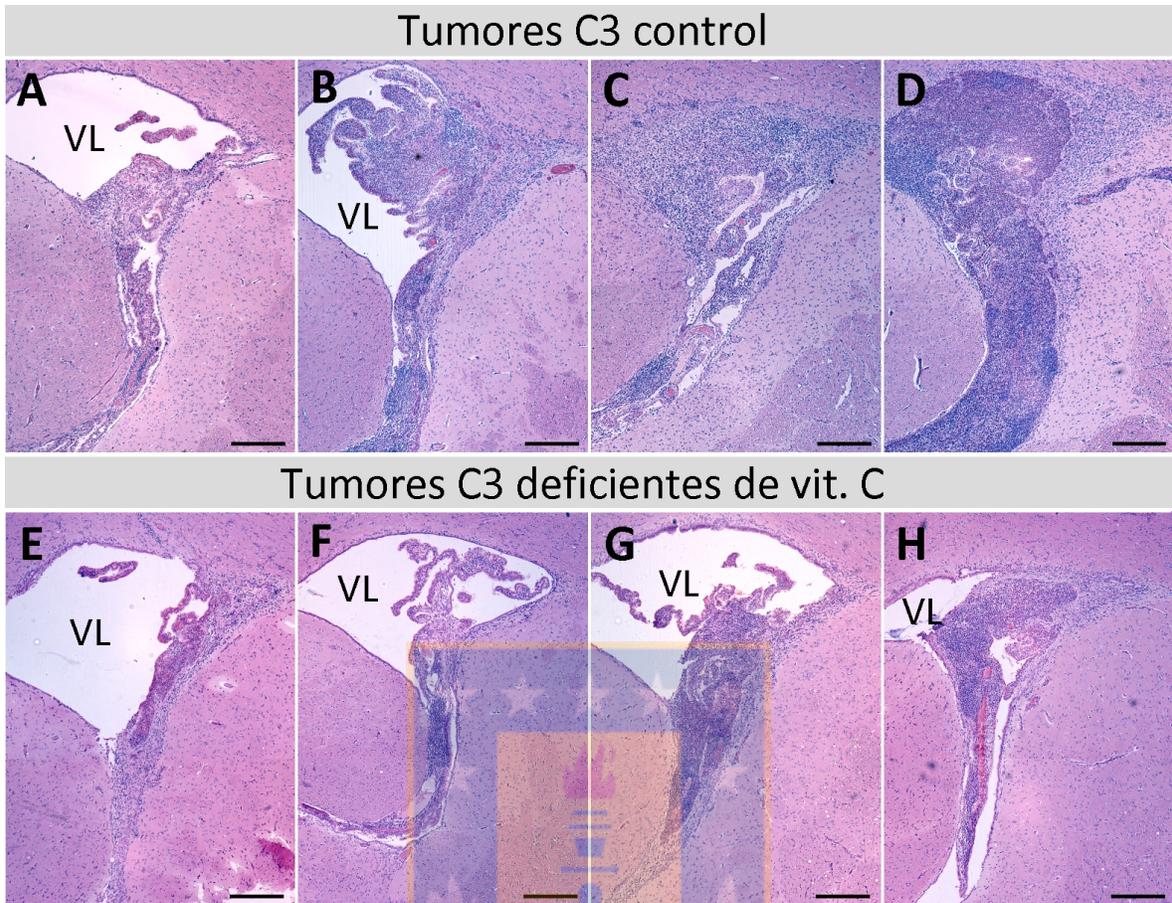
cobayos control y en solo un 20% de los tumores en cobayos deficientes en vitamina C. También analizamos en forma más detallada el parámetro de masa ventricular dorsal, presentando imágenes de 4 tumores inducidos en cobayos control (Figura 42A – D) y 4 tumores inducidos en cobayos deficientes en vitamina C (Figura 42E – H). Similar a lo observado en tumores U87 – MG, comprobamos que la masa tumoral se localiza principalmente en la región dorsal de ventrículo lateral; sin embargo, a diferencia de los tumores U87 – MG, los tumores C3 inducidos en animales deficientes en vitamina C presentan un tamaño notoriamente menor en su masa tumoral ventricular al comparar con los tumores inducidos en animales controles. Realizamos una medición del área de los tumores, considerando el corte histológico donde cada tumor presentaba mayor tamaño (Figura 42I). Determinamos que el promedio de las áreas de los tumores C3 en cobayos control fue de  $1,091 \pm 0,16 \text{ mm}^2$  y el promedio de las áreas de los tumores C3 en cobayos deficientes en vitamina C fue de  $0,452 \pm 0,11 \text{ mm}^2$  (Figura 42I). De esta forma, confirmamos que los tumores C3 inducidos en cobayos deficientes en vitamina C presentan un área tumoral significativamente menor que los tumores C3 inducidos en cobayos control.

A continuación, para analizar el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre la presencia de vasculatura glomeruloide en los GBMs, determinamos en qué porcentaje de los tumores se encuentra presente este parámetro. Como se presentó en la figura 40, en tumores inducidos con células U87 – MG hay presencia de vasculatura glomeruloide en un 57% de los tumores en cobayos control y en un 54% de los tumores en cobayos deficientes; mientras que, en tumores inducidos con células C3 hay presencia de vasculatura glomeruloide en un 33% de los tumores en cobayos control y el porcentaje de tumores se reduce a un 10% en cobayos deficientes en vitamina C. Posteriormente, analizamos más a



**Figura 42. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de masa ventricular dorsal en tumores C3.**

Cortes frontales de 4 tumores representativos, inducidos con células C3 en el cerebro de cobayos adultos controles (**A, B, C y D**) y cortes frontales de 4 tumores representativos, inducidos con células C3 en el cerebro de cobayos adultos con deficiencia en vitamina C (**E, F, G y H**) teñidos con hematoxilina-cromótopo. Se observa que los tumores se localizaron en la cavidad de los VL y que los tumores inducidos en animales controles (**A, B, C y D**) presentan un tamaño notoriamente mayor en su masa tumoral ventricular al comparar con los tumores inducidos en animales deficientes en vitamina C (**E, F, G y H**). (**I**) Se cuantificó el área de las masas tumorales y se determinó que en tumores C3 inducidos en cobayos deficientes en vitamina C el área tumoral es significativamente menor que en tumores C3 inducidos en cobayos control. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados, \*  $P < 0,05$ .  $n = 11$ . VL: ventrículo lateral. Barra de aumento: 300  $\mu\text{m}$ .



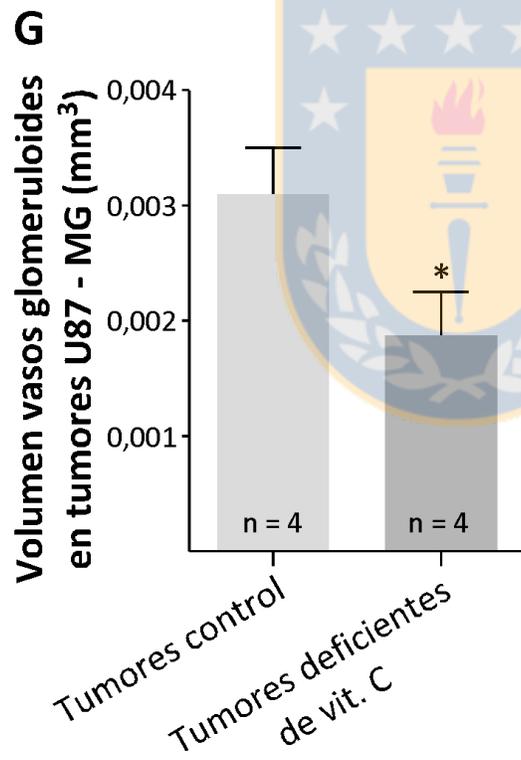
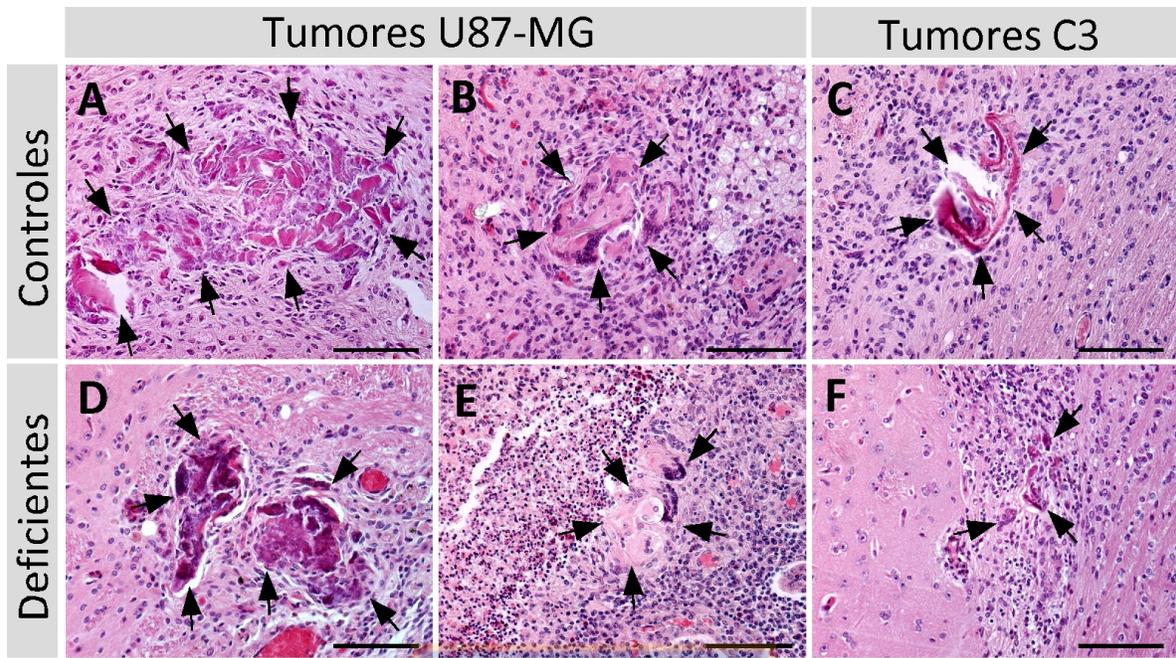
fondo la presencia de vasculatura glomeruloide en cortes frontales teñidos con hematoxilina-cromótopo (Figura 43). En tumores inducidos con células U87 – MG, comprobamos la existencia de vasos glomeruloides en formas y tamaños muy variados, y en dos estadios de desarrollo, maduros (Figura 43A y D) e incipientes (Figura 43B y E). En tumores inducidos con células C3 también observamos estos vasos de formas y tamaños diferentes, pero no observamos presencia de vasos glomeruloides incipientes (Figura 43C y F). Si bien, el tamaño de los vasos glomeruloides fue heterogéneo dentro de una misma condición experimental, notamos en tumores U87 – MG que los vasos glomeruloides presentaban un menor tamaño en cobayos deficientes en vitamina C (Figura 43D, E y F) en comparación con los controles (Figura 43A, B y C). Para confirmar este resultado, cuantificamos los volúmenes de los vasos glomeruloides en tumores U87 – MG (Figura 43G), y determinamos que en cobayos deficientes en vitamina C el volumen de los vasos glomeruloides es menor que en cobayos control (Figura 43G). De esta manera, demostramos en tumores inducidos con células C3, que la vasculatura glomeruloide es menos frecuente en cobayos con deficiencia en vitamina C, y en tumores inducidos con células U87 – MG, demostramos que si bien la frecuencia de aparición de vasos glomeruloides es igual en ambas condiciones, el volumen de estos vasos es significativamente menor en cobayos deficientes en vitamina C.

Posteriormente, para analizar el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre la presencia de zonas necróticas en los GBMs, determinamos el porcentaje de los tumores que presentan este parámetro. En tumores inducidos con células U87 – MG determinamos que hay zonas necróticas en un 7% de los tumores en cobayos control y en un 38% de los tumores en cobayos deficientes; mientras que, en tumores inducidos con células C3 determinamos que hay zonas necróticas en un 11% de los tumores en cobayos control y en



**Figura 43. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de vasculatura glomeruloide en tumores U87 – MG y en tumores C3.**

Cortes frontales de áreas que presentan vasculatura glomeruloide en tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos control (**A** y **B**) y en cobayos con deficiencia en vitamina C (**D** y **E**) y en tumores inducidos con células C3 en cobayos control (**C**) y en cobayos con deficiencia en vitamina C (**F**), teñidos con hematoxilina-cromótopo. En tumores U87 – MG se observaron dos tipos de vasculatura glomeruloide, una madura (**A** y **D**) y una incipiente (**B** y **E**), mientras que en tumores C3 solo presentaban del tipo maduro. También se observó que la vasculatura glomeruloide presenta un menor tamaño en cobayos deficientes en vitamina C (**D**, **E** y **F**) al comparar con los controles (**A**, **B** y **C**). En la cuantificación del volumen de los vasos glomeruloides en tumores U87 – MG (**G**), se determinó que en los tumores deficientes en vitamina C el volumen es significativamente menor que en los tumores control. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados, \*  $P < 0,05$ . Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .



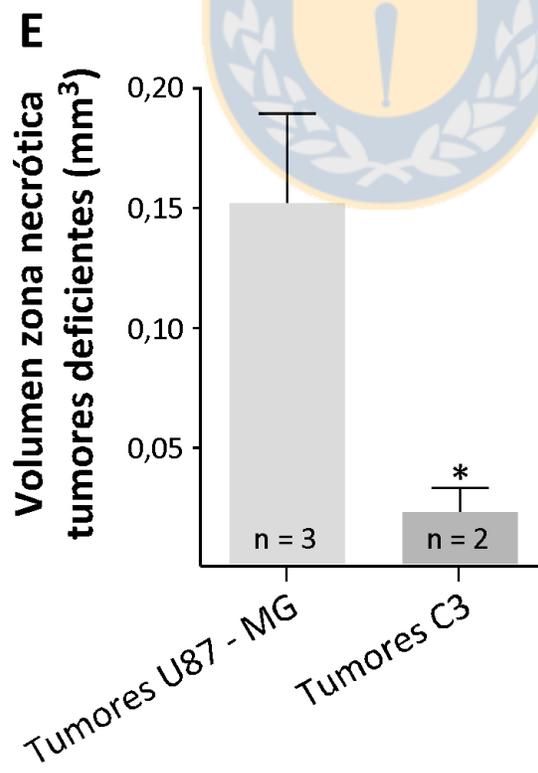
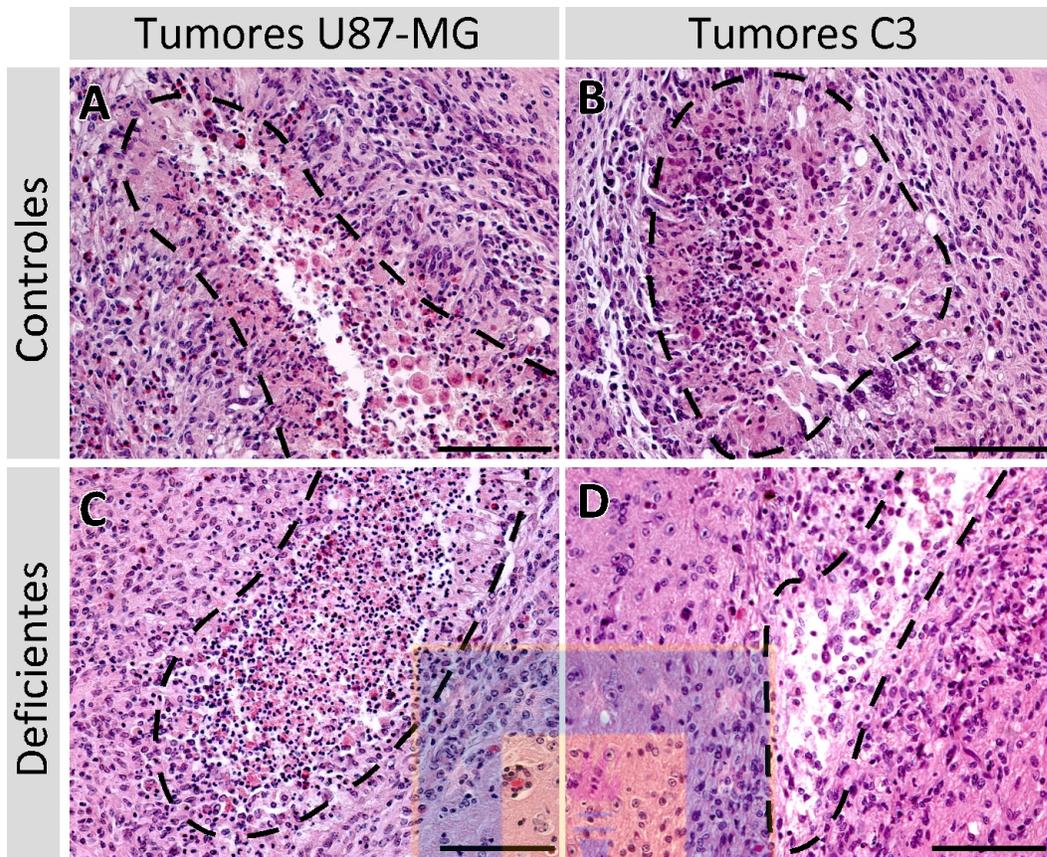
un 20% de los tumores en cobayos deficientes en vitamina C. Posteriormente, analizamos las zonas necróticas en cortes frontales teñidos con hematoxilina-cromótopo en las 4 condiciones experimentales (Figura 44). Observamos que las zonas necróticas presentan las mismas características en tumores U87 – MG y C3 en animales control y deficientes (Figura 44A – D). Como fue descrito en la sección 3.2, las zonas donde se produce necrosis se caracterizan por la presencia de células dañadas, con citoplasmas y núcleos hinchados, también por la presencia de núcleos fragmentados y por un aumento en la fragilidad en relación a la preservación de la estructura del tejido (Figura 44A – D). Lo último se refiere a que siempre observamos, en las zonas necróticas, una pérdida en la estructura normal del tejido (Figura 44A – D, línea punteada). Luego, medimos el volumen de las zonas necróticas (Figura 44E) y determinamos que éste fue significativamente menor en tumores C3 en animales deficientes en comparación a tumores U87 – MG en animales deficientes (Figura 44E). En cuanto al volumen de las zonas necróticas en tumores U87 – MG control y en tumores C3 control, éste no fue considerado debido a que en ambos casos el n fue igual a 1 (Figura 40).

