



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

Rol Funcional de la Vitamina C en el Desarrollo y Progresión del Glioblastoma

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

EDER AMAURY RAMÍREZ JIMÉNEZ
CONCEPCIÓN-CHILE
2020

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

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

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dr. Francisco Nualart

Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Ariel Castro

Facultad de Ciencias Biológicas



Dr. Jorge Fuentealba

Facultad de Ciencias Biológicas

Dr. Luis Sobrevia

Profesor Evaluador Externo
Universidad de Chile

Dr. Marcela Torrejón

Director (S)
Programa Doctorado en Ciencias Biológicas
Área Biología Celular y Molecular



Tesis de doctorado financiada por:

Beca MECESUP 1311 para estudios de doctorado (2015-2016).

Beca CONICYT para estudios de doctorado (2016-2019).

Beca CONICYT para finalizar estudios de doctorado (2019).

Beca Proyecto EDGP para décimo semestre (2019).

Proyecto FONDECYT Regular Francisco Nualart 1181243 (2018-Actualidad).

Proyecto FONDECYT Regular Francisco Nualart 1140477 (2014-2017).

Proyecto FONDECYT Regular Katterine Salazar 1190848 (2019-Actualidad).

ECM-12-PIA-CONICYT

DEDICATORIA



I. ÍNDICE GENERAL

I. ÍNDICE GENERAL.....	V
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
IV. ABREVIATURAS.....	XVI
V. RESUMEN.....	XIX
VI. ABSTRACT.....	XXI
VII. INTRUDUCCIÓN.....	1
GLIOBLASTOMA.....	1
Invasión del Tejido Sano.....	3
Origen Anatómico de los Glioblastomas.....	7
VITAMINA C.....	9
Transporte de Vitamina C.....	12
Expresión la isoforma corta de SVCT2.....	18
Captación y reciclamiento de la Vitamina C en el Cerebro.....	19
Efecto Bystander.....	24
Vitamina C y tratamiento contra el cáncer.....	26
Vitamina C en el desarrollo y progresión tumoral.....	29

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IX. HIPÓTESIS	36
X. OBJETIVO GENERAL.....	37
XI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
XII. MATERIALES Y MÉTODOS	38
CULTIVO CELULAR Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	38
BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA	40
INMUNODETECCIÓN	43
ENSAYOS FUNCIONALES.....	53
ENSAYOS DE LOCALIZACIÓN INTRACELULAR	56
XIII. RESULTADOS	59
Expresión de los transportadores de Vitamina C en muestras de glioblastoma humano.....	59
Análisis in vitro de la expresión y localización de los transportadores de Vitamina C en células de glioblastoma.....	68
Análisis funcional del transporte de vitamina C en células de glioblastoma y su compartimentalización intracelular	75
Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C..	79
Análisis de la sobre-expresión de SVCT2wt y su localización subcelular.....	85

Efecto del ácido dehydroascorbico sobre la viabilidad celular frente al estrés oxidativo	89
Efecto de la suplementación con vitamina C sobre la secreción de colágeno in vitro.....	92
Efecto de la Vitamina C sobre la migración de células de glioblastoma	98
Estudio in vivo del desarrollo y progresión del glioblastoma en cobayos.....	103
Expresión de los transportadores de vitamina C en los glioblastomas inducidos en Cobayos	108
Efecto del Escorbuto sobre el desarrollo y progresión de tumores inducidos en Cobayos	110
Análisis de la Progresión del Glioblastoma durante el escorbuto	111
Efecto de la vitamina C sobre la co-optación de vasos sanguíneos	113
Efecto de la Vitamina C sobre la deposición de colágeno en glioblastomas parenquimales.....	115
Inducción de xenotransplante derivado de paciente en el cerebro de cobayos	120
Efecto del escorbuto sobre el desarrollo y progresión de tumores con células HSVT-C3 inducidos en Cobayos.....	123
Análisis tridimensional de la Invasión de las células de glioblastoma.....	125
XIV. DISCUSIÓN	129