A continuación, para analizar la capacidad invasiva de los GBMs, determinamos el porcentaje de los tumores que presentan el parámetro de presencia de células tumorales en el cuerpo estriado dorsal, tomándolo como un ejemplo de parámetro de invasión. En tumores inducidos con células U87 – MG determinamos que hay presencia de células tumorales en el cuerpo estriado dorsal en un 57% de los tumores en cobayos control y en un 46% de los tumores en cobayos deficientes; mientras que, en tumores inducidos con células C3 determinamos que hay presencia de células tumorales en el cuerpo estriado dorsal en un 55% de los tumores en cobayos control y solo en un 20% de los tumores en cobayos deficientes en vitamina C. Ahora bien, debido a que los parámetros de invasión son numerosos, no podemos mostrar un análisis de cada uno en las 4 condiciones



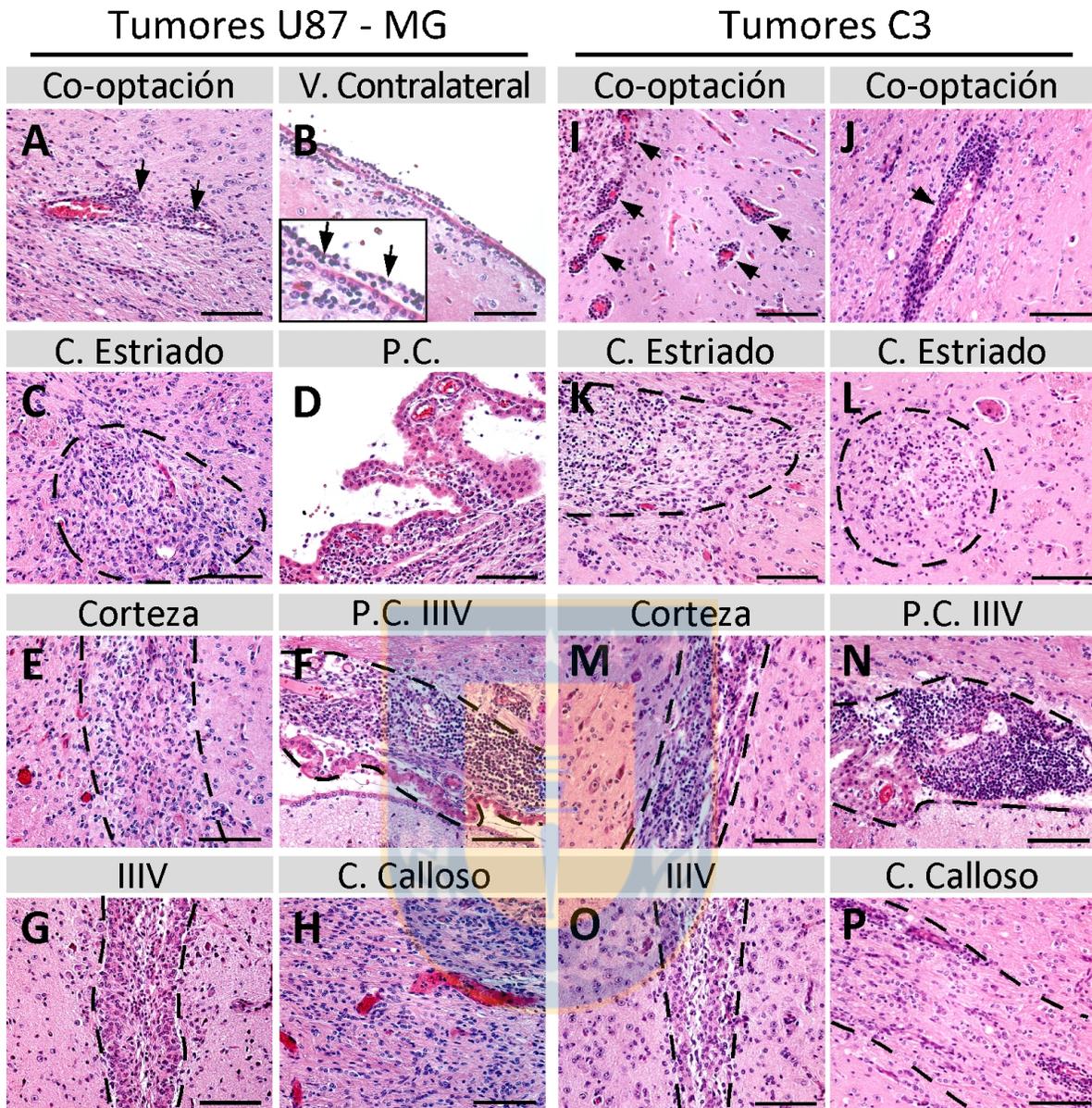
**Figura 44. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de zona necrótica en tumores U87 – MG y en tumores C3.**

Cortes frontales de las zonas necróticas en tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos control (A) y en cobayos con deficiencia en vitamina C (C) y en tumores inducidos con células C3 en cobayos control (B) y en cobayos con deficiencia en vitamina C (D), teñidos con hematoxilina-cromótopo. En tumores U87 – MG y en tumores C3, se observó un mayor porcentaje de áreas necróticas en cobayos deficientes en vitamina C. Al cuantificar el volumen de las zonas necróticas (E), determinamos que el volumen en los tumores U87 – MG en cobayos deficientes en vitamina C es significativamente mayor que en los tumores C3 deficientes en vitamina C. Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados, \*  $P < 0,05$ . Barra de aumento: 100  $\mu\text{m}$ .



experimentales. Por esta razón, en la figura 45 presentamos una compilación de algunos de los parámetros de invasión encontrados en los tumores control. En tumores U87 – MG control, demostramos la presencia de células tumorales co-optando vasos sanguíneos (Figura 45A, flechas), la presencia de células tumorales en el ventrículo contra-lateral (Figura 45B, flechas e inserto), en el cuerpo estriado adyacente al ventrículo que porta el tumor (Figura 45C, línea punteada), en los plexos coroideos (Figura 45D), en la corteza cerebral (Figura 45E, línea punteada), en los plexos coroideos del tercer ventrículo (Figura 45F, línea punteada), ocupando la cavidad del tercer ventrículo (Figura 45G, línea punteada) y en el cuerpo calloso (Figura 45H, línea punteada). En tumores C3 control, determinamos la presencia de células tumorales co-optando vasos sanguíneos (Figura 45I y J, flechas), en el cuerpo estriado (Figura 45K y L, línea punteada), en la corteza cerebral (Figura 45M, línea punteada), en los plexos coroideos del tercer ventrículo (Figura 45N, línea punteada), en el tercer ventrículo (Figura 45O, línea punteada) y en el cuerpo calloso (Figura 45P, línea punteada), entre otras áreas (datos no mostrados).

Posteriormente, para analizar el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre la infiltración de células de la microglía en los GBMs, determinamos el porcentaje de los tumores que presentan este parámetro. En tumores inducidos con células U87 – MG determinamos que hay infiltración de células de la microglía en un 71% de los tumores en cobayos control y en un 46% de los tumores en cobayos deficientes; mientras que, en tumores inducidos con células C3 determinamos que hay infiltración de células de la microglía en un 78% de los tumores en cobayos control y solo en un 40% de los tumores en cobayos deficientes en vitamina C. Luego, analizamos la infiltración de células de la microglía en cortes frontales de tumores, utilizando los marcadores isolectina B4 (Figura 46, verde) para células de la microglía y Hoechst (Figura 46, azul) para los núcleos. En el



**Figura 45. Análisis de los parámetros de invasión en tumores U87 – MG y en tumores C3.**

Cortes frontales de cerebro de cobayo, teñidos con hematoxilina-cromótopo, donde se observan células tumorales que invadieron distintas regiones del cerebro. En tumores U87 – MG encontramos células tumorales co-optando vasos sanguíneos (**A**, flechas), en el ventrículo contralateral (**B**, flechas), en el cuerpo estriado (**C**, línea punteada), en plexos coroideos (**D**, línea punteada), en la corteza cerebral (**E**, línea punteada), en los plexos coroideos del tercer ventrículo (**F**, línea punteada), en el tercer ventrículo (**G**, línea punteada) y en el cuerpo calloso (**H**). En tumores C3, también se encontraron células tumorales en diversas regiones (**I – P**, flechas y línea punteada). VS: vaso sanguíneo. P.C.: plexo coroideo. IIIV: tercer ventrículo. Barra de aumento: 100  $\mu$ m.

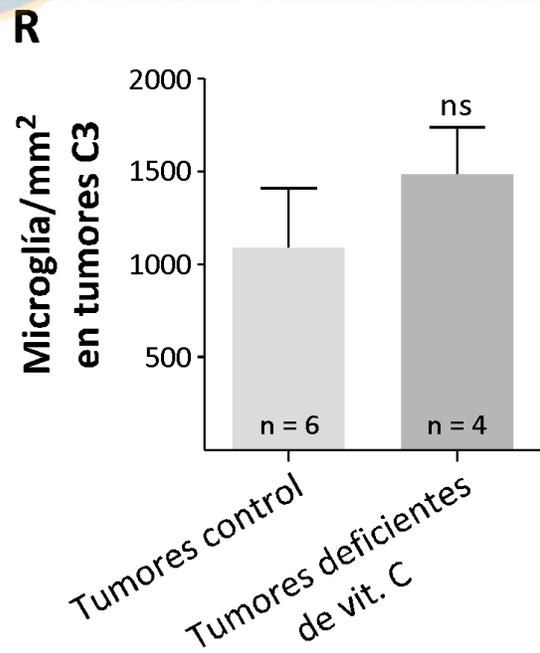
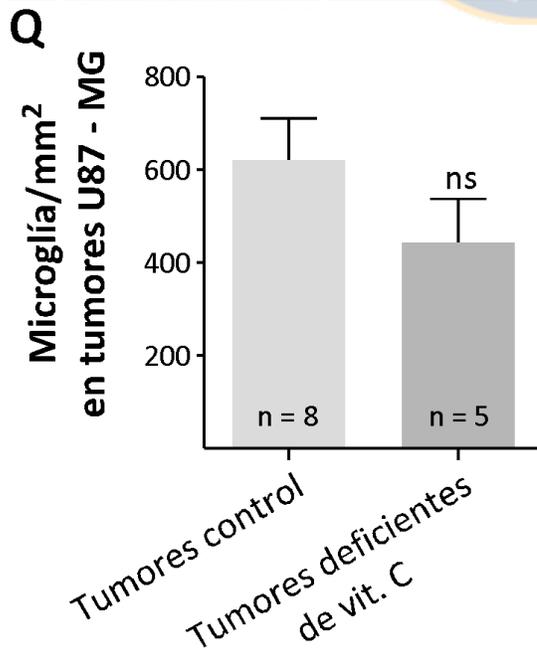
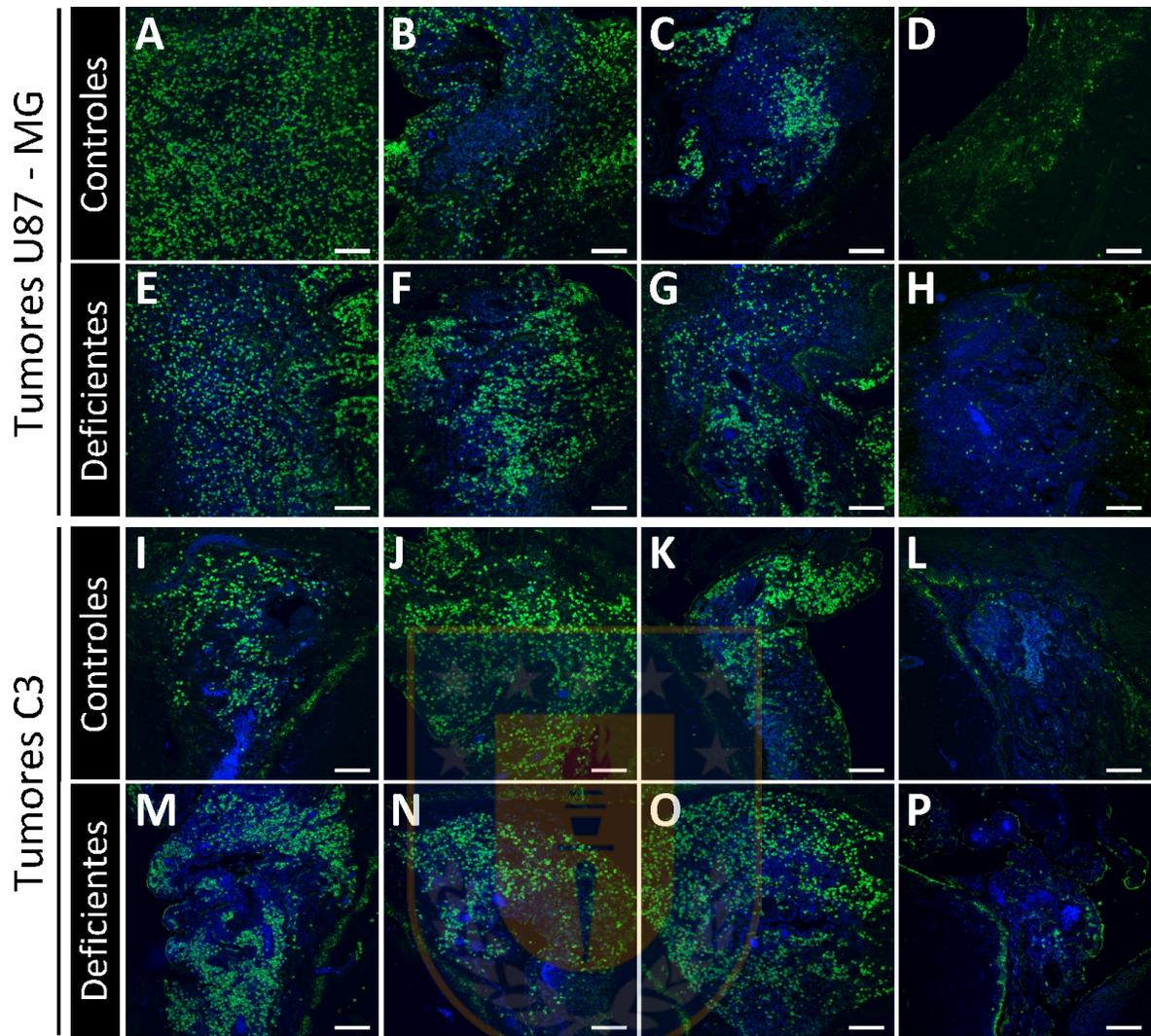
panel de imágenes de la Figura 46, para cada una de las 4 condiciones experimentales, se presentan 3 tumores que fueron ampliamente infiltrados por células de la microglía (Figura 46A – C, E – G, I – K y M – O) y el ejemplo de un tumor que no fue infiltrado (Figura 46D, H, L y P). Cabe señalar que en los ejemplos de tumores no infiltrados (Figura 46D, H, L y P), se observa la marca de isolectina B4; no obstante, ésta se encuentra asociada a células endoteliales, que también son detectadas por este marcador. Cuantificamos el número de células de la microglía por  $\text{mm}^2$  en tumores inducidos con células U87 – MG (Figura 46Q) y en tumores inducidos con células C3 (Figura 46R), sin incluir los tumores donde no se produjo infiltración microglial. Determinamos que en tumores U87 – MG en cobayos control el promedio de células de la microglía por  $\text{mm}^2$  fue de  $621,2 \pm 89,8$  células y en cobayos deficientes en vitamina C el promedio fue de  $443,7 \pm 93,9$  células. En tumores C3 en cobayos control el promedio fue de  $1092 \pm 318,7$  células y en cobayos deficientes en vitamina C el promedio fue de  $1483 \pm 256,2$  células. En conjunto estos resultados demuestran que la infiltración microglial es más frecuente en tumores control, pero que los tumores que fueron efectivamente infiltrados presentan un número de células de la microglía equivalente entre el grupo control y el grupo deficiente en vitamina C.

Para finalizar, incluimos el análisis de un parámetro de proliferación que no se encuentra en el gráfico de parámetros de la figura 40, ya que no fue estudiado en el análisis histopatológico de muestras teñidas con hematoxilina-cromótopo, sino que fue estudiado por separado mediante un análisis de inmunofluorescencia. De esta forma, para definir el efecto que tiene la deficiencia en vitamina C sobre la proliferación de células en los GBMs, realizamos un análisis de inmunofluorescencia en cortes frontales de los tumores, utilizando los marcadores, anti-PCNA (Figura 47, rojo) para células proliferativas y Hoechst (Figura 47, azul) para los núcleos. En el panel de imágenes de la Figura 47, para cada una de las 4



**Figura 46. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el parámetro de infiltración microglial en tumores U87 – MG y en tumores C3.**

Detección por inmunofluorescencia de células de la microglía, utilizando el marcador isolectina B4 (1:5, verde) y el marcador nuclear Hoechst (1:1000, azul). En el panel de imágenes se muestran 4 tumores de cada condición experimental: tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos control (**A – D**), tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos con deficiencia en vitamina C (**E – H**), tumores inducidos con células C3 en cobayos control (**I – L**) y tumores inducidos con células C3 en cobayos con deficiencia en vitamina C (**M – P**). Para cada una de las 4 condiciones experimentales se muestran 3 tumores donde se produjo una infiltración microglial (**A – C**, **E – G**, **I – K** y **M – O**) y un tumor donde no se produjo infiltración (**D**, **H**, **L** y **P**). Se cuantificó el número de células de la microglía en aquellos tumores U87 – MG (**Q**) y tumores C3 (**R**) donde se produjo una infiltración microglial y se determinó que no existen diferencias significativas en el número de células de la microglía en tumores de animales control y deficientes en vitamina C, tanto en tumores U87 – MG (**Q**) como en tumores C3 (**R**). Los datos se presentan como promedio  $\pm$  SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados. Barra de aumento: 100  $\mu$ m.

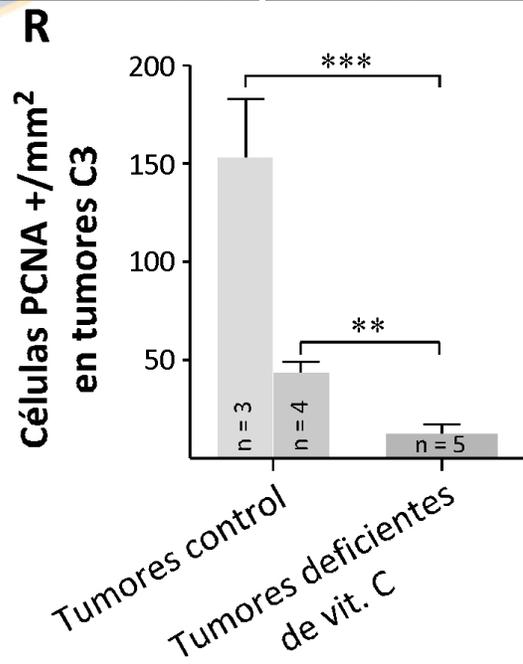
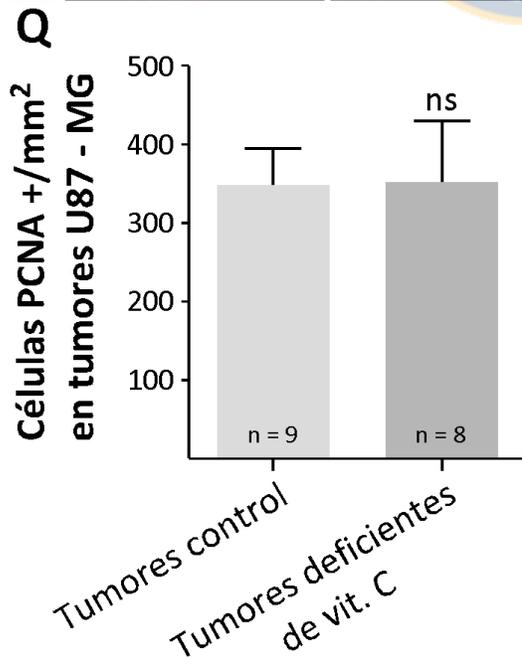
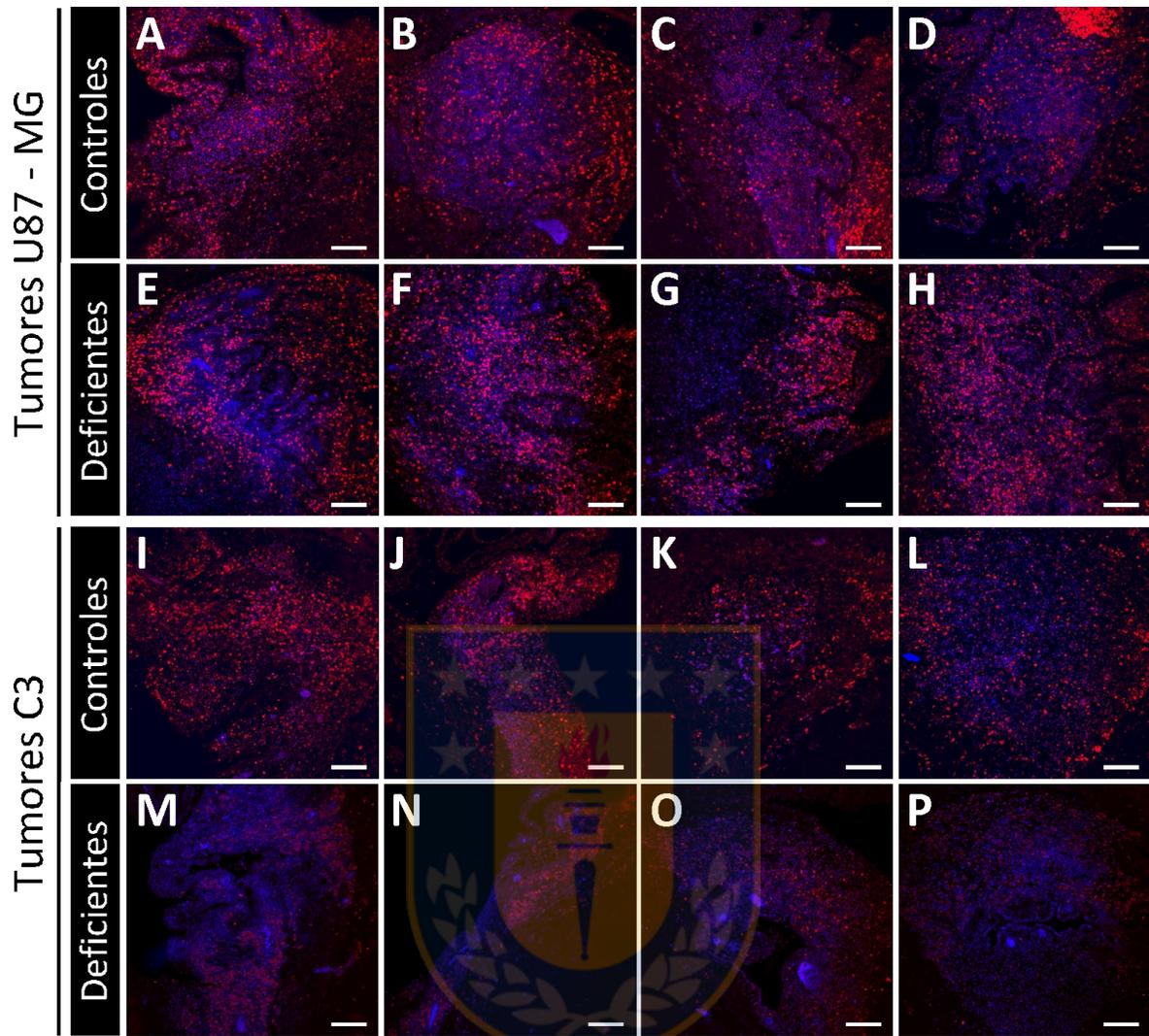


condiciones experimentales, se presentan 4 tumores representativos. En todos los tumores se observa una cantidad muy abundante de células proliferativas PCNA positivas (Figura 47A – L), excepto en tumores inducidos con células C3 en animales deficientes en vitamina C (Figura 47M – P). Cuantificamos el número de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  para cada condición experimental (figura 47Q y R) y determinamos que en tumores U87 – MG control el promedio de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  fue de  $348,6 \pm 46,2$  células y en cobayos deficientes en vitamina C el promedio fue de  $351,8 \pm 78,0$  células (Figura 47Q). En tumores C3, encontramos 2 poblaciones bien definidas en el grupo control, una población con alta densidad de células proliferativas, donde el promedio de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  fue de  $153,3 \pm 29,6$  células y una población con baja densidad de células proliferativas donde el promedio fue de  $43,5 \pm 5,6$  células (Figura 47R). En tumores C3 en cobayos deficientes en vitamina C el promedio fue de  $12,8 \pm 4,6$  células (Figura 47R). De esta manera, demostramos que no existen diferencias significativas en el número de células PCNA positivas entre tumores U87 – MG del grupo control y del grupo deficiente en vitamina C (Figura 47Q); sin embargo, en tumores C3 en animales deficientes en vitamina C, demostramos que el promedio de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  es significativamente menor al promedio en tumores C3 del grupo control, considerando las 2 poblaciones descritas (Figura 47R). Este parámetro de proliferación puede ser relacionado de manera causal al parámetro de masa tumoral (Figura 42), y de esta forma, estos resultados confirman nuestras observaciones previas.



**Figura 47. Análisis del efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la capacidad proliferativa de tumores U87 – MG y de tumores C3.**

Detección por inmunofluorescencia de células proliferativas, utilizando el marcador anti-PCNA (1:400, rojo) y el marcador nuclear Hoechst (1:1000, azul). En el panel de imágenes se muestran 4 tumores representativos para cada condición experimental: tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos control (**A – D**), tumores inducidos con células U87 – MG en cobayos con deficiencia en vitamina C (**E – H**), tumores inducidos con células C3 en cobayos control (**I – L**) y tumores inducidos con células C3 en cobayos con deficiencia en vitamina C (**M – P**). Se observa un alto número de células proliferativas en los tumores de cada condición experimental. Se cuantificó el número de células proliferativas por mm<sup>2</sup> en tumores U87 – MG (**Q**) y en tumores C3 (**R**), determinándose que en tumores U87 – MG el número de células PCNA positivas por mm<sup>2</sup> es equivalente en animales control y en animales deficientes (**Q**). En tumores C3 se observaron 2 poblaciones en el grupo control y en ambas el promedio de células PCNA positivas por mm<sup>2</sup> fue significativamente mayor al promedio en tumores C3 en animales deficientes en vitamina C (**R**). Los datos se presentan como promedio ± SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando un test t-student para datos no pareados, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001. Barra de aumento: 100 µm.



## VI. DISCUSION

En este trabajo de tesis, hemos caracterizado la citoarquitectura y composición celular de la SVZ y de la EVL del cerebro de cobayo adulto. Además, hemos demostrado por primera vez que una deficiencia en vitamina C reduce el potencial proliferativo de la SVZ y por lo tanto, también reduce la generación de neuroblastos en el cerebro de cobayo adulto. Esta reducción en la cantidad de neuroblastos no solo fue observada en la SVZ, sino también en la ruta de migración de los neuroblastos hacia el BO, la EVL. Por otra parte, generamos y caracterizamos un glioblastoma multiforme humano inducido en la SVZ de cerebros de cobayo y finalmente, demostramos que la deficiencia en vitamina C reduce en diferentes grados la progresión de glioblastomas multiformes humanos en cerebros de cobayo, dependiendo del tipo celular con que el glioblastoma fue inducido.

### 6.1. El cerebro de cobayo adulto posee una extensión del ventrículo lateral.

En este capítulo definimos la distribución celular, el potencial neurogénico y la migración de precursores en la SVZ y en la EVL de cobayos adultos. Describimos la ultraestructura de la SVZ y de la EVL de cobayo y los efectos del envejecimiento sobre estas regiones. Además, determinamos que la citoarquitectura de la SVZ de cobayo es similar a la citoarquitectura de la SVZ de ratón (Doetsch y col., 1997; Mirzadeh y col., 2008); sin embargo, algunas características de la SVZ humana también están presentes en el cobayo, destacando la presencia de la EVL, un ventrículo abierto que alcanza el BO (Curtis y col., 2007; Guerrero-Cazares y col., 2011; Kam y col., 2009).

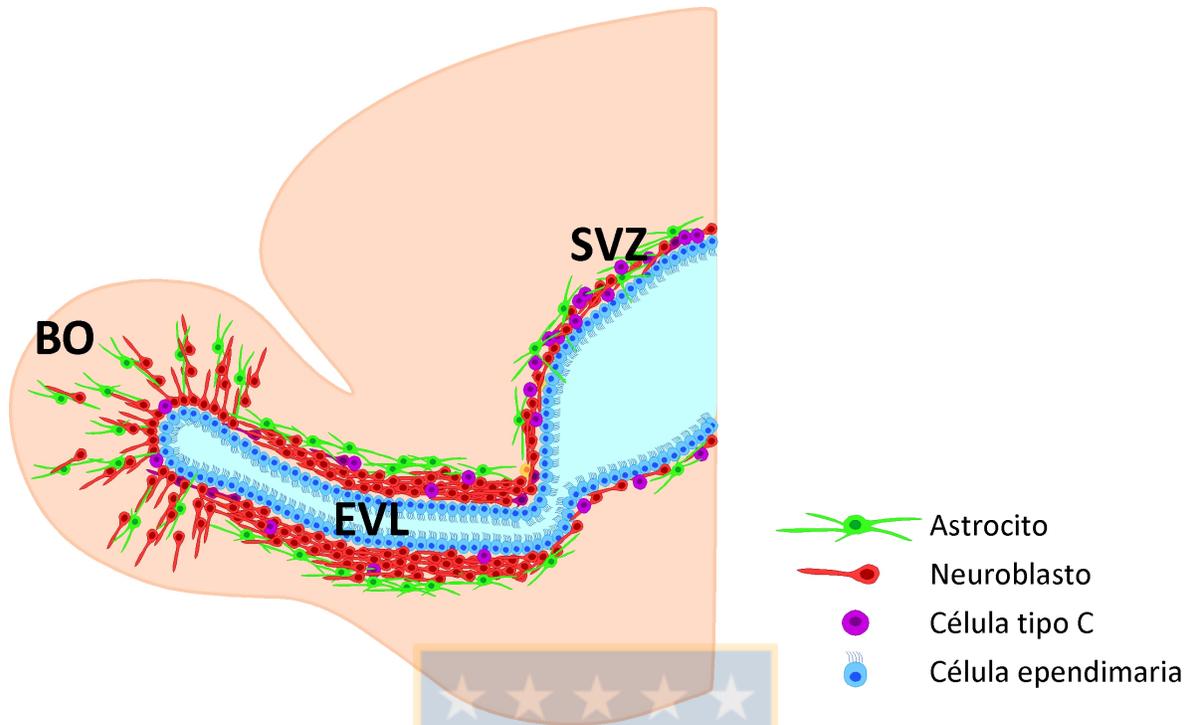
El análisis inmunohistoquímico del cerebro de cobayo nos permitió definir que las células endimarias recubren la superficie de los VLs, separando la SVZ de la cavidad ventricular. También definimos que los neuroblastos se co-distribuyen con los astrocitos y ambos se localizan justo por debajo de la línea de células endimarias. Esta distribución celular coincide con la distribución celular descrita en la SVZ de ratón (Doetsch y col., 1997), conejo (Ponti y col., 2006), y primates (Gil-Perotin y col., 2009; Pencea y col., 2001; Sawamoto y col., 2011). Además, confirmamos que la SVZ de cobayo es un nicho con potencial neurogénico, tal como se ha descrito en varias otras especies (Doetsch y col., 1999a; Doetsch y col., 1999b).

Recientemente, la presencia de un ventrículo abierto en el cerebro adulto que alcanza el BO ha adquirido gran relevancia, debido a la publicación de estudios que describen la presencia de esta clase de ventrículo en el cerebro humano adulto (Curtis y col., 2007; Kam y col., 2009; Sanai y col., 2004; Wang y col., 2011a). Primero se describió la presencia de cavidades ventriculares discontinuas entre la SVZ y el BO, sin encontrarse neuroblastos en migración (Sanai y col., 2004). Luego, se reportó la existencia de una cavidad ventricular continua que alcanza el BO (Curtis y col., 2007). Esta extensión del ventrículo lateral está rodeada por neuroblastos en migración que recuerdan la RMS de ratón (Curtis y col., 2007; Kam y col., 2009). Ahora bien, aún no se ha comprobado la presencia de una RMS y de un ventrículo abierto en el cerebro humano, debido a que no se ha demostrado claramente la presencia de células con morfología migratoria que expresen marcadores de precursores neuronales. Más aún, no se ha realizado ninguna reconstrucción seriada que confirme la existencia de un ventrículo abierto continuo, ni se ha demostrado la presencia de una capa de células endimarias que recubra esta cavidad ventricular en toda su extensión. Sobre un 90% de los cobayos que analizamos, encontramos un ventrículo abierto continuo que estaba

presente en todos los cortes seriados entre el VL y el BO. Adicionalmente, mediante la infusión de peroxidasa, demostramos que el líquido cefalorraquídeo fluye rostralmente a lo largo de la EVL y alcanza el BO. También demostramos que la peroxidasa es capaz de difundir hacia el parénquima adyacente a la SVZ, a la EVL y al BO, acumulándose en el zona más rostral de la EVL, localizada en el BO. Por otra parte, demostramos que las células endimarias recubren todas las cavidades ventriculares analizadas en los cortes seriados y que los neuroblastos están presentes en la SVZ, en la EVL y en el BO. Estos últimos aumentan progresivamente desde la SVZ y hacia el BO, sugiriendo que el BO de cobayo es el destino final para los neuroblastos que se originan en la SVZ (Figura 48).

Con respecto a los nichos neurogénicos periventriculares, se ha propuesto que el líquido cefalorraquídeo contiene moléculas esenciales para el establecimiento de estos nichos cerca de las cavidades ventriculares (Carnicero y col., 2013; Lehtinen y Walsh, 2011; Zappaterra y Lehtinen, 2012). De acuerdo a esto, nos preguntamos si la extensión del VL (EVL) podría estar relacionada con una extensión del potencial neurogénico. Nuestros resultados demuestran un número reducido de células proliferativas a lo largo de la EVL, en comparación con la SVZ, sugiriendo que esta área no posee potencial neurogénico y, por lo tanto, no es un nicho neurogénico. Por el contrario, se ha demostrado la presencia de un gran número de células proliferativas en la EVL del cerebro humano adulto (Curtis y col., 2007). Estas diferencias en nuestras observaciones podrían deberse a los marcadores de proliferación utilizados en cada estudio.

En el cerebro de ratón adulto y en el cerebro adulto de varias especies, los neuroblastos se originan en la SVZ y luego migran hacia el BO (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Lois y col., 1996; Luskin, 1993). Considerando que la EVL no es un nicho neurogénico, quisimos demostrar si los neuroblastos migran hacia el BO, a lo largo de la EVL, en el



**Figura 48. Disposición de las cavidades ventriculares y composición celular de la SVZ y de la EVL en el cerebro de cobayo adulto.**

Esquema de un corte sagital de cerebro de cobayo adulto que muestra la disposición de las cavidades ventriculares, la cavidad del ventrículo lateral y la estrecha cavidad de la EVL. La cavidad de la EVL, así como la SVZ, son revestidas por células endoteliales (en azul). Los neuroblastos (en rojo) se localizan en la SVZ, pero mayoritariamente en la EVL, que corresponde a su ruta de migración hacia el BO. Las células proliferativas (en morado) se localizan principalmente en la SVZ. Por último, los astrocitos (en verde) se co-distribuyen con los neuroblastos en la SVZ, rodean a los neuroblastos en la EVL y se co-distribuyen nuevamente con los neuroblastos en el BO.

cerebro de cobayo. Determinamos que los neuroblastos nacen en la SVZ, que su destino final es el BO y que la EVL corresponde a un ventrículo abierto asociado a una vía de migración, ya que determinamos que el número de neuroblastos en la EVL no disminuyó, ni aumentó, sino que se mantuvo constante (Figura 48).

## **6.2. La citoarquitectura del nicho neurogénico de cobayo presenta características del nicho neurogénico humano.**

En el análisis ultraestructural, el estudio de la morfología celular nos permitió identificar células endimarias multiciliadas, astrocitos, células tipo C y neuroblastos en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo. En la SVZ humana y de ratón, las células endimarias presentan un citoplasma electrón-lúcido y un núcleo redondo (Doetsch y col., 1999a; Quinones-Hinojosa y col., 2006); sin embargo, en la SVZ y en la EVL de cobayo, las células endimarias presentan un citoplasma electrón-denso y un núcleo irregular con profundas invaginaciones. De cualquier modo, se han descrito células endimarias con estas características en la SVZ de mono tití común recién nacido (Sawamoto y col., 2011). Por otra parte, algunas células endimarias de cobayo poseen procesos radiales dirigidos hacia los vasos sanguíneos, en forma similar, a las células endimarias de cerebro humano y de otros primates (Quinones-Hinojosa y col., 2006). Posteriormente, en relación a la morfología de los neuroblastos de la SVZ y de la EVL de cobayo, determinamos que ésta fue idéntica a la morfología de los neuroblastos descrita en la SVZ de ratón (Doetsch y col., 1997), donde las células presentan un núcleo ovalado con grandes y pequeñas agrupaciones de cromatina condensada, y un citoplasma escaso y electrón-denso. Por otro lado, los astrocitos presentan el citoplasma más electrón-lucido, con cuerpos electrón-densos, numerosas mitocondrias y un

núcleo ovalado con cromatina mayormente laxa. Algunos astrocitos tocan la superficie ventricular y hacen contacto directo con el líquido cefalorraquídeo en la SVZ y también en la EVL. Este clase de astrocito ha sido descrito como célula madre neural de la SVZ del cerebro de ratón adulto (Mirzadeh y col., 2008). Los astrocitos fueron observados principalmente en la SVZ, donde ocurre la neurogénesis; por el contrario, en la EVL los astrocitos fueron muy escasos. Respecto a las células tipo C, detectamos pocas de estas células solo en la SVZ. Por último, observamos axones en el lumen de VL y de la EVL. Estos axones presentan un contenido denso y numerosas mitocondrias, y se detectaron haciendo contacto sináptico con astrocitos que contactan el ventrículo, sugiriendo que las NSCs de cerebro de cobayo podrían ser reguladas por axones ventriculares, de forma similar a lo descrito previamente (Tong y col., 2014).

Finalmente, en relación al impacto del envejecimiento en la neurogénesis, estudios previos han descrito una reducción en el número de neuroblastos y de células proliferativas en el cerebro de ratones envejecidos (Ahlenius y col., 2009; Maslov y col., 2004; Shook y col., 2012; Tropepe y col., 1997). Adicionalmente, se ha descrito que los neuroblastos prácticamente desaparecen del cerebro humano a los 7 años de edad (Sanai y col., 2011). Asimismo, observamos una dramática reducción en la cantidad de neuroblastos y de células proliferativas en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo. Cabe destacar, que el ventrículo abierto continuo se conserva en animales envejecidos, demostrando que este ventrículo no está restringido solo a los especímenes jóvenes. Ahora bien, tanto en cobayos jóvenes como envejecidos encontramos cerebros poco comunes que no poseían ventrículos abiertos en ambos hemisferios, que no poseían un ventrículo abierto en uno de los hemisferios, o que presentaban un ventrículo abierto discontinuo. Sumado al problema del tamaño del cerebro humano y a la conservación de las muestras, nuestras observaciones en el cerebro de cobayo

podrían explicar por qué ha sido tan difícil llegar a un consenso respecto de la presencia de la EVL en el cerebro humano.

### **6.3. La deficiencia en vitamina C reduce la neurogénesis en la SVZ del cerebro de cobayo.**

Se ha descrito que el tratamiento *in vitro* de precursores corticales embrionarios con vitamina C promueve la diferenciación hacia neuronas y astrocitos (Lee y col., 2003) y que el mismo tratamiento en células madres embrionarias y en células precursoras del mesencéfalo induce un incremento en la expresión de genes involucrados en neurogénesis, diferenciación y neurotransmisión (Shin y col., 2004; Yu y col., 2004). En la neurogénesis adulta, se ha descrito que el tratamiento *in vitro* de neurósferas aisladas desde la SVZ de rata adulta con vitamina C aumenta la diferenciación hacia un linaje neuronal (Pastor y col., 2013) y que células mitóticamente activas de la SVZ y de la RMS de ratón adulto expresan SVCT2, sugiriendo que la vitamina C posee una función en estas regiones neurogénicas (Pastor y col., 2013). Sin embargo, se desconoce el efecto *in vivo* que tiene vitamina C en el nicho neurogénico de la SVZ del cerebro adulto.

Mediante un análisis inmunohistoquímico del cerebro de cobayos adultos, demostramos que la deficiencia en vitamina C induce una disminución progresiva en la cantidad de neuroblastos encontrados en la SVZ y en la EVL. Determinamos, también que la disminución de neuroblastos es superior al 50% en la SVZ y en la EVL de animales sometidos a una dieta deficiente en vitamina C durante 21 días (Figura 49). En conjunto, estos resultados demuestran que la vitamina C es una molécula esencial para la generación de nuevas neuronas en el cerebro adulto. Lo anterior concuerda con estudios previos de

nuestro grupo realizados *in vitro* (Pastor y col., 2013), donde se describe que neurósferas primarias aisladas de la SVZ de cerebro de rata adulta presentan una alta expresión del marcador troncal, anti-nestina; sin embargo, cuando las neurósferas se tratan con 200  $\mu\text{m}$  de vitamina C, se induce una diferenciación neuronal, incrementando la expresión de tubulina  $\beta\text{III}$  y del transportador de vitamina C, SVCT2 (Pastor y col., 2013). Nuestros resultados también son respaldados por un estudio *in vivo* realizado en la región neurogénica localizada en el hipocampo (Tveden-Nyborg y col., 2009). El estudio describe que la deficiencia en vitamina C afecta el desarrollo normal de cobayos, lo que se evidencia por una capacidad reducida de los animales deficientes para aplicar la memoria espacial como un medio para reubicar el área de la plataforma en el ensayo del laberinto de agua de Morris (MWM) (Tveden-Nyborg y col., 2009). Además, describen que existe un número de neuronas significativamente menor en tres regiones diferentes del hipocampo de animales deficientes al comparar con los controles, y de esta forma, relacionan la pérdida de la memoria espacial a la disminución en el número de neuronas en el hipocampo (Tveden-Nyborg y col., 2009).

A continuación, mediante la utilización de 2 marcadores de proliferación, anti-PCNA y anti-BrdU, demostramos que la deficiencia en vitamina C induce una reducción progresiva en la cantidad de células proliferativas en la SVZ y en la EVL. De esta forma, la disminución de los neuroblastos se relacionaría a una reducción en la cantidad de células proliferativas. Cabe señalar que la reducción de la células proliferativas fue significativa en la SVZ; sin embargo, en la EVL solo se observó una tendencia a la disminución. Lo último puede deberse a la baja cantidad de células proliferativas que se encuentran en la EVL de animales control, por lo que resulta difícil evidenciar diferencias con la EVL de animales deficientes. Se ha descrito que la deficiencia prenatal en vitamina C induce una

disminución significativa del volumen del hipocampo postnatal (Tveden-Nyborg y col., 2012). El estudio no describe diferencias en la proliferación de precursores postnatales, ni en la tasa de sobrevivencia de las neuronas recién generadas en el hipocampo entre animales deficientes y controles; sin embargo, determina que la migración de las nuevas neuronas hacia la capa granular del giro dentado del hipocampo se reduce en forma significativa en animales con deficiencia prenatal en vitamina C (Tveden-Nyborg y col., 2012). Los resultados de este estudio no coinciden con los nuestros, en donde comprobamos que la deficiencia en vitamina C disminuye significativamente la proliferación de células precursoras en la SVZ. Estas discrepancias podrían explicarse por las diferencias inherentes a los nichos neurogénicos analizados. En el giro dentado del hipocampo la capacidad proliferativa es mucho menor a la de la SVZ (Alvarez-Buylla y col., 2008; Zhao y col., 2008), por lo que podría verse menos afectado en este aspecto. Además, se describe que las células proliferativas BrdU positivas de la SVZ y la RMS de rata expresan SVCT2, lo que sugiere un rol de vitamina C en la proliferación de precursores neurales (Pastor y col., 2013).

Por otra parte, la deficiencia en vitamina C podría alterar el número de neuroblastos y de células proliferativas a través de un efecto sobre la matriz extracelular. Se describe que los vasos sanguíneos presentes en la SVZ poseen una lámina basal constituida por laminina y colágeno, y que esta lámina basal se proyecta desde los vasos sanguíneos hacia el área subependimaria (Mercier y col., 2002). Adicionalmente, se describe que estos componentes de la lámina basal son capaces de unir diversos tipos de factores, que en última instancia, pueden modular la neurogénesis (Guan y col., 2012). En este sentido, se sabe que los astrocitos de la SVZ, a través de sus procesos, contactan los vasos sanguíneos (Mirzadeh y col., 2008) y también contactan la lámina basal (Mercier y col., 2002). De esta forma, la

deficiencia en vitamina C puede afectar la síntesis y el depósito de colágeno en la lámina basal, reduciendo la unión de factores que estimulan la proliferación y la neurogénesis.

#### **6.4. La deficiencia en vitamina C altera la morfología de células, y la organización celular en la SVZ y en la EVL de cerebro de cobayo adulto.**

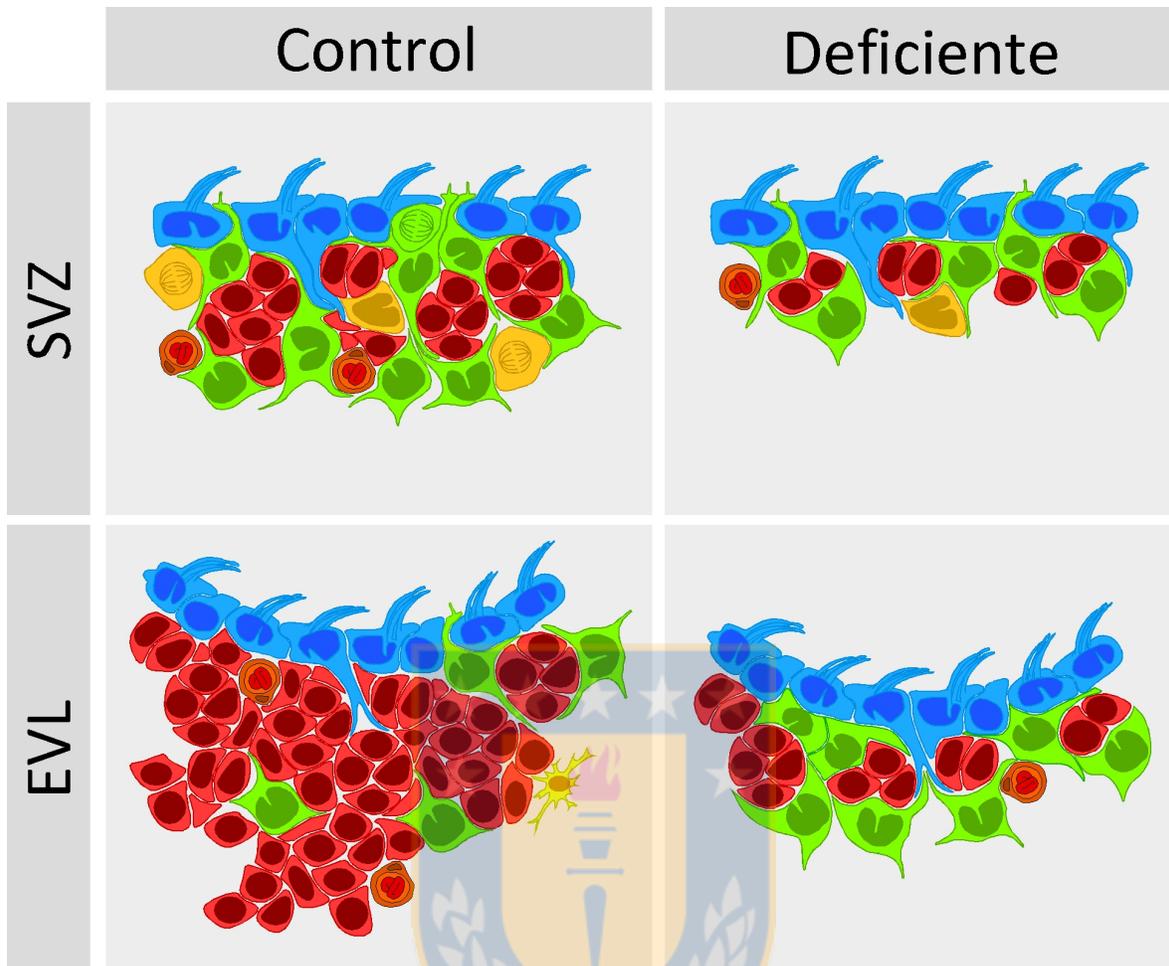
Quisimos definir el efecto de la deficiencia en vitamina C a nivel ultraestructural en la SVZ y en la EVL. Demostramos que tanto la SVZ como en la EVL de animales deficientes, se produce una drástica disminución en la cantidad de neuroblastos, mientras que los astrocitos y las células endimarias se mantienen sin variación con respecto al control. Esta variación en la cantidad de células tiene como consecuencia una reorganización de éstas; mientras que en la EVL control los neuroblastos se localizan bajo la línea endimaria, en la EVL de animales deficientes los astrocitos adquieren esta localización. Por otra parte, demostramos que en la SVZ no existe alteración de la morfología celular; no obstante, en la EVL de animales deficientes, definimos importantes diferencias morfológicas. Las células endimarias control son más planas y con un núcleo regular, mientras que en animales deficientes, las células endimarias presentan una forma cúbica y un núcleo muy irregular. Las células subendimarias también presentan núcleos con tamaño y forma más irregular en la EVL de animales deficientes. Se ha descrito que el aumento en el estrés oxidativo, causado por diversos factores como el envejecimiento, la depleción de enzimas antioxidantes, las convulsiones, entre otros, puede ser aminorado por la acción antioxidante de la vitamina C (Saitoh y col., 2013; Santos y col., 2009; Tamari y col., 2013). Asimismo, la deficiencia en vitamina C tiene como consecuencia un aumento en el estrés oxidativo (Dixit y col., 2015; Harrison y col., 2010a; Harrison y col., 2010b;

Paidi y col., 2014b). Por otra parte, se describe que el tratamiento de fibroblastos de rata (REF52) con bajas dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un incremento intracelular de especies reactivas del oxígeno que a su vez inducen cambios en la morfología celular y en la organización del cito-esqueleto de actina (Alexandrova y col., 2006). Se ha descrito, también, que el tratamiento de un cultivo primario de fibroblastos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca un acortamiento de los telómeros por daño oxidativo y que este acortamiento induce un incremento en la inestabilidad cromosómica, alterando la morfología del núcleo de las células (Coluzzi y col., 2014). Estas evidencias nos llevan a proponer que la deficiencia en vitamina C, a través del incremento en el estrés oxidativo, induce cambios morfológicos tanto en las células como en el núcleo. El hecho de que la alteración en la morfología de las células fuese más evidente en la EVL, podría deberse a que esta área posee una menor disponibilidad a la vitamina C presente en el LCR, y por lo tanto, se genera un daño oxidativo mayor.

En general, la disminución en el número de neuroblastos inducida por una deficiencia en vitamina C, podría explicarse por los siguientes motivos: 1) por la muerte de las células madres, de las células precursoras o de los neuroblastos, 2) por una predominancia en la generación de células gliales versus la generación de neuroblastos, 3) por el cese de la proliferación de las células madres o precursoras y el cese de la posterior diferenciación hacia neuroblastos. En relación al punto 1), durante esta tesis no fue posible evaluar la muerte celular, debido a que el fijador utilizado, la solución Bouin, no es compatible con el ensayo de TUNEL. Además, tampoco se obtuvieron resultados aceptables con el marcador de apoptosis, caspasa-3 clivada (no mostrado). Sin embargo, en el análisis ultraestructural no se observó un mayor número de células apoptóticas en animales deficientes. En cuanto al punto 2), no nos inclinamos por este punto, ya que no

observamos un gran aumento en la cantidad de células gliales, más bien éstas mantuvieron su número. De esta forma, postulamos que la disminución en el número de neuroblastos inducida por una deficiencia en vitamina C se debe al cese de la proliferación de las células madres o precursoras y al subsecuente cese de diferenciación hacia neuroblastos. Esta hipótesis concuerda con nuestros hallazgos: una disminución en la proliferación y en el número de neuroblastos, sin una variación apreciable en la cantidad de células gliales. Adicionalmente, la hipótesis también está conforme a lo descrito en literatura, donde vitamina C modula la proliferación y diferenciación de células madres, células precursoras y neuroblastos (Cao y col., 2012; Choi y col., 2008; Mekala y col., 2013).

En conjunto, estos resultados demuestran la importancia de la vitamina C en los procesos de proliferación, diferenciación y neurogénesis en la SVZ adulta y cómo estos procesos tienen una implicancia en la mantención de la citoarquitectura normal de la SVZ y de la EVL. Esto también tiene una profunda implicancia en clínica, ya que, aún cuando los casos de escorbuto se encuentran prácticamente extintos, existe deficiencia en vitamina C en un porcentaje importante de la población. Se describe que en la población de bajos ingresos/privada materialmente del Reino Unido, el 46% de los hombres y el 35% de las mujeres presenta un estado de deficiencia ( $<11 \mu\text{M}$ ) o de depleción ( $<28 \mu\text{M}$ ) en vitamina C (Mosdol y col., 2008). Por otro lado, en la población estadounidense la prevalencia global ajustada por edad de deficiencia en vitamina C es  $7,1 \pm 0,9\%$ , la que se reduce al aumentar el estatus socioeconómico (Schleicher y col., 2009). En un estudio realizado en jóvenes canadienses de entre 20 y 29 años de edad, se describe que el 14% presenta niveles deficientes en vitamina C (Cahill y col., 2009). Estos estudios analizaron la prevalencia de la deficiencia en vitamina C en países desarrollados, lo que sugiere que la prevalencia puede ser significativamente mayor en países no desarrollados o en vías de desarrollo.



**Figura 49. Efecto de la deficiencia en vitamina C sobre la composición celular de la SVZ y de la EVL.**

Representación esquemática de los cambios en la composición celular de la SVZ y de la EVL inducidos por la deficiencia en vitamina C. En la SVZ, la deficiencia en vitamina C induce una reducción en la cantidad de neuroblastos (en rojo) y en la cantidad de células proliferativas (en amarillo); sin embargo, las células ependimarias (en azul) y astrocitos (en verde) se mantienen. En la EVL, la deficiencia en vitamina C induce una reducción en la cantidad de neuroblastos y un cambio en la morfología celular y nuclear de células ependimarias y de células subependimarias. En relación a los astrocitos, éstos se mantienen o incluso aumentan su cantidad.

Postulamos que, así como ocurre en cobayos, en seres humanos la deficiencia en vitamina C puede tener consecuencias severas en la generación de nuevas neuronas en el cerebro y más aún, si los afectados son niños o mujeres embarazadas.

#### **6.5. El transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayo adulto y su expresión aumenta en condiciones de deficiencia en vitamina C.**

Mediante PCR convencional evaluamos la expresión del ARN mensajero de SVCT2 y mediante un ensayo de Western blot evaluamos la expresión de la proteína SVCT2. Demostramos que el ARN mensajero de SVCT2 y la proteína se expresan en el cerebro de cobayo adulto. En relación a la expresión de la proteína, determinamos la presencia de una banda con una masa molecular de alrededor de 65 kDa. Se ha descrito una banda con una masa molecular aparente de 65 kDa en extractos de cerebro embrionario de rata y en extractos de la línea celular HEK293 de riñón humano embrionario (Caprile y col., 2009). Por otro lado, se describe una banda con una masa molecular aparente de 75 kDa en un extracto de cerebro total de ratón y en un extracto de membranas celulares de cerebro total de ratón (García y col., 2005). Sin embargo, al tratar los estos extractos con la enzima N-glicosidasa F, que cliva las glicosilaciones en asparragina, SVCT2 muestra una masa molecular de 66 kDa (García y col., 2005). Los resultados sugieren que SVCT2 en el cerebro de cobayo presenta una masa molecular de 65 kDa y que al comparar con otras especies, esta masa molecular puede variar dependiendo del nivel de glicosilaciones que presente la proteína.

Mediante PCR en tiempo real, evaluamos el efecto de la deficiencia en vitamina C sobre el nivel de expresión de su transportador, SVCT2, en el cerebro de cobayo.

Demostramos que el nivel de expresión del ARN mensajero para SVCT2 aumenta de manera significativa en el cerebro de cobayos deficientes en relación al control. De esta forma, parece lógico que una condición de deficiencia en vitamina C en el cerebro de cobayos induzca un aumento en los niveles de expresión del ARN mensajero de SVCT2, con el objetivo de elevar los niveles de expresión de la proteína y así compensar los bajos niveles de vitamina C en cerebro de cobayo deficiente. Se ha descrito que la deficiencia crónica en vitamina C pre y post-natal conduce un desbalance redox, por el aumento en la oxidación de ascorbato y de malondialdehído (MDA) en el cerebro de cobayos jóvenes, aunque lo anterior no induce un cambio en los niveles de expresión del ARN mensajero, ni de la proteína SVCT2 (Paidi y col., 2014a). En el mismo sentido, se describe que el ARN mensajero y la proteína SVCT2 no se ve afectada por depleción de vitamina C en la corteza cerebral de ratones adultos incapaces de sintetizar esta vitamina (ratones GULO<sup>-/-</sup>); sin embargo, la depleción de vitamina C sí induce un aumento en la expresión de la proteína SVCT2 en cerebelo y en el hígado (Meredith y col., 2011). Los contrastes entre estos estudios y nuestro hallazgo podrían explicarse por las diferencias en los niveles de vitamina C que se alcanzan en los animales deficientes.

#### **6.6. SVCT2 se expresa en los vasos sanguíneos del cerebro de cobayo adulto.**

A continuación, para evaluar la localización de SVCT2 en el tejido cerebral de cobayos controles y deficientes en vitamina C usamos análisis inmunohistoquímicos, de inmunofluorescencia e inmunoultraestructurales. Mediante el análisis inmunohistoquímico en cobayos control y deficientes, demostramos que en el área de los VLs, SVCT2 se localiza en las células endoteliales, mientras que en la región subependimaria, SVCT2 se

expresa en los vasos sanguíneos. En la región cortical demostramos que SVCT2 se expresa en el soma de neuronas y con mayor intensidad en los vasos sanguíneos. Resultados previos describen la expresión de SVCT2 en células endoteliales del cerebro embrionario de rata (Caprile y col., 2009) y del cerebro adulto (Mun y col., 2006; Pastor y col., 2013). Adicionalmente, se describe la expresión de SVCT2 en la SVZ de rata adulta, específicamente en las células proliferativas del tipo C (Pastor y col., 2013); sin embargo, en esta tesis no se observó una clara reacción de SVCT2 en la SVZ. Con respecto a la expresión en neuronas, nuestros resultados coinciden con lo descrito en forma previa, donde se demuestra que SVCT2 se expresa en neuronas de la corteza cerebral embrionaria y adulta (Castro y col., 2001; García y col., 2005; Mun y col., 2006; Salazar y col., 2014). Ahora bien, la evidencia de la expresión de SVCT2 en vasos sanguíneos del cerebro no ha sido reportada en condiciones fisiológicas. Sin embargo, se ha demostrado que luego de la oclusión de la arteria cerebral media en el cerebro de ratón, se induce la expresión de SVCT2 en células endoteliales de capilares cerebrales localizados en el área isquémica, y por su parte, SVCT2 induce un incremento en la incorporación de vitamina C a través de la barrera hematoencefálica (Gess y col., 2011). Por otro lado, se describe que en cultivos primarios de células endoteliales de microvasculatura de corteza cerebral de ratón se induce la expresión de SVCT2 luego de varios días *in vitro* y adicionalmente, se demuestra el transporte de vitamina C por parte del transportador inducido (Qiao y May, 2008).

Postulamos que la expresión de SVCT2 en cobayo es regulada de una forma diferente a otras especies, como rata y ratón, debido a que los cobayos y también los seres humanos, presentan una isoforma no funcional de la enzima L-gulonolactona oxidasa que cataliza un paso esencial en la síntesis de vitamina C a partir de glucosa en el hígado (Mandl y col., 2009). En este sentido, pensamos que el cobayo y el ser humano podrían

tener en común la forma en que incorporan y distribuyen vitamina C a los diferentes órganos, es decir, podrían tener en común la expresión y localización de los transportadores de vitamina C. En base a lo anterior, evaluamos la localización de SVCT2 en muestras de tejido cerebral tumoral humano y comprobamos que SVCT2 se expresa en los vasos sanguíneos de diferente calibre del cerebro humano y que la expresión presenta un patrón discontinuo en la pared del vaso.

Posteriormente, estudiamos en qué tipo de vasos sanguíneos del cerebro de cobayo se expresa SVCT2. Mediante un análisis de inmunofluorescencia, determinamos que la gran mayoría de los vasos sanguíneos de cerebro de cobayo, pero no todos, expresan SVCT2. Demostramos que todos los vasos sanguíneos que expresan vimentina, también expresan SVCT2, y que algunos vasos sanguíneos que expresan GLUT1, no expresan SVCT2. En vasos sanguíneos que expresan SVCT2 y GLUT1, demostramos que SVCT2 se localiza hacia el lumen del vaso, mientras que GLUT1 se localiza hacia la región abluminal. Además, comprobamos que la expresión de SVCT2 se presenta de manera discontinua en la pared de vasos sanguíneos de mayor calibre. Se ha descrito, que vimentina se expresa en células musculares lisas de arterias musculares (Johansson y col., 1997; Schnitzer y col., 1981). De esta manera, a partir de nuestros hallazgos y lo descrito en literatura, podemos inferir que la expresión de SVCT2 ocurre en células endoteliales presentes en las arterias musculares.

Por último, mediante un análisis inmunoultraestructural, demostramos que SVCT2 se localiza en la superficie apical de células endoteliales de capilares y vasos sanguíneos de un mayor calibre. Adicionalmente, demostramos que SVCT2 se expresa solo en algunas de las células endoteliales que constituyen la pared del vaso sanguíneo. Un hallazgo similar se describió previamente para el transportador de glucosa, GLUT1. Se observó que este

transportador se expresa en forma heterogénea en la pared de los vasos sanguíneos, describiéndose 2 tipos de células endoteliales, las que expresan altos niveles de GLUT1 y las que expresan bajos niveles de GLUT1 (Cornford y Hyman, 2005).

#### **6.7. Las células de glioblastoma multiforme humano, U87 – MG y C3, expresan marcadores neuronales, gliales y troncales.**

Mediante la caracterización inmunocitoquímica de las células de GBM humano, U87 – MG y C3, demostramos que éstas expresan marcadores gliales, neuronales, y troncales. Las células de GBM son consideradas como células gliales transformadas; sin embargo, no solo expresan marcadores gliales, sino que también neuronales y troncales, como por ejemplo: tubulina  $\beta$ III, SVCT2 y nestina. Se describe que una gran variedad de tumores contiene una subpoblación de células tumorales tipo célula madre, denominadas células madres tumorales (Quinones-Hinojosa y Chaichana, 2007; Vescovi y col., 2006). Inclusive, se describe que líneas celulares establecidas, como es el caso de la línea celular U87 – MG, contienen una población de células madres tumorales que forman neurósferas *in vitro* (Yu y col., 2008) y que poseen las capacidades de auto-renovación y multipotencialidad. Dichas capacidades también se han demostrado en las células C3 (Pastor, 2011). De esta forma, el hecho de que una subpoblación de las células tumorales sea multipotente, significa que éstas son capaces de diferenciarse a células con linaje glial o neuronal (Bexell y col., 2009; Fukaya y col., 2010; Yu y col., 2008), lo que explicaría la diversidad de marcadores expresados por las células tumorales U87 – MG y C3.

## **6.8. El modelo de GBM subventricular en el cerebro de cobayo reproduce las principales características histopatológicas de los GBMs humanos.**

Mediante la inyección de un millón de células U87 – MG o de un millón de células C3, generamos GBMs humanos en el cerebro de cobayos adultos. Determinamos que los tumores generados presentan un gran tamaño, extendiéndose hacia la cavidad de los VLs, y que se localizan en contacto directo con la SVZ. Determinamos además, que los tumores presentan una densidad celular alta o hiper celularidad, la que corresponde a una de las características histopatológicas de los GBMs humanos (Holland, 2000).

La Organización Mundial de la Salud ha clasificado los diversos tumores del sistema nervioso central y ha definido las características histopatológicas de cada uno de ellos. El GBM se define como un tumor altamente infiltrativo, compuesto por células y núcleos pleomórficos y caracterizado por la presencia de necrosis o necrosis en pseudoempalizada, proliferación microvascular o vasculatura glomeruloide, satelitosis perineuronal, satelitosis perivascular (co-optación de vasos sanguíneos) y hemorragia (Kleihues y col., 1993; Louis y col., 2007; Urbanska y col., 2014). En modelo de GBM subventricular humano en cerebro de cobayo, demostramos la infiltración de células tumorales en diversas regiones del cerebro, la co-optación de vasos sanguíneos cercanos al área tumoral, la presencia de áreas de necrosis y áreas de necrosis en pseudoempalizada, y la presencia de vasculatura glomeruloide. También demostramos que el tumor fue infiltrado por células del sistema inmune: células de la microglía y linfocitos. Con respecto a las células de la microglía, se describe que cuando están asociadas a los gliomas adquieren características fenotípicas y funcionales consistentes con una actividad inmunosupresora (Li y Graeber, 2012; See y col., 2015) y además, se describe que promueven la

proliferación y la invasión de las células tumorales (Coniglio y Segall, 2013). En forma similar, se describe que en el área tumoral de pacientes con gliomas se produce una infiltración linfocitaria, particularmente de linfocitos T reguladores (CD4+ CD25+) (El Andaloussi y Lesniak, 2006). Se ha demostrado que los linfocitos reguladores inhiben la acción de linfocitos efectores y que su infiltración en gliomas se correlaciona con el grado de malignidad del tumor (Sonabend y col., 2008; Tran Thang y col., 2010).

A continuación, determinamos que luego de dos semanas desde su inducción, nuestro modelo de GBM presenta una matriz extracelular rica en fibras de colágeno. Este resultado coincide con lo descrito en GBMs humanos, donde colágeno de tipo fibrilar se deposita extensamente en los GBMs, y está relacionado a la capacidad de invasión de las células tumorales (Huijbers y col., 2010). En conjunto, estas evidencias demuestran que el modelo de GBM subventricular humano en el cerebro de cobayo reproduce las principales características histopatológicas de los GBMs humanos.

#### **6.9. El modelo GBM subventricular induce una gliosis reactiva, una infiltración microglial y un aumento en la cantidad de neuroblastos en el SVZ.**

Mediante un análisis de inmunofluorescencia, determinamos las características inmunohistoquímicas del modelo de GBM y cómo se altera la estructura de la SVZ. En la SVZ tumoral, donde fue implantado el GBM, demostramos una intensa inmunorreactividad para GFAP y vimentina (no mostrado). En este sentido, se describe que los astrocitos normales responden rápida y drásticamente cuando son sometidos a injurias como isquemias, traumas o tumores cerebrales, transformándose en astrocitos reactivos. Los astrocitos normales expresan GFAP, mientras que la expresión de vimentina es variable.

Cuando los astrocitos normales se convierten en astrocitos reactivos incrementan la expresión de GFAP y vimentina, y se produce una hipertrofia de sus procesos y ramificaciones (Tamagno y Schiffer, 2006). Por consiguiente, la inmunorreactividad para GFAP y vimentina alrededor del tumor representaría a una gliosis reactiva en respuesta a la presencia del tumor.

Por otra parte, en la SVZ tumoral determinamos que se produce una disrupción de la línea de células endimarias, las que pierden su organización característica como epitelio cúbico. Proponemos que la desorganización de este epitelio se debe a que astrocitos reactivos y células tumorales migran hacia el área ventricular, pasando a través de la línea de células endimarias y causando su disgregación.

En la SVZ adyacente al tumor, determinamos que existe un incremento en el número de neuroblastos al comparar con la SVZ control. Al cuantificar, demostramos un aumento significativo de alrededor de 6 veces en el número promedio de neuroblastos adyacentes al tumor. Hipotetizamos que este resultado refleja un aumento de la proliferación de células precursoras de la SVZ, promovida por el microambiente tumoral. Sin embargo, demostramos que el número de células BrdU positivas presenta un aumento no significativo.

Se describe que la migración de los neuroblastos hacia el BO se produce gracias al batir de los cilios de las células endimarias (Sawamoto y col., 2006). El batir de los cilios crea un gradiente de moléculas quimiorrepelentes que orienta rostralmente a los neuroblastos. Entre estas moléculas se describe la proteína secretada por los plexos coroideos, Slit-1, que difunde desde el LCR hacia los neuroblastos en la SVZ, estimulando su migración (Kaneko y col., 2010; Nguyen-Ba-Charvet y col., 2004; Sawamoto y col., 2006). En síntesis, las células endimarias y sus cilios son fundamentales para la correcta

migración de los neuroblastos. En nuestros resultados observamos que el GBM subventricular secuestra y desorganiza la línea de células endoteliales. Esto nos lleva a postular que debido a la desorganización de las células endoteliales, no produce una correcta formación del gradiente quimiorrepelente, y por consiguiente, los neuroblastos dejan de ser guiados hacia el BO y se acumulan alrededor del tumor. Adicionalmente, el gran tamaño de los tumores evitaría la difusión de las señales quimiorrepelentes hacia la SVZ. Esto explicaría que en los tumores de mayor tamaño, se observe una acumulación mayor de neuroblastos (no mostrado).

Por otro lado, postulamos que el aumento en la cantidad de neuroblastos puede deberse a una atracción de éstos hacia el tumor. Se describe que las NSCs de la SVZ exhiben un fuerte tropismo por gliomas en el cerebro de rata, acumulándose en las cercanías del tumor (Aboody y col., 2000; Duntsch y col., 2005; Ehtesham y col., 2004; Lee y col., 2009), y su vez, el tumor secreta factores que promueven la diferenciación de estas NSCs, lo que conlleva a un incremento en la generación de neuroblastos (Bexell y col., 2007). De esta forma, proponemos que el tumor atrae a las NSCs y posteriormente, promueve su diferenciación a neuroblastos, lo que explica el gran número de éstos adyacentes al tumor.

Adicionalmente, se describe que quimioquinas como la proteína quimioattractante de monocitos-1, producida por células microgliales activadas, juegan un rol importante dirigiendo progenitores neurales a sitios de neuroinflamación (Bexell y col., 2007). Esto explicaría la acumulación de neuroblastos adyacentes al tumor y el hecho de que tumores con más células de la microglía acumulen un mayor número de neuroblastos (no mostrado). De esta manera, postulamos que las células de la microglía contribuirían al aumento de neuroblastos alrededor del tumor.

Por último, es importante destacar que nuestro modelo tumoral reproduce las condiciones observadas en gliomas humanos, por lo que su uso en estudios posteriores podría contribuir a establecer conceptos fundamentales para el desarrollo de tratamientos terapéuticos apropiados contra los gliomas o tumores cerebrales.

#### **6.10. La deficiencia en vitamina C posee un efecto anti-tumoral, reduciendo entre otros, la vasculatura glomeruloide y la infiltración de células de la microglía.**

En una primera etapa, mediante la generación de segundos armónicos para la detección de fibras de colágeno, analizamos la matriz extracelular de colágeno en tumores en animales control y deficientes. Demostramos que en la condición de deficiencia en vitamina C se genera y deposita colágeno; sin embargo, esta generación y deposición de colágeno fue levemente menor en tumores U87 – MG en condiciones deficientes al comparar con la condición control. Con respecto a los tumores C3, los resultados no nos permitieron establecer diferencias entre las condiciones control y deficiente. Estos resultados son respaldados por un estudio que describe que la deficiencia en vitamina C en ratones *gulo* *-/-* no tiene un efecto significativo en la hidroxilación de prolina y en la producción de colágeno durante el crecimiento tumoral, sugiriendo que otros factores podrían mantener la hidroxilación de prolina y la síntesis de colágeno *in vivo* (Parsons y col., 2006).

Adicionalmente, se describe que al mantener cobayos en una dieta libre en vitamina C, los niveles de esta vitamina en el tejido disminuyen alrededor de un 10% en una semana. Con dicha disminución, el crecimiento continua normal durante las primeras 2 semanas, lo que se conoce como fase I del escorbuto (Peterkofsky, 1991). Durante las 2 semanas

siguientes (fase II), los cobayos pierden peso y presentan tasas menores en síntesis de colágeno (Chojkier y col., 1983). En nuestro experimento, inyectamos las células tumorales en la segunda semana de la fase I y luego, sacrificamos a los animales al finalizar la primera semana de la fase II. De esta forma, nuestros resultados en relación a la generación y deposición de colágeno en cobayos deficientes, podrían explicarse por una síntesis de colágeno en niveles similares al de los controles, durante la primera semana del crecimiento tumoral que se lleva a cabo durante la fase I del escorbuto.

A continuación, mediante un análisis histológico y de inmunofluorescencia, determinamos el efecto la deficiencia en vitamina C sobre 22 parámetros histopatológicos asociados a la progresión tumoral del GBM. En primer lugar, determinamos el efecto la deficiencia en vitamina C sobre el tamaño tumoral. En tumores U87 – MG determinamos que el porcentaje en que se presenta una masa ventricular dorsal fue equivalente entre tumores en cobayos control y tumores en cobayos deficientes. Mediante la medición del área de los tumores, demostramos que el tamaño de las masas tumorales también fue equivalente entre tumores control y deficientes. Por el contrario, en tumores C3 determinamos que el porcentaje en que se presenta una masa ventricular dorsal fue menor en tumores en animales deficientes. Además, demostramos que los tumores C3 en cobayos deficientes presentan un área tumoral significativamente menor que los tumores C3 en cobayos control. Por consiguiente, la deficiencia en vitamina C demuestra un efecto importante en el tamaño de los tumores C3; sin embargo, no presenta este efecto en los tumores U87 – MG. Los resultados concuerdan con el panorama general del estudio del efecto de vitamina C en cáncer, donde las evidencias son siempre muy controversiales. Los resultados en relación al tamaño de los tumores, fueron respaldados por un análisis de proliferación tumoral, en el cual demostramos que no existen diferencias significativas en

el número de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  entre tumores U87 – MG control y tumores U87 – MG deficientes en vitamina C. Sin embargo, en tumores C3 de animales deficientes demostramos que el promedio de células PCNA positivas por  $\text{mm}^2$  fue significativamente menor con respecto al control.

La vitamina C puede ser incorporada a las células por dos vías: 1) la forma reducida de vitamina C es incorporada por los transportadores SVCTs (Daruwala y col., 1999), 2) la forma oxidada de vitamina C (DHA) es incorporada por algunos transportadores de glucosa, como GLUT1 (Nualart y col., 2003). Postulamos que entre células U87 – MG y células C3 podrían existir diferencias en el nivel de expresión y/o en la localización subcelular de estos transportadores, lo que podría explicar las diferencias en los efectos observados por la deficiencia en vitamina C en ambos tipos celulares.

Otra posible explicación se refiere a lo siguiente. La principal entrada de vitamina C al SNC ocurre a través de los plexos coroideos hacia el LCR que se encuentra en las cavidades ventriculares (Angelow y col., 2003; Ulloa y col., 2013). Las células C3 fueron aisladas desde un GBM subventricular humano (Pastor, 2011), por lo que su origen subventricular, cercano al LCR, podría hacer a estas células más dependientes a la vitamina C que las células U87 – MG que fueron aisladas desde un GBM parenquimal. Esto podría explicar que las células C3 sean más susceptibles a la deficiencia en vitamina C. Otra posible explicación se respalda en numerosos estudios que describen que la vitamina C inhibe la proliferación de células tumorales de diversos tipos de tumores (Fromberg y col., 2011; Gonzalez y col., 2002; Hirakawa y col., 2005; Kim y col., 2006); por el contrario, otros estudios muestran que vitamina C aumenta la proliferación de células madres de diferentes orígenes (Cao y col., 2012; Choi y col., 2008; Mekala y col., 2013; Van Pham y col., 2016; Yang y col., 2006). Las células C3 son células tumorales aisladas de un GBM en

un área neurogénica (Pastor, 2011) y fueron seleccionadas específicamente por su capacidad de formar neurósferas y por su expresión de marcadores troncales, es decir, fueron seleccionadas por sus características de células madre. Respaldados en estas evidencias, postulamos que las células C3, a diferencia de las células U87 – MG, responden en mayor medida a la deficiencia en vitamina C como células madre que como células tumorales.

En relación al parámetro de vasculatura glomeruloide, se describe que los vasos glomeruloides son vasos sanguíneos amorfos que recuerdan los glomérulos renales. Mediante análisis ultraestructurales se ha descrito que los vasos glomeruloides son un manojito de nuevos canales vasculares revestidos por células endoteliales hiperplásicas, rodeados por una lámina basal y una capa incompleta de pericitos (Brat y Van Meir, 2001; Rojiani y Dorovini-Zis, 1996; Wesseling y col., 1995). Este tipo de vasculatura es una de las características histopatológicas de diagnóstico en los GBMs. En nuestro trabajo determinamos la presencia de vasos glomeruloides en los GBMs subventriculares inducidos en el cerebro de cobayos. Adicionalmente, demostramos que el porcentaje en que los vasos glomeruloides se presentan en tumores U87 – MG en cobayos control fue equivalente al porcentaje en tumores en cobayos deficientes en vitamina C; mientras que en el caso de los tumores C3, dicho porcentaje fue menor en tumores en cobayos deficientes.

Se conoce que para su crecimiento los tumores requieren de la presencia de una red de vasos sanguíneos que suministre oxígeno y nutrientes a las células tumorales. En el caso de los tumores altamente proliferativos la masa tumoral crece más rápido que la vasculatura, lo que causa una deficiencia de oxígeno en el tejido tumoral (Bar, 2011; Vaupel y col., 2001). La hipoxia, se define como la ausencia de niveles normales de oxígeno en el tejido y es característica de tumores como los GBMs (Womeldorff y col.,

2014). Las células en hipoxia estabilizan el factor inducible por hipoxia-1, HIF-1, que corresponde a un factor de transcripción que activa la angiogénesis a través de la regulación de genes blanco críticos para estas funciones, entre los que se incluye el factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGF (Kaur y col., 2005). Mediante la inyección local de un vector adenoviral que dirige la expresión de VEGF, se ha demostrado que este factor es capaz de orquestar la formación y la estabilización de los vasos glomeruloides (Sundberg y col., 2001). En síntesis, los tumores altamente proliferativos generarán más hipoxia, estabilizando al factor HIF-1 e induciendo la expresión de VEGF, lo que en última instancia estimulará la formación de vasculatura glomeruloide. Como fue descrito más arriba, en tumores U87 – MG en animales deficientes y controles, y también, en tumores C3 en animales controles demostramos una tasa proliferativa alta; sin embargo, la tasa proliferativa fue significativamente menor en tumores C3 en animales deficientes. De esta forma, la menor tasa proliferativa en tumores C3 en animales deficientes explicaría por que estos tumores presentan vasculatura glomeruloide en un menor porcentaje.

Si bien, en tumores U87 – MG el porcentaje en que los vasos glomeruloides se presentan fue equivalente en las condiciones deficiente y control, demostramos que en tumores U87 – MG en cobayos deficientes el volumen de los vasos glomeruloides fue significativamente menor que en tumores en cobayos control. Al respecto, se conoce que vitamina C actúa como un cofactor en la hidroxilación de residuos de prolina y lisina del colágeno, lo que resulta esencial para el plegamiento apropiado del colágeno y su estabilización (De Tullio, 2012; Murad y col., 1981; Qiao y col., 2009). De esta forma, una deficiencia en vitamina C afecta la deposición de colágeno maduro en vasos sanguíneos y en otros tejidos y órganos (De Tullio, 2012; Murad y col., 1981; Qiao y col., 2009). En este sentido, se describe que la vitamina C es fundamental para la formación de vasos

sanguíneos, por lo que la deficiencia de esta vitamina puede reducir la angiogénesis. A partir de nuestros resultados y los antecedentes expuestos, proponemos que la deficiencia en vitamina C disminuye la formación de nuevos vasos sanguíneos, ya sean vasos sanguíneos normales o vasos sanguíneos glomeruloides. Esto puede explicar el menor volumen de los vasos glomeruloides en tumores U87 – MG en cobayos deficientes y también, el menor porcentaje en que se presentan los vasos glomeruloides en tumores C3 en cobayos deficientes.

En relación al parámetro de necrosis, determinamos que las zonas necróticas ocurren en un porcentaje similar en tumores C3 en las condiciones deficiente y control; sin embargo, en tumores U87 – MG deficientes en vitamina C las zonas necróticas ocurren en un porcentaje mayor en comparación al control. La deficiencia en vitamina C impacta directamente la formación de vasos sanguíneos, esto ha sido demostrado en la formación de vasos sanguíneos normales en *xenografts* de células de carcinoma de pulmón (Telang y col., 2007) y también, en nuestros análisis de vasculatura glomeruloide. De esta forma, postulamos que la deficiencia en vitamina C, a través de su efecto en la formación de nuevos vasos, provocaría una llegada insuficiente de sangre al tumor, provocando la muerte de las células por necrosis y así, induciendo la aparición de zonas necróticas.

Continuando con el mismo parámetro, también demostramos que en animales deficientes el volumen de las zonas necróticas fue un orden de magnitud menor en los tumores C3 al comparar con los tumores U87 – MG. Como se mencionó más arriba, en tumores altamente proliferativos la masa tumoral crece más rápidamente que la vasculatura necesaria para nutrir dichos tumores. Como consecuencia se produce una deficiencia de oxígeno en el tejido tumoral, es decir, se produce hipoxia (Bar, 2011; Vaupel y col., 2001). En respuesta a la hipoxia las células tumorales migran, o sufren apoptosis y/o necrosis,

generando extensas zonas necróticas (Brat y col., 2004; Brat y Van Meir, 2004). De acuerdo a estos antecedentes, en los tumores más proliferativos, se produciría más hipoxia, dando origen a más o mayores zonas necróticas. Este planteamiento permite explicar el hecho de que el volumen de las zonas necróticas fuera significativamente mayor en los tumores U87 – MG, los que presentaban una tasa proliferativa mayor en comparación a los tumores C3.

Por otro lado, se describe que tanto células madres normales como células madres de diversos tipos de tumor son más resistentes a la hipoxia que células normales diferenciadas y células tumorales diferenciadas, respectivamente (Bar, 2011; Romanko y col., 2004). Esto se relaciona a que las células madres en general son quiescentes, por lo que su consumo de oxígeno es mucho menor que células en activa proliferación (Mohyeldin y col., 2010; Suda y col., 2011). Estas evidencias nos permiten proponer que las células C3 presentarían un carácter de células madre superior al de las células U87 – MG, lo que les conferiría una mayor protección frente a la hipoxia. Esto explicaría que los tumores de células C3 exhiban un porcentaje menor de ocurrencia de zonas necróticas y además presenten un volumen de zonas necróticas menor que tumores U87 – MG.

A continuación y en relación al parámetro de invasión, demostramos la invasión de células tumorales en diversas regiones del cerebro de los cobayos portando un GBM; rodeando vasos sanguíneos, en el cuerpo estriado, en el cuerpo caloso, en la corteza cerebral, en el ventrículo contralateral, en los plexos coroideos y ocupando la cavidad del tercer ventrículo. Estos resultados coinciden con lo descrito en GBMs humanos, donde las células de glioblastoma migran largas distancias para invadir diversas regiones del cerebro humano (Holland, 2000; Urbanska y col., 2014). La infiltración de células tumorales resulta de gran malignidad, debido a que pueden ser invadidas regiones vitales del cerebro, no

permitiendo la completa remoción del tumor en las cirugías de resección, lo que termina por la reaparición de estos tumores (Holland, 2000; Urbanska y col., 2014).

Adicionalmente, determinamos que el porcentaje en que ocurrió invasión en diversas regiones del cerebro fue equivalente entre tumores U87 – MG en las condiciones deficiente y control; sin embargo, en tumores C3 el porcentaje de invasión fue menor en tumores de animales deficientes.

Se describe que las células en hipoxia estabilizan el factor inducible por hipoxia-1, HIF-1, el que activa genes relacionados a la angiogénesis y también, a la invasión (Kaur y col., 2005). Se describe que una reducción en la expresión de HIF-1 $\alpha$  en células de glioma humanas y murinas afecta su migración *in vitro* y su invasión en el parénquima cerebral *in vivo* (Mendez y col., 2010). Por otro lado, se ha reportado que la hipoxia incrementa la activación de Notch1, que a su vez induce la expresión del receptor de potencial transitorio 6 (TRPC6) en muestras de GBM. Este último estimula el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la invasión (Chigurupati y col., 2010). Por otra parte, la hipoxia a través de HIF-1 influencia en forma directa el metabolismo de las células, potenciando la glicolisis anaeróbica a través de un incremento en la expresión de transportadores de glucosa (GLUT1 y GLUT3) y de enzimas glicolíticas, lo que se conoce como efecto Warburg (Brahimi-Horn y Pouyssegur, 2007). El aumento en la tasa glicolítica provoca un aumento de la generación del producto final de la glicolisis anaeróbica, el lactato (Vander Heiden y col., 2009). Se describe que la acumulación de este producto provoca una acidificación del medio intra y extracelular, lo que se ha asociado con una mayor malignidad de células tumorales y un estímulo para que éstas migren e invadan otras regiones (Gatenby y col., 2006; Gatenby y Gillies, 2004; Helmlinger y col., 2002). Además, la hipoxia induce la expresión de anhidrasa carbónica 9 (CA9) que también se asocia con una mayor malignidad

en GBM. Esta enzima produce ácido carbónico a partir de CO<sub>2</sub>, contribuyendo a la acidificación del medio y por consiguiente, a la invasión por parte de las células tumorales (Haapasalo y col., 2006; Said y col., 2007; Said y col., 2010).

Respaldados en estos trabajos, proponemos que en tumores C3 la deficiencia en vitamina C altera la invasión de forma indirecta a través de su efecto en la proliferación. De esta forma, una tasa proliferativa significativamente menor en tumores C3 de animales deficientes, no induciría hipoxia o la induciría en un menor grado, por lo que HIF-1 no incrementaría su expresión, no acidificaría el medio y no estimularía la invasión por parte de las células tumorales en el parénquima cerebral. Por el contrario, proponemos que en tumores U87 – MG, la deficiencia en vitamina C no afectó la invasión, debido a que no alteró la tasa proliferativa. Por lo tanto, una tasa proliferativa alta en tumores U87 – MG induciría hipoxia, incrementaría la expresión de HIF-1 y la acidificación del medio, y por último, estimularía la invasión. Ahora bien, no podemos descartar que vitamina C posea una acción directa sobre la migración de células tumorales. Al respecto, se ha reportado que la vitamina C inhibe la invasión de células tumorales (Hirakawa y col., 2005; Nagao y col., 2000; Wybieralska y col., 2008); sin embargo, estas evidencias no coinciden con nuestros resultados en tumores U87 – MG donde no hubo variación en la invasión, y tampoco en tumores C3 donde la invasión fue menor en animales deficientes en vitamina C.

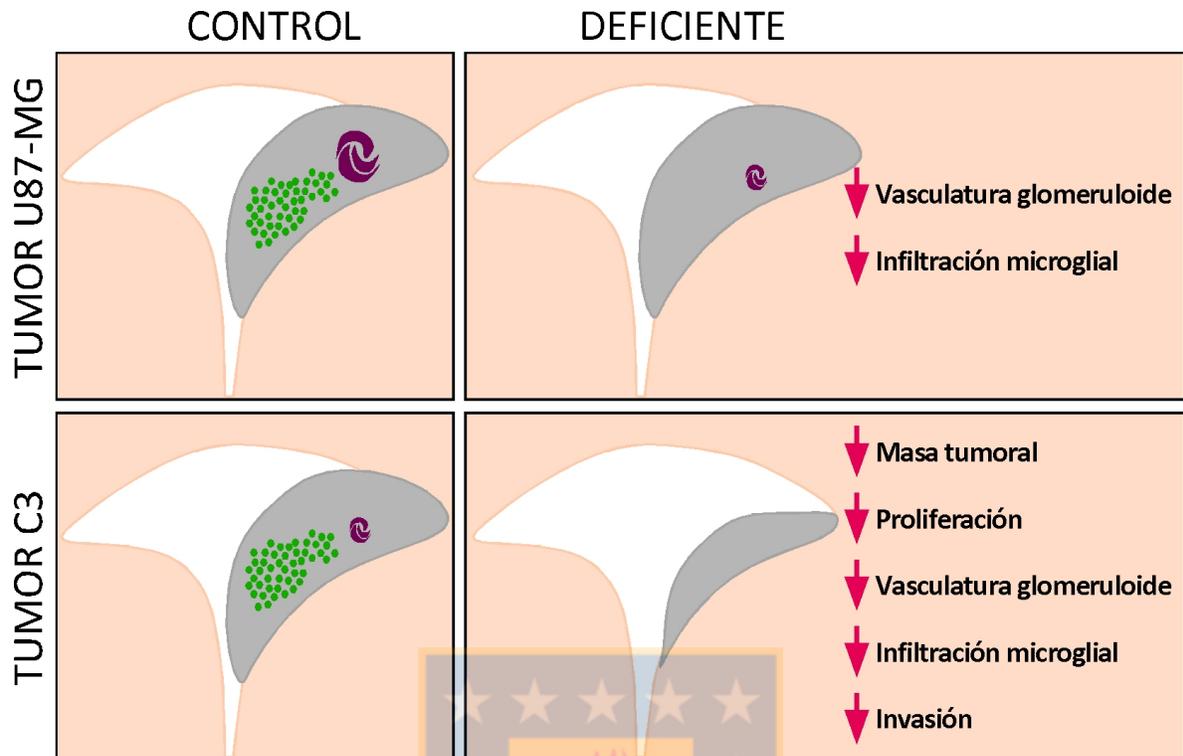
Por ultimo, en relación al parámetro de infiltración microglial, demostramos que el porcentaje en que ocurre infiltración de células de la microglía se redujo aproximadamente a la mitad, tanto en tumores U87 – MG como en tumores C3 en cobayos deficientes en vitamina C con respecto a sus controles. Adicionalmente, demostramos que los tumores que fueron efectivamente infiltrados presentan un número de células de la microglía por mm<sup>2</sup> equivalente entre tumores en animales control y tumores en animales deficientes en

vitamina C. Al respecto, la vitamina C ha sido uno de los micronutrientes más estudiados en relación a la eficiencia del sistema inmune (Sorice y col., 2014; Wintergerst y col., 2006). En humanos se demuestra que la reducción de vitamina C en la dieta por 60 días, de 250 mg a 5, 10 o 20 mg diarios, provoca una respuesta inmune disminuida (Jacob y col., 1991) y que la administración de 1 g de vitamina C y 200 mg de vitamina E por 16 semanas en mujeres ancianas sanas aumenta la quimiotaxis y la fagocitosis de neutrófilos (de la Fuente y col., 1998).

Los macrófagos peritoneales de ratón poseen una concentración de vitamina C intracelular de 3 mM y pueden alcanzar concentraciones de hasta 6 – 8 mM (May y col., 2005). Se describe que los macrófagos utilizan preferentemente la vitamina C como defensa antioxidante durante el estrés celular, ya que durante la fagocitosis de perlas de látex, la concentración de glutatión no varía; sin embargo, la concentración intracelular de vitamina C disminuye (May y col., 2005). Por otro lado, mediante una inyección intraperitoneal de aceite mineral se ha evaluado el efecto de vitamina C en la diferenciación de monocitos a macrófagos en cobayos, demostrando que cobayos deficientes en vitamina C solo desarrollan un 25% del número de macrófagos desarrollados por cobayos control (Ganguly y col., 1976). Adicionalmente, al comparar con los macrófagos en cobayos control, los macrófagos de animales deficientes son menos maduros y presentan una capacidad migratoria alterada (Ganguly y col., 1976). En este contexto, postulamos que las células de la microglía, que corresponden a los macrófagos del SNC, infiltran en un menor porcentaje los tumores inducidos en animales deficientes en vitamina C, debido a que estas células presentarían una menor defensa ante el estrés oxidativo, lo que podría deteriorar varias de sus funciones. Adicionalmente, la deficiencia en vitamina C podría disminuir la

cantidad de monocitos que se diferencian a células de la microglía en el cerebro y también, disminuir la capacidad de migración de las células de la microglía hacia el tumor.

Finalmente, determinamos que la deficiencia en vitamina C tiene como consecuencia una alteración sustancial en varios parámetros de la progresión de los GBMs. En tumores U87 – MG la deficiencia en vitamina C reduce la vasculatura glomeruloide y la infiltración microglial, dos de los parámetros asociados a un peor pronóstico en los GBMs humanos. Aún más, en tumores C3 la deficiencia de vitamina C reduce la masa tumoral, la proliferación celular, la vasculatura glomeruloide, la infiltración microglial y la invasión de las células tumorales en el tejido cerebral. El análisis en conjunto estos resultados, nos permite concluir que la deficiencia en vitamina C ejerce un efecto anti-tumoral sobre las dos líneas celulares analizadas; sin embargo, el efecto fue mucho más exacerbado en la línea celular de mayor malignidad, considerando sus características troncales, su origen subventricular y lo que se desprende de la comparación de los tumores inducidos con ambas líneas celulares en la condición control. De manera interesante, nuestros hallazgos reflejan el panorama general en relación al estudio de esta vitamina en la progresión de diversos tipos de tumores, donde es posible encontrar trabajos en los que se describen efectos anti-tumorales y trabajos en los que se describen efectos pro-tumorales. De esta forma, la amplia gama de efectos observados podrían estar relacionados al origen de las células tumorales, a sus características como células troncales y además, al estado redox de la vitamina C, donde el uso indistinto de ácido ascórbico y de ácido dehidroascórbico podría arrojar resultados completamente opuestos.



**Figura 50. Efectos de la deficiencia en vitamina C sobre la progresión de tumores U87 – MG y de tumores C3.**

Representación esquemática de los cambios en la progresión tumoral inducidos por la deficiencia en vitamina C. En tumores U87 – MG, la deficiencia de vitamina C induce una reducción de la vasculatura glomeruloide y de la infiltración microglial. Ahora bien, en el caso de los tumores C3, la deficiencia en vitamina C induce una reducción de la masa tumoral, de la proliferación, de la vasculatura glomeruloide, de la infiltración microglial y de la invasión de las células tumorales en el parénquima cerebral.

## VII. CONCLUSIONES

1.- El cerebro de cobayo adulto posee una EVL que conecta la SVZ con el BO, de forma similar a lo descrito en el cerebro humano. La EVL está revestida por células endoteliales, y a la vez, está rodeada por neuroblastos que se generaron en la SVZ y se encuentran migrando hacia el BO.

2.- La citoarquitectura de la SVZ del cerebro de cobayo adulto es más semejante a la citoarquitectura de la SVZ de ratón; sin embargo, posee características distintivas de la citoarquitectura de la SVZ humana.

3.- El potencial neurogénico se concentra en la SVZ en el cerebro de cobayo joven y se reduce sustancialmente en animales envejecidos.

4.- En el cerebro de cobayo adulto, la deficiencia en vitamina C reduce progresivamente la proliferación y el número de neuroblastos en la SVZ y en la EVL. Ultraestructuralmente, la deficiencia de vitamina C altera la localización, la composición y la morfología celular en la SVZ y en la EVL del cerebro de cobayo.

5.- El transportador de vitamina C, SVCT2, se expresa en el cerebro de cobayos control y deficientes en vitamina C; específicamente, en las células endoteliales, en las neuronas y en los vasos sanguíneos. SVCT2 también se expresa en los vasos sanguíneos del cerebro humano.

6.- En los vasos sanguíneos de cobayos control y deficientes en vitamina C, la localización de SVCT2 se observa en la superficie luminal de las células endoteliales y su distribución es heterogénea en la superficie endotelial.

7.- El modelo de GBM inducido en la SVZ de cerebro de cobayo reproduce las características histopatológicas de los GBMs humanos. Es reproducida la infiltración microglial y linfocitaria, la co-optación de vasos sanguíneos, la necrosis y la vasculatura glomeruloide, entre otras.

8.- El GBM subventricular induce un aumento en el número de neuroblastos, pero no un aumento en la proliferación en la SVZ.

9.- En tumores U87 - MG, la deficiencia en vitamina C reduce la vasculatura glomeruloide y la infiltración microglial, mientras que en tumores C3, la deficiencia de vitamina C reduce la masa tumoral, la proliferación, la vasculatura glomeruloide, la invasión y la infiltración microglial.

10.- Los tumores que se originan y se desarrollan en la SVZ, como el caso de los tumores C3, podrían ser más sensibles al déficit en vitamina C que los tumores que se originan en áreas no neurogénicas del parénquima cerebral, como el caso de los tumores U87 – MG.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

Aboody, K.S., Brown, A., Rainov, N.G., Bower, K.A., Liu, S., Yang, W., Small, J.E., Herrlinger, U., Ourednik, V., Black, P.M., Breakefield, X.O., y Snyder, E.Y. (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12846-12851.

Agus, D.B., Vera, J.C., y Golde, D.W. (1999). Stromal cell oxidation: a mechanism by which tumors obtain vitamin C. *Cancer Res* 59, 4555-4558.

Ahlenius, H., Visan, V., Kokaia, M., Lindvall, O., y Kokaia, Z. (2009). Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. *J Neurosci* 29, 4408-4419.

Alexandrova, A.Y., Kopnin, P.B., Vasiliev, J.M., y Kopnin, B.P. (2006). ROS up-regulation mediates Ras-induced changes of cell morphology and motility. *Experimental cell research* 312, 2066-2073.

Altman, J. (1962). Autoradiographic study of degenerative and regenerative proliferation of neuroglia cells with tritiated thymidine. *Exp Neurol* 5, 302-318.

Alvarez-Buylla, A., y Garcia-Verdugo, J.M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634.

Alvarez-Buylla, A., Kohwi, M., Nguyen, T.M., y Merkle, F.T. (2008). The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 73, 357-365.

Angelow, S., Haselbach, M., y Galla, H.J. (2003). Functional characterisation of the active ascorbic acid transport into cerebrospinal fluid using primary cultured choroid plexus cells. *Brain Res* 988, 105-113.

Astuya, A., Caprile, T., Castro, M., Salazar, K., Garcia Mde, L., Reinicke, K., Rodriguez, F., Vera, J.C., Millan, C., Ulloa, V., Low, M., Martinez, F., y Nualart, F. (2005). Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res* 79, 146-156.

Bar, E.E. (2011). Glioblastoma, cancer stem cells and hypoxia. *Brain pathology* 21, 119-129.

Barami, K., Sloan, A.E., Rojiani, A., Schell, M.J., Staller, A., y Brem, S. (2009). Relationship of gliomas to the ventricular walls. *J Clin Neurosci* 16, 195-201.

Bayer, S.A. (1983). 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp Brain Res* 50, 329-340.

Berger, U.V., Lu, X.C., Liu, W., Tang, Z., Slusher, B.S., y 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.

Bexell, D., Gunnarsson, S., Nordquist, J., y Bengzon, J. (2007). Characterization of the subventricular zone neurogenic response to rat malignant brain tumors. *Neuroscience* 147, 824-832.

Bexell, D., Gunnarsson, S., Siesjo, P., Bengzon, J., y Darabi, A. (2009). CD133+ and nestin+ tumor-initiating cells dominate in N29 and N32 experimental gliomas. *Int J Cancer* 125, 15-22.

Bianchi, J., Wilson, F.A., y Rose, R.C. (1986). Dehydroascorbic acid and ascorbic acid transport systems in the guinea pig ileum. *Am J Physiol* 250, G461-468.

Blaschke, K., Ebata, K.T., Karimi, M.M., Zepeda-Martinez, J.A., Goyal, P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D.J., Hirst, M., Rao, A., Lorincz, M.C., y Ramalho-Santos, M. (2013). Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* 500, 222-226.

Brahimi-Horn, M.C., y Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 581, 3582-3591.

Brat, D.J., Castellano-Sanchez, A.A., Hunter, S.B., Pecot, M., Cohen, C., Hammond, E.H., Devi, S.N., Kaur, B., y Van Meir, E.G. (2004). Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating

cell population. *Cancer Res* 64, 920-927.

Brat, D.J., y Van Meir, E.G. (2001). Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research. *The American journal of pathology* 158, 789-796.

Brat, D.J., y Van Meir, E.G. (2004). Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 84, 397-405.

Buettner, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-543.

Cahill, L., Corey, P.N., y El-Soheby, A. (2009). Vitamin C deficiency in a population of young Canadian adults. *American journal of epidemiology* 170, 464-471.

Cameron, E., y Pauling, L. (1976). Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 3685-3689.

Cao, N., Liu, Z., Chen, Z., Wang, J., Chen, T., Zhao, X., Ma, Y., Qin, L., Kang, J., Wei, B., Wang, L., Jin, Y., y Yang, H.T. (2012). Ascorbic acid enhances the cardiac differentiation of induced pluripotent stem cells through promoting the proliferation of cardiac progenitor cells. *Cell research* 22, 219-236.

Caprile, T., Salazar, K., Astuya, A., Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Montecinos, H., Millan, C., de Los Angeles Garcia, M., y Nualart, F. (2009). The Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem* 108, 563-577.

Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., Honjo, T., Kokaia, Z., Shupliakov, O., Cassidy, R.M., Lindvall, O., y Frisen, J. (2009). Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 12, 259-267.

Carnicero, E., Alonso, M.I., Carretero, R., Lamus, F., Moro, J.A., de la Mano, A., Fernandez, J.M., y Gato, A. (2013). Embryonic cerebrospinal fluid activates neurogenesis of neural precursors within the subventricular zone of the adult mouse brain. *Cells, tissues, organs* 198, 398-404.

Castro, M., Caprile, T., Astuya, A., Millan, C., Reinicke, K., Vera, J.C., Vasquez, O., Aguayo, L.G., y Nualart, F. (2001). High-affinity sodium-vitamin C co-transporters (SVCT) expression in embryonic mouse neurons. *J Neurochem* 78, 815-823.

Castro, T., Low, M., Salazar, K., Montecinos, H., Cifuentes, M., Yanez, A.J., Slebe, J.C., Figueroa, C.D., Reinicke, K., de los Angeles Garcia, M., Henriquez, J.P., y Nualart, F. (2008). Differential distribution of the Sodium-vitamin C cotransporter-1 along the proximal tubule of the mouse and human kidney. *Kidney Int* 74, 1278-1286.

Chaichana, K.L., McGirt, M.J., Frazier, J., Attenello, F., Guerrero-Cazares, H., y Quinones-Hinojosa, A. (2008). Relationship of glioblastoma multiforme to the lateral ventricles predicts survival following tumor resection. *J Neurooncol* 89, 219-224.

Chatterjee, I.B., Majumder, A.K., Nandi, B.K., y Subramanian, N. (1975). Synthesis and some major functions of vitamin C in animals. *Ann N Y Acad Sci* 258, 24-47.

Chen, J., Guo, L., Zhang, L., Wu, H., Yang, J., Liu, H., Wang, X., Hu, X., Gu, T., Zhou, Z., Liu, J., Liu, J., Wu, H., Mao, S.Q., Mo, K., Li, Y., Lai, K., Qi, J., Yao, H., Pan, G., Xu, G.L., y Pei, D. (2013). Vitamin C modulates TET1 function during somatic cell reprogramming. *Nature genetics* 45, 1504-1509.

Chen, Q., Espey, M.G., Sun, A.Y., Pooput, C., Kirk, K.L., Krishna, M.C., Khosh, D.B., Drisko, J., y Levine, M. (2008). Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11105-11109.

Chiang, C.D., Song, E.J., Yang, V.C., y Chao, C.C. (1994). Ascorbic acid increases drug accumulation and reverses vincristine resistance of human non-small-cell lung-cancer cells. *Biochem J* 301 ( Pt 3), 759-764.

Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L., Pattisapu, J.V., Kyriazis, G.A., Sugaya, K., Bushnev, S., Lathia, J.D., Rich, J.N., y Chan,

S.L. (2010). Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* 70, 418-427.

Choi, K.M., Seo, Y.K., Yoon, H.H., Song, K.Y., Kwon, S.Y., Lee, H.S., y Park, J.K. (2008). Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Journal of bioscience and bioengineering* 105, 586-594.

Chojkier, M., Spanheimer, R., y Peterkofsky, B. (1983). Specifically decreased collagen biosynthesis in scurvy dissociated from an effect on proline hydroxylation and correlated with body weight loss. In vitro studies in guinea pig calvarial bones. *The Journal of clinical investigation* 72, 826-835.

Chojnacki, A.K., Mak, G.K., y Weiss, S. (2009). Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci* 10, 153-163.

Chung, T.L., Brena, R.M., Kolle, G., Grimmond, S.M., Berman, B.P., Laird, P.W., Pera, M.F., y Wolvetang, E.J. (2010). Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem cells* 28, 1848-1855.

Cisternas, P., Silva-Alvarez, C., Martinez, F., Fernandez, E., Ferrada, L., Oyarce, K., Salazar, K., Bolanos, J.P., y Nualart, F. (2014). The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *J Neurochem* 129, 663-671.

Coluzzi, E., Colamartino, M., Cozzi, R., Leone, S., Meneghini, C., O'Callaghan, N., y Sgura, A. (2014). Oxidative stress induces persistent telomeric DNA damage responsible for nuclear morphology change in mammalian cells. *PLoS One* 9, e110963.

Coniglio, S.J., y Segall, J.E. (2013). Review: molecular mechanism of microglia stimulated glioblastoma invasion. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 32, 372-380.

Cornford, E.M., y Hyman, S. (2005). Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 27-43.

Creagan, E.T., Moertel, C.G., O'Fallon, J.R., Schutt, A.J., O'Connell, M.J., Rubin, J., y Frytak, S. (1979). Failure of high-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy to benefit patients with advanced cancer. A controlled trial. *N Engl J Med* 301, 687-690.

Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., Frisen, J., Dragunow, M., Faull, R.L., y Eriksson, P.S. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315, 1243-1249.

Daruwala, R., Song, J., Koh, W.S., Rumsey, S.C., y Levine, M. (1999). Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett* 460, 480-484.

de la Fuente, M., Ferrandez, M.D., Burgos, M.S., Soler, A., Prieto, A., y Miquel, J. (1998). Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 76, 373-380.

De Tullio, M.C. (2012). Beyond the antioxidant: the double life of vitamin C. *Sub-cellular biochemistry* 56, 49-65.

Diliberto, E.J., Jr., y Allen, P.L. (1981). Mechanism of dopamine-beta-hydroxylation. Semidehydroascorbate as the enzyme oxidation product of ascorbate. *J Biol Chem* 256, 3385-3393.

Dirks, P.B. (2001). Glioma migration: clues from the biology of neural progenitor cells and embryonic CNS cell migration. *J Neurooncol* 53, 203-212.

Dixit, S., Bernardo, A., Walker, J.M., Kennard, J.A., Kim, G.Y., Kessler, E.S., y Harrison, F.E. (2015). Vitamin C deficiency in the brain impairs cognition, increases amyloid accumulation and deposition, and oxidative stress in APP/PSEN1 and normally aging mice. *ACS chemical neuroscience* 6, 570-581.

Doetsch, F. (2003). A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13, 543-550.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (1999a). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97,

703-716.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-5061.

Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (1999b). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11619-11624.

Drisko, J.A., Chapman, J., y Hunter, V.J. (2003). The use of antioxidants with first-line chemotherapy in two cases of ovarian cancer. *J Am Coll Nutr* 22, 118-123.

Du, J., Cieslak, J.A., 3rd, Welsh, J.L., Sibenaller, Z.A., Allen, B.G., Wagner, B.A., Kalen, A.L., Doskey, C.M., Strother, R.K., Button, A.M., Mott, S.L., Smith, B., Tsai, S., Mezhir, J., Goswami, P.C., Spitz, D.R., Buettner, G.R., y Cullen, J.J. (2015). Pharmacological Ascorbate Radiosensitizes Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 75, 3314-3326.

Duntsch, C., Zhou, Q., Weimar, J.D., Frankel, B., Robertson, J.H., y Pourmotabbed, T. (2005). Up-regulation of neurogenesis generating glial progenitors that infiltrate rat intracranial glioma. *J Neurooncol* 71, 245-255.

Ehteshami, M., Yuan, X., Kabos, P., Chung, N.H., Liu, G., Akasaki, Y., Black, K.L., y Yu, J.S. (2004). Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* 6, 287-293.

El Andaloussi, A., y Lesniak, M.S. (2006). An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro-oncology* 8, 234-243.

Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., y Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.

Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., Peterbauer, A., Wolbank, S., Redl, H., Zhong, M., Cai, D., Zeng, L., y Pei, D. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 6, 71-79.

Faissner, A., y Reinhard, J. (2015). The extracellular matrix compartment of neural stem and glial progenitor cells. *Glia* 63, 1330-1349.

Fromberg, A., Gutsch, D., Schulze, D., Vollbracht, C., Weiss, G., Czubyko, F., y Aigner, A. (2011). Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 67, 1157-1166.

Fuentealba, L.C., Obernier, K., y Alvarez-Buylla, A. (2012). Adult neural stem cells bridge

their niche. *Cell stem cell* 10, 698-708.

Fukaya, R., Ohta, S., Yamaguchi, M., Fujii, H., Kawakami, Y., Kawase, T., y Toda, M. (2010). Isolation of cancer stem-like cells from a side population of a human glioblastoma cell line, SK-MG-1. *Cancer letters* 291, 150-157.

Fukumura, H., Sato, M., Kezuka, K., Sato, I., Feng, X., Okumura, S., Fujita, T., Yokoyama, U., Eguchi, H., Ishikawa, Y., y Saito, T. (2012). Effect of ascorbic acid on reactive oxygen species production in chemotherapy and hyperthermia in prostate cancer cells. *The journal of physiological sciences : JPS* 62, 251-257.

Ganguly, R., Durieux, M.F., y Waldman, R.H. (1976). Macrophage function in vitamin C-deficient guinea pigs. *The American journal of clinical nutrition* 29, 762-765.

Garcia, M., 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., y Nualart, F. (2005). Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia* 50, 32-47.

Garcia-Verdugo, J.M., Doetsch, F., Wichterle, H., Lim, D.A., y Alvarez-Buylla, A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36, 234-248.

Gatenby, R.A., Gawlinski, E.T., Gmitro, A.F., Kaylor, B., y Gillies, R.J. (2006). Acid-

mediated tumor invasion: a multidisciplinary study. *Cancer Res* 66, 5216-5223.

Gatenby, R.A., y Gillies, R.J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4, 891-899.

Gess, B., Sevimli, S., Strecker, J.K., Young, P., y Schabitz, W.R. (2011). Sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2) expression and activity in brain capillary endothelial cells after transient ischemia in mice. *PLoS One* 6, e17139.

Gil-Perotin, S., Duran-Moreno, M., Belzunegui, S., Luquin, M.R., y Garcia-Verdugo, J.M. (2009). Ultrastructure of the subventricular zone in *Macaca fascicularis* and evidence of a mouse-like migratory stream. *J Comp Neurol* 514, 533-554.

Goldman, S.A., y Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2390-2394.

Gonzalez, M.J., Mora, E.M., Miranda-Massari, J.R., Matta, J., Riordan, H.D., y Riordan, N.H. (2002). Inhibition of human breast carcinoma cell proliferation by ascorbate and copper. *Puerto Rico health sciences journal* 21, 21-23.

Grasso, C., Fabre, M.S., Collis, S.V., Castro, M.L., Field, C.S., Schleich, N., McConnell, M.J., y Herst, P.M. (2014). Pharmacological doses of daily ascorbate protect tumors from radiation damage after a single dose of radiation in an intracranial mouse glioma model.

Frontiers in oncology 4, 356.

Gross, C.G. (2000). Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1, 67-73.

Gu, J., Liu, Y., Kyritsis, A.P., y Bondy, M.L. (2009). Molecular epidemiology of primary brain tumors. *Neurotherapeutics* 6, 427-435.

Guan, J., Tong, W., Ding, W., Du, S., Xiao, Z., Han, Q., Zhu, Z., Bao, X., Shi, X., Wu, C., Cao, J., Yang, Y., Ma, W., Li, G., Yao, Y., Gao, J., Wei, J., Dai, J., y Wang, R. (2012). Neuronal regeneration and protection by collagen-binding BDNF in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Biomaterials* 33, 1386-1395.

Guerrero-Cazares, H., Gonzalez-Perez, O., Soriano-Navarro, M., Zamora-Berridi, G., Garcia-Verdugo, J.M., y Quinones-Hinojosa, A. (2011). Cytoarchitecture of the lateral ganglionic eminence and rostral extension of the lateral ventricle in the human fetal brain. *J Comp Neurol* 519, 1165-1180.

Haapasalo, J.A., Nordfors, K.M., Hilvo, M., Rantala, I.J., Soini, Y., Parkkila, A.K., Pastorekova, S., Pastorek, J., Parkkila, S.M., y Haapasalo, H.K. (2006). Expression of carbonic anhydrase IX in astrocytic tumors predicts poor prognosis. *Clin Cancer Res* 12, 473-477.

Harrison, F.E., Dawes, S.M., Meredith, M.E., Babaev, V.R., Li, L., y May, J.M. (2010a).

Low vitamin C and increased oxidative stress and cell death in mice that lack the sodium-dependent vitamin C transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* 49, 821-829.

Harrison, F.E., y May, J.M. (2009). Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* 46, 719-730.

Harrison, F.E., Meredith, M.E., Dawes, S.M., Saskowski, J.L., y May, J.M. (2010b). Low ascorbic acid and increased oxidative stress in *gulo(-/-)* mice during development. *Brain Res* 1349, 143-152.

Haskins, W.E., Zablotsky, B.L., Foret, M.R., Ihrie, R.A., Alvarez-Buylla, A., Eisenman, R.N., Berger, M.S., y Lin, C.H. (2013). Molecular Characteristics in MRI-Classified Group 1 Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in oncology* 3, 182.

He, X.B., Kim, M., Kim, S.Y., Yi, S.H., Rhee, Y.H., Kim, T., Lee, E.H., Park, C.H., Dixit, S., Harrison, F.E., y Lee, S.H. (2015). Vitamin C facilitates dopamine neuron differentiation in fetal midbrain through TET1- and JMJD3-dependent epigenetic control manner. *Stem cells* 33, 1320-1332.

Heaney, M.L., Gardner, J.R., Karasavvas, N., Golde, D.W., Scheinberg, D.A., Smith, E.A., y O'Connor, O.A. (2008). Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res* 68, 8031-8038.

Hediger, M.A. (2002). New view at C. *Nat Med* 8, 445-446.

Helmlinger, G., Sckell, A., Dellian, M., Forbes, N.S., y Jain, R.K. (2002). Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin Cancer Res* 8, 1284-1291.

Hirakawa, N., Miura, Y., y Yagasaki, K. (2005). Inhibitory effect of ascorbic Acid on the proliferation and invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology* 47, 133-138.

Hirschmann, J.V., y Raugi, G.J. (1999). Adult scurvy. *J Am Acad Dermatol* 41, 895-906; quiz 907-810.



Holland, E.C. (2000). Glioblastoma multiforme: the terminator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6242-6244.

Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J.T., Grover, V.K., Cooper, M.K., Litingtung, Y., y Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8422-8427.

Hughes, R.E., Hurley, R.J., y Jones, P.R. (1971). The retention of ascorbic acid by guinea-pig tissues. *Br J Nutr* 26, 433-438.

Huijbers, I.J., Irvani, M., Popov, S., Robertson, D., Al-Sarraj, S., Jones, C., y Isacke, C.M. (2010). A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion. *PLoS One* 5, e9808.

Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., y Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.

Ihrle, R.A., y Alvarez-Buylla, A. (2011). Lake-front property: a unique germinal niche by the lateral ventricles of the adult brain. *Neuron* 70, 674-686.

Jacob, R.A., Kelley, D.S., Pianalto, F.S., Swendseid, M.E., Henning, S.M., Zhang, J.Z., Ames, B.N., Fraga, C.G., y Peters, J.H. (1991). Immunocompetence and oxidant defense during ascorbate depletion of healthy men. *The American journal of clinical nutrition* 54, 1302S-1309S.

Jacobs, C., Hutton, B., Ng, T., Shorr, R., y Clemons, M. (2015). Is there a role for oral or intravenous ascorbate (vitamin C) in treating patients with cancer? A systematic review. *The oncologist* 20, 210-223.

Jafri, N.F., Clarke, J.L., Weinberg, V., Barani, I.J., y Cha, S. (2013). Relationship of glioblastoma multiforme to the subventricular zone is associated with survival. *Neuro-oncology* 15, 91-96.

Johansson, B., Eriksson, A., Virtanen, I., y Thornell, L.E. (1997). Intermediate filament proteins in adult human arteries. *The Anatomical record* 247, 439-448.

Johansson, C.B., Momma, S., Clarke, D.L., Risling, M., Lendahl, U., y Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96, 25-34.

Kam, M., Curtis, M.A., McGlashan, S.R., Connor, B., Nannmark, U., y Faull, R.L. (2009). The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat* 37, 196-205.

Kaneko, N., Marin, O., Koike, M., Hirota, Y., Uchiyama, Y., Wu, J.Y., Lu, Q., Tessier-Lavigne, M., Alvarez-Buylla, A., Okano, H., Rubenstein, J.L., y Sawamoto, K. (2010). New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67, 213-223.

Kaplan, M.S., y Bell, D.H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci* 4, 1429-1441.

Kaplan, M.S., y Hinds, J.W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.

Kaur, B., Khwaja, F.W., Severson, E.A., Matheny, S.L., Brat, D.J., y Van Meir, E.G. (2005). Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology* 7, 134-153.

Kim, K.N., Pie, J.E., Park, J.H., Park, Y.H., Kim, H.W., y Kim, M.K. (2006). Retinoic acid

and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. *The Journal of nutritional biochemistry* 17, 454-462.

Kleihues, P., Burger, P.C., y Scheithauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. *Brain pathology* 3, 255-268.

Kleihues, P., y Ohgaki, H. (2000). Phenotype vs genotype in the evolution of astrocytic brain tumors. *Toxicologic pathology* 28, 164-170.

Knowles, H.J., Raval, R.R., Harris, A.L., y Ratcliffe, P.J. (2003). Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells. *Cancer Res* 63, 1764-1768.

Koshy, M., Villano, J.L., Dolecek, T.A., Howard, A., Mahmood, U., Chmura, S.J., Weichselbaum, R.R., y McCarthy, B.J. (2012). Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J Neurooncol* 107, 207-212.

Kratzing, C.C., Kelly, J.D., y Kratzing, J.E. (1985). Ascorbic acid in fetal rat brain. *J Neurochem* 44, 1623-1624.

Lantos, P.L., y Cox, D.J. (1976). The origin of experimental brain tumours: a sequential study. *Experientia* 32, 1467-1468.

Lee, D.H., Ahn, Y., Kim, S.U., Wang, K.C., Cho, B.K., Phi, J.H., Park, I.H., Black, P.M., Carroll, R.S., Lee, J., y Kim, S.K. (2009). Targeting rat brainstem glioma using human

neural stem cells and human mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res* 15, 4925-4934.

Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K., y Fine, H.A. (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer cell* 9, 391-403.

Lee, J.Y., Chang, M.Y., Park, C.H., Kim, H.Y., Kim, J.H., Son, H., Lee, Y.S., y Lee, S.H. (2003). Ascorbate-induced differentiation of embryonic cortical precursors into neurons and astrocytes. *J Neurosci Res* 73, 156-165.

Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M., y McKay, R.D. (2000). Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 18, 675-679.

Lehtinen, M.K., y Walsh, C.A. (2011). Neurogenesis at the brain-cerebrospinal fluid interface. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 653-679.

Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., D'Ercole, A.J., Wong, E.T., LaMantia, A.S., y Walsh, C.A. (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69, 893-905.

Li, W., y Graeber, M.B. (2012). The molecular profile of microglia under the influence of

glioma. *Neuro-oncology* 14, 958-978.

Lim, D.A., Cha, S., Mayo, M.C., Chen, M.H., Keles, E., Vandenberg, S., y Berger, M.S. (2007a). Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype. *Neuro-oncology* 9, 424-429.

Lim, D.A., Huang, Y.C., y Alvarez-Buylla, A. (2007b). The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurgery clinics of North America* 18, 81-92, ix.

Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.

Lin, J.R., Qin, H.H., Wu, W.Y., He, S.J., y Xu, J.H. (2014). Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 29, 257-264.

Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2074-2077.

Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult

mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.

Lois, C., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science* 271, 978-981.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., y Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.

Luskin, M.B. (1993). Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11, 173-189.

Ma, Y., Chapman, J., Levine, M., Polireddy, K., Drisko, J., y Chen, Q. (2014). High-dose parenteral ascorbate enhanced chemosensitivity of ovarian cancer and reduced toxicity of chemotherapy. *Science translational medicine* 6, 222ra218.

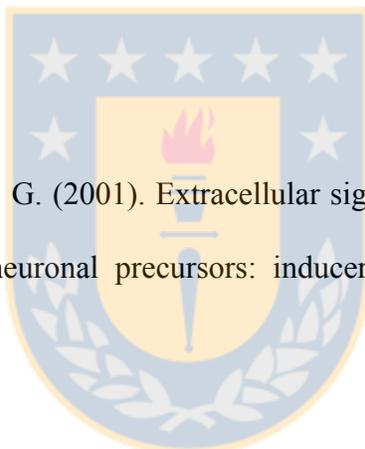
Maellaro, E., Del Bello, B., Sugherini, L., Santucci, A., Comporti, M., y Casini, A.F. (1994). Purification and characterization of glutathione-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver. *Biochem J* 301 (Pt 2), 471-476.

Makino, Y., Sakagami, H., y Takeda, M. (1999). Induction of cell death by ascorbic acid derivatives in human renal carcinoma and glioblastoma cell lines. *Anticancer Res* 19, 3125-3132.

Mandl, J., Szarka, A., y Banhegyi, G. (2009). Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *British journal of pharmacology* 157, 1097-1110.

Maresh, A., Rodriguez Gil, D., Whitman, M.C., y Greer, C.A. (2008). Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb--implications for odor processing. *PLoS One* 3, e2640.

Maslov, A.Y., Barone, T.A., Plunkett, R.J., y Pruitt, S.C. (2004). Neural stem cell detection, characterization, and age-related changes in the subventricular zone of mice. *J Neurosci* 24, 1726-1733.



Mason, H.A., Ito, S., y Corfas, G. (2001). Extracellular signals that regulate the tangential migration of olfactory bulb neuronal precursors: inducers, inhibitors, and repellents. *J Neurosci* 21, 7654-7663.

May, J.M., Huang, J., y Qu, Z.C. (2005). Macrophage uptake and recycling of ascorbic acid: response to activation by lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med* 39, 1449-1459.

Mc, C.W. (1959). Cancer: a collagen disease, secondary to a nutritional deficiency. *Arch Pediatr* 76, 166-171.

Medina, M.A., Garcia de Veas, R., y Schweigerer, L. (1994). Ascorbic acid is cytotoxic for pediatric tumor cells cultured in vitro. *Biochem Mol Biol Int* 34, 871-874.

Mekala, N.K., Baadhe, R.R., Rao Parcha, S., y Prameela Devi, Y. (2013). Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of human umbilical cord blood stem cells by L-ascorbic acid, in vitro. *Current stem cell research & therapy* 8, 156-162.

Mendez, O., Zavadil, J., Esencay, M., Lukyanov, Y., Santovasi, D., Wang, S.C., Newcomb, E.W., y Zagzag, D. (2010). Knock down of HIF-1alpha in glioma cells reduces migration in vitro and invasion in vivo and impairs their ability to form tumor spheres. *Molecular cancer* 9, 133.

Mercier, F., Kitasako, J.T., y Hatton, G.I. (2002). Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol* 451, 170-188.

Meredith, M.E., Harrison, F.E., y May, J.M. (2011). Differential regulation of the ascorbic acid transporter SVCT2 during development and in response to ascorbic acid depletion. *Biochemical and biophysical research communications* 414, 737-742.

Merkle, F.T., Fuentealba, L.C., Sanders, T.A., Magno, L., Kessar, N., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nat Neurosci* 17, 207-214.

Merkle, F.T., Mirzadeh, Z., y Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381-384.

Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla,

A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell stem cell* 3, 265-278.

Moertel, C.G., Fleming, T.R., Creagan, E.T., Rubin, J., O'Connell, M.J., y Ames, M.M. (1985). High-dose vitamin C versus placebo in the treatment of patients with advanced cancer who have had no prior chemotherapy. A randomized double-blind comparison. *N Engl J Med* 312, 137-141.

Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., y Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell* 7, 150-161.

Mojic, M., Bogdanovic Pristov, J., Maksimovic-Ivanic, D., Jones, D.R., Stanic, M., Mijatovic, S., y Spasojevic, I. (2014). Extracellular iron diminishes anticancer effects of vitamin C: an in vitro study. *Scientific reports* 4, 5955.

Monfort, A., y Wutz, A. (2013). Breathing-in epigenetic change with vitamin C. *EMBO reports* 14, 337-346.

Mosdol, A., Erens, B., y Brunner, E.J. (2008). Estimated prevalence and predictors of vitamin C deficiency within UK's low-income population. *Journal of public health* 30, 456-460.

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., y 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.

Murad, S., Grove, D., Lindberg, K.A., Reynolds, G., Sivarajah, A., y Pinnell, S.R. (1981). Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 2879-2882.

Nagao, N., Nakayama, T., Etoh, T., Saiki, I., y Miwa, N. (2000). Tumor invasion is inhibited by phosphorylated ascorbate via enrichment of intracellular vitamin C and decreasing of oxidative stress. *Journal of cancer research and clinical oncology* 126, 511-518.

Naidu, A.K., Wiranowska, M., Kori, S.H., Prockop, L.D., y Kulkarni, A.P. (1993). Inhibition of human glioma cell proliferation and glutathione S-transferase by ascorbyl esters and interferon. *Anticancer Res* 13, 1469-1475.

Ng, K.L., Li, J.D., Cheng, M.Y., Leslie, F.M., Lee, A.G., y Zhou, Q.Y. (2005). Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 308, 1923-1927.

Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C., y Chedotal, A. (2004). Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 24, 1497-1506.

Nualart, F., Salazar, K., Oyarce, K., Cisternas, P., Jara, N., Silva-Alvarez, C., Pastor, P.,

Martínez, F., García, A., García-Robles, M.d.l.Á., y Tapia, J.C. (2012). Typical and atypical stem cells in the brain, vitamin C effect and neuropathology. *Biological Research* 45, 243-256.

Nualart, F.J., Rivas, C.I., Montecinos, V.P., Godoy, A.S., Guaiquil, V.H., Golde, D.W., y Vera, J.C. (2003). Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem* 278, 10128-10133.

Padayatty, S.J., Riordan, H.D., Hewitt, S.M., Katz, A., Hoffer, L.J., y Levine, M. (2006). Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ* 174, 937-942.

Paidi, M.D., Schjoldager, J.G., Lykkesfeldt, J., y Tveden-Nyborg, P. (2014a). Chronic vitamin C deficiency promotes redox imbalance in the brain but does not alter sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression. *Nutrients* 6, 1809-1822.

Paidi, M.D., Schjoldager, J.G., Lykkesfeldt, J., y Tveden-Nyborg, P. (2014b). Prenatal vitamin C deficiency results in differential levels of oxidative stress during late gestation in foetal guinea pig brains. *Redox biology* 2, 361-367.

Parsons, K.K., Maeda, N., Yamauchi, M., Banes, A.J., y Koller, B.H. (2006). Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 290, E1131-1139.

Pastor, P. (2011). Expresión de SVCT2 en el área neurogénica post-natal y función de la

vitamina C en las células precursoras cerebrales. In Departamento de Biología Celular (Universidad de Concepción).

Pastor, P., Cisternas, P., Salazar, K., Silva-Alvarez, C., Oyarce, K., Jara, N., Espinoza, F., Martinez, A.D., y Nualart, F. (2013). SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche. *Frontiers in cellular neuroscience* 7, 119.

Pavelic, K. (1985). L-ascorbic acid-induced DNA strand breaks and cross links in human neuroblastoma cells. *Brain Res* 342, 369-373.

Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J., y Luskin, M.B. (2001). Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain. *Exp Neurol* 172, 1-16.

Peretto, P., Giachino, C., Aimar, P., Fasolo, A., y Bonfanti, L. (2005). Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* 487, 407-427.

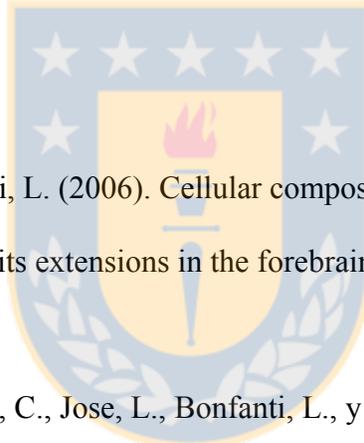
Perez-Cruz, I., Carcamo, J.M., y Golde, D.W. (2007). Caspase-8 dependent TRAIL-induced apoptosis in cancer cell lines is inhibited by vitamin C and catalase. *Apoptosis* 12, 225-234.

Peterkofsky, B. (1991). Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *The American*

journal of clinical nutrition 54, 1135S-1140S.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.

Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G., y Aldape, K. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer cell* 9, 157-173.



Ponti, G., Aimar, P., y Bonfanti, L. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the rabbit subventricular zone and its extensions in the forebrain. *J Comp Neurol* 498, 491-507.

Ponti, G., Obernier, K., Guinto, C., Jose, L., Bonfanti, L., y Alvarez-Buylla, A. (2013). Cell cycle and lineage progression of neural progenitors in the ventricular-subventricular zones of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1045-1054.

Qiao, H., Bell, J., Juliao, S., Li, L., y May, J.M. (2009). Ascorbic acid uptake and regulation of type I collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular research* 46, 15-24.

Qiao, H., y May, J.M. (2008). Development of ascorbate transporters in brain cortical capillary endothelial cells in culture. *Brain Res* 1208, 79-86.

Qiu, S., Li, L., Weeber, E.J., y 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.

Quinones-Hinojosa, A., y Chaichana, K. (2007). The human subventricular zone: a source of new cells and a potential source of brain tumors. *Exp Neurol* 205, 313-324.

Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494, 415-434.

Reynolds, B.A., y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.

Rice, M.E. (2000). Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 23, 209-216.

Rojiani, A.M., y Dorovini-Zis, K. (1996). Glomeruloid vascular structures in glioblastoma multiforme: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Journal of neurosurgery* 85, 1078-1084.

Romanko, M.J., Rothstein, R.P., y Levison, S.W. (2004). Neural stem cells in the

subventricular zone are resilient to hypoxia/ischemia whereas progenitors are vulnerable. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24, 814-825.

Rousselot, P., Lois, C., y Alvarez-Buylla, A. (1995). Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J Comp Neurol* 351, 51-61.

Said, H.M., Staab, A., Hagemann, C., Vince, G.H., Katzer, A., Flentje, M., y Vordermark, D. (2007). Distinct patterns of hypoxic expression of carbonic anhydrase IX (CA IX) in human malignant glioma cell lines. *J Neurooncol* 81, 27-38.

Said, H.M., Supuran, C.T., Hageman, C., Staab, A., Polat, B., Katzer, A., Scozzafava, A., Anacker, J., Flentje, M., y Vordermark, D. (2010). Modulation of carbonic anhydrase 9 (CA9) in human brain cancer. *Current pharmaceutical design* 16, 3288-3299.

Saitoh, Y., Morishita, A., Mito, S., Tsujiya, T., y Miwa, N. (2013). Senescence-induced increases in intracellular oxidative stress and enhancement of the need for ascorbic acid in human fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry* 380, 129-141.

Salazar, K., Cerda, G., Martinez, F., Sarmiento, J.M., Gonzalez, C., Rodriguez, F., Garcia-Robles, M., Tapia, J.C., Cifuentes, M., y Nualart, F. (2014). SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem* 130, 693-706.

Salazar, K., Martinez, M., Ulloa, V., Bertinat, R., Martinez, F., Jara, N., Espinoza, F., Bongarzone, E.R., y Nualart, F. (2015). SVCT2 Overexpression in Neuroblastoma Cells Induces Cellular Branching that is Associated with ERK Signaling. *Molecular neurobiology*.

Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., y Berger, M.S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822.

Sanai, N., Nguyen, T., Ihrie, R.A., Mirzadeh, Z., Tsai, H.H., Wong, M., Gupta, N., Berger, M.S., Huang, E., Garcia-Verdugo, J.M., Rowitch, D.H., y Alvarez-Buylla, A. (2011). Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 478, 382-386.

Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M.S., y Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740-744.

Santos, I.M., Tome Ada, R., Saldanha, G.B., Ferreira, P.M., Militao, G.C., y Freitas, R.M. (2009). Oxidative stress in the hippocampus during experimental seizures can be ameliorated with the antioxidant ascorbic acid. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2, 214-221.

Sawamoto, K., Hirota, Y., Alfaro-Cervello, C., Soriano-Navarro, M., He, X., Hayakawa-Yano, Y., Yamada, M., Hikishima, K., Tabata, H., Iwanami, A., Nakajima, K., Toyama, Y., Itoh, T., Alvarez-Buylla, A., Garcia-Verdugo, J.M., y Okano, H. (2011). Cellular composition and organization of the subventricular zone and rostral migratory stream in the adult and neonatal common marmoset brain. *J Comp Neurol* 519, 690-713.

Sawamoto, K., Wichterle, H., Gonzalez-Perez, O., Cholfin, J.A., Yamada, M., Spassky, N., Murcia, N.S., Garcia-Verdugo, J.M., Marin, O., Rubenstein, J.L., Tessier-Lavigne, M., Okano, H., y Alvarez-Buylla, A. (2006). New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311, 629-632.

Schleicher, R.L., Carroll, M.D., Ford, E.S., y Lacher, D.A. (2009). Serum vitamin C and the prevalence of vitamin C deficiency in the United States: 2003-2004 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *The American journal of clinical nutrition* 90, 1252-1263.

Schnitzer, J., Franke, W.W., y Schachner, M. (1981). Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *The Journal of cell biology* 90, 435-447.

See, A.P., Parker, J.J., y Waziri, A. (2015). The role of regulatory T cells and microglia in glioblastoma-associated immunosuppression. *J Neurooncol* 123, 405-412.

Shin, D.M., Ahn, J.I., Lee, K.H., y Lee, Y.S. (2004). Ascorbic acid responsive genes during

neuronal differentiation of embryonic stem cells. *Neuroreport* 15, 1959-1963.

Shook, B.A., Manz, D.H., Peters, J.J., Kang, S., y Conover, J.C. (2012). Spatiotemporal changes to the subventricular zone stem cell pool through aging. *J Neurosci* 32, 6947-6956.

Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., y Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.

Sonabend, A.M., Rolle, C.E., y Lesniak, M.S. (2008). The role of regulatory T cells in malignant glioma. *Anticancer Res* 28, 1143-1150.

Sorice, A., Guerriero, E., Capone, F., Colonna, G., Castello, G., y Costantini, S. (2014). Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry* 14, 444-452.

Sotiriou, S., Gispert, S., Cheng, J., Wang, Y., Chen, A., Hoogstraten-Miller, S., Miller, G.F., Kwon, O., Levine, M., Guttentag, S.H., y 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.

Spector, R. (1977). Vitamin homeostasis in the central nervous system. *N Engl J Med* 296, 1393-1398.

Subramani, T., Yeap, S.K., Ho, W.Y., Ho, C.L., Omar, A.R., Aziz, S.A., Rahman, N.M., y Alitheen, N.B. (2014). Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *Journal of cellular and molecular medicine* 18, 305-313.

Suda, T., Takubo, K., y Semenza, G.L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell stem cell* 9, 298-310.

Sundberg, C., Nagy, J.A., Brown, L.F., Feng, D., Eckelhoefer, I.A., Manseau, E.J., Dvorak, A.M., y Dvorak, H.F. (2001). Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *The American journal of pathology* 158, 1145-1160.

Tamagno, I., y Schiffer, D. (2006). Nestin expression in reactive astrocytes of human pathology. *J Neurooncol* 80, 227-233.

Tamari, Y., Nawata, H., Inoue, E., Yoshimura, A., Yoshii, H., Kashino, G., Seki, M., Enomoto, T., Watanabe, M., y Tano, K. (2013). Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. *Free radical research* 47, 1-7.

Taper, H.S., Keyeux, A., y Roberfroid, M. (1996). Potentiation of radiotherapy by nontoxic pretreatment with combined vitamins C and K3 in mice bearing solid transplantable tumor. *Anticancer Res* 16, 499-503.

Telang, S., Clem, A.L., Eaton, J.W., y Chesney, J. (2007). Depletion of ascorbic acid restricts angiogenesis and retards tumor growth in a mouse model. *Neoplasia* 9, 47-56.

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Barnholtz-Sloan, J.S., y Villano, J.L. (2014). Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 23, 1985-1996.

Tian, W., Wang, Y., Xu, Y., Guo, X., Wang, B., Sun, L., Liu, L., Cui, F., Zhuang, Q., Bao, X., Schley, G., Chung, T.L., Laslett, A.L., Willam, C., Qin, B., Maxwell, P.H., y Esteban, M.A. (2014). The hypoxia-inducible factor renders cancer cells more sensitive to vitamin C-induced toxicity. *J Biol Chem* 289, 3339-3351.

Tong, C.K., Chen, J., Cebrian-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., Garcia-Verdugo, J.M., Kriegstein, A., y Alvarez-Buylla, A. (2014). Axonal control of the adult neural stem cell niche. *Cell stem cell* 14, 500-511.

Tran, B., y Rosenthal, M.A. (2010). Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers. *J Clin Neurosci* 17, 417-421.

Tran Thang, N.N., Derouazi, M., Philippin, G., Arcidiaco, S., Di Bernardino-Besson, W., Masson, F., Hoepner, S., Riccadonna, C., Burkhardt, K., Guha, A., Dietrich, P.Y., y Walker, P.R. (2010). Immune infiltration of spontaneous mouse astrocytomas is dominated

by immunosuppressive cells from early stages of tumor development. *Cancer Res* 70, 4829-4839.

Tropepe, V., Craig, C.G., Morshead, C.M., y van der Kooy, D. (1997). Transforming growth factor-alpha null and senescent mice show decreased neural progenitor cell proliferation in the forebrain subependyma. *J Neurosci* 17, 7850-7859.

Tsukaguchi, H., Tokui, T., Mackenzie, B., Berger, U.V., Chen, X.Z., Wang, Y., Brubaker, R.F., y Hediger, M.A. (1999). A family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature* 399, 70-75.

Tveden-Nyborg, P., Johansen, L.K., Raida, Z., Villumsen, C.K., Larsen, J.O., y Lykkesfeldt, J. (2009). Vitamin C deficiency in early postnatal life impairs spatial memory and reduces the number of hippocampal neurons in guinea pigs. *The American journal of clinical nutrition* 90, 540-546.

Tveden-Nyborg, P., Vogt, L., Schjoldager, J.G., Jeannet, N., Hasselholt, S., Paidi, M.D., Christen, S., y Lykkesfeldt, J. (2012). Maternal vitamin C deficiency during pregnancy persistently impairs hippocampal neurogenesis in offspring of guinea pigs. *PLoS One* 7, e48488.

Uetaki, M., Tabata, S., Nakasuka, F., Soga, T., y Tomita, M. (2015). Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Scientific reports* 5, 13896.

Ulloa, V., Garcia-Robles, M., Martinez, F., Salazar, K., Reinicke, K., Perez, F., Godoy, D.F., Godoy, A.S., y Nualart, F. (2013). Human choroid plexus papilloma cells efficiently transport glucose and vitamin C. *J Neurochem* 127, 403-414.

Urbanska, K., Sokolowska, J., Szmidt, M., y Sysa, P. (2014). Glioblastoma multiforme - an overview. *Contemporary oncology* 18, 307-312.

Van Pham, P., Tran, N.Y., Phan, N.L., Vu, N.B., y Phan, N.K. (2016). Vitamin C stimulates human gingival stem cell proliferation and expression of pluripotent markers. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 52, 218-227.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., y Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Vaupel, P., Thews, O., y Hoeckel, M. (2001). Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Medical oncology* 18, 243-259.

Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N., y Cancer Genome Atlas Research, N. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically

relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* 17, 98-110.

Verrax, J., y Calderon, P.B. (2008). The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochem Pharmacol* 76, 1644-1652.

Vescovi, A.L., Galli, R., y Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 6, 425-436.

Vick, N.A., Lin, M.J., y Bigner, D.D. (1977). The role of the subependymal plate in glial tumorigenesis. *Acta Neuropathol* 40, 63-71.

Wang, C., Liu, F., Liu, Y.Y., Zhao, C.H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., Zhang, Y., Chen, R., Song, H., y Yang, Z. (2011a). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell research* 21, 1534-1550.

Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., y Pei, D. (2011b). The histone demethylases Jhdm1a/1b enhance somatic cell reprogramming in a vitamin-C-dependent manner. *Cell stem cell* 9, 575-587.

Wesseling, P., Schlingemann, R.O., Rietveld, F.J., Link, M., Burger, P.C., y Ruiter, D.J. (1995). Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-

electron microscopic study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 54, 304-310.

Wichterle, H., Garcia-Verdugo, J.M., y Alvarez-Buylla, A. (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron* 18, 779-791.

Wilson, M.K., Baguley, B.C., Wall, C., Jameson, M.B., y Findlay, M.P. (2014). Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia-Pacific journal of clinical oncology* 10, 22-37.

Wintergerst, E.S., Maggini, S., y Hornig, D.H. (2006). Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Annals of nutrition & metabolism* 50, 85-94.

Womeldorff, M., Gillespie, D., y Jensen, R.L. (2014). Hypoxia-inducible factor-1 and associated upstream and downstream proteins in the pathophysiology and management of glioblastoma. *Neurosurgical focus* 37, E8.

Wybieralska, E., Koza, M., Sroka, J., Czyz, J., y Madeja, Z. (2008). Ascorbic acid inhibits the migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Cellular & molecular biology letters* 13, 103-111.

Yan, J., Studer, L., y McKay, R.D. (2001). Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J Neurochem* 76, 307-311.

Yang, J., Klassen, H., Pries, M., Wang, W., y Nissen, M.H. (2006). Aqueous humor enhances the proliferation of rat retinal precursor cells in culture, and this effect is partially reproduced by ascorbic acid. *Stem cells* 24, 2766-2775.

Young, G.S., Macklin, E.A., Setayesh, K., Lawson, J.D., Wen, P.Y., Norden, A.D., Drappatz, J., y Kesari, S. (2011). Longitudinal MRI evidence for decreased survival among periventricular glioblastoma. *J Neurooncol* 104, 261-269.

Yu, D.H., Lee, K.H., Lee, J.Y., Kim, S., Shin, D.M., Kim, J.H., Lee, Y.S., Oh, S.K., Moon, S.Y., y Lee, S.H. (2004). Changes of gene expression profiles during neuronal differentiation of central nervous system precursors treated with ascorbic acid. *J Neurosci Res* 78, 29-37.

Yu, S.C., Ping, Y.F., Yi, L., Zhou, Z.H., Chen, J.H., Yao, X.H., Gao, L., Wang, J.M., y Bian, X.W. (2008). Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer letters* 265, 124-134.

Yun, J., Mullarky, E., Lu, C., Bosch, K.N., Kavalier, A., Rivera, K., Roper, J., Chio, II, Giannopoulou, E.G., Rago, C., Muley, A., Asara, J.M., Paik, J., Elemento, O., Chen, Z., Pappin, D.J., Dow, L.E., Papadopoulos, N., Gross, S.S., y Cantley, L.C. (2015). Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science* 350, 1391-1396.

Zappaterra, M.W., y Lehtinen, M.K. (2012). The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 2863-2878.

Zhao, C., Deng, W., y Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.

Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A., y Parada, L.F. (2005). Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer cell* 8, 119-130.

Zou, W., Yue, P., Lin, N., He, M., Zhou, Z., Lonial, S., Khuri, F.R., Wang, B., y Sun, S.Y. (2006). Vitamin C inactivates the proteasome inhibitor PS-341 in human cancer cells. *Clin Cancer Res* 12, 273-280.