Glioblastomas Humanos expresan transportadores para Vitamina C.....	129
Células de glioblastoma tienen un transporte funcional para el DHA	134
Células de glioblastoma expresan una isoforma pequeña de SVCT2 localizada en el Retículo Endoplasmático Rugoso.....	138
El Ácido dehidroascórbico protege a las células de glioblastoma frente al estrés oxidativo	141
La vitamina C induce la secreción de colágeno IV in vitro	143
La Vitamina C favorece la migración de células de glioblastoma	145
Glioblastomas inducidos en el parénquima cerebral de Cobayo mantienen características histopatológicas de glioblastomas humanos.....	146
El escorbuto afecta el desarrollo y progresión de glioblastomas inducidos en Cobayos	148
La Vitamina C es necesaria para la deposición de colágeno intratumoral...	151
XV. CONCLUSIONES	157
XVI. ANEXO 1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	157
XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	182

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes de la Matriz Extracelular asociados a la invasión de las células de glioblastoma.....	6
Figura 2. Esquema de los transportadores de Vitamina C.....	13
Figura 3. Alineamiento de las secuencias peptídicas de UraA, UapA, SVCT1 y SVCT2.....	19
Figura 4. Incorporación y reciclamiento de la vitamina C en el cerebro.....	24
Figura 5. Efecto Bystander en tumores infiltrados con células activadas.....	26
Figura 6. Modelo de muerte y protección por parte del DHA.....	29
Figura 7. Características histopatológicas de los glioblastomas.....	60
Figura 8. Caracterización inmunofenotípica de los glioblastomas.....	62
Figura 9. Detección de colágeno por Generación de Segundos Armónicos en muestras de glioblastomas humanos.....	64
Figura 10. Detección de colágeno por tinción con Rojo Picrosirius en muestras de glioblastoma humano.....	65
Figura 11. Inmunodetección de los transportadores de Vitamina C en glioblastomas humanos.....	67
Figura 12. Caracterización por inmunocitoquímica de las células de glioblastoma humano.....	70
Figura 13. Expresión de los transportadores de vitamina C en las células de glioblastoma.....	72

Figura 14. Análisis de la localización celular de GLUT1 y SVCT2 por Microscopía de Súper-Resolución.....	74
Figura 15. Análisis de la captación de vitamina C en células de glioblastoma humano.....	76
Figura 16. Análisis de la acumulación citosólica de vitamina C en células de glioblastoma humano.....	78
Figura 17. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante sistema BacMam.....	80
Figura 18. Análisis de la localización de SVCT2 en el Retículo Endoplasmático Rugoso por microscopía de Súper Resolución SIM.....	82
Figura 19. Análisis de la localización de SVCT2 en extractos de Retículo Endoplasmático Rugoso de células HSVT-C3.....	84
Figura 20. Análisis de la localización subcelular de la sobreexpresión de SVCT2	86
Figura 21. Análisis por Microscopía de Súper Resolución SIM de la localización subcelular de la sobreexpresión de SVCT2.....	88
Figura 22. Efecto del DHA sobre la viabilidad celular frente a estrés oxidativo inducido por peróxido de Hidrógeno.....	91
Figura 23. Efecto de la suplementación con vitamina C en la deposición de colágeno <i>in vitro</i> mediante la tinción con Rojo Picrosirius.....	95
Figura 24. Efecto de la suplementación con vitamina C en la deposición <i>in vitro</i> de colágeno I y IV.....	96

Figura 25. Análisis del volumen de colágeno IV secretado por células RAV27.	97
Figura 26. Efecto de la vitamina C en la migración <i>in vitro</i> de esferoides tumorales con células U87MG y RAV27.....	99
Figura 27. Efecto de la vitamina C sobre la migración de esferoides tumorales sobre cultivos organotípicos de rebanadas de cerebro.....	102
Figura 28. Modelo ortotópico de glioblastoma con células U87MG inducido en cobayo.....	105
Figura 29. Marcadores asociados al glioblastoma en el modelo de xenotransplante de cobayo.....	107
Figura 30. Expresión de transportadores de vitamina C en el modelo ortotópico de glioblastoma en cobayo.....	109
Figura 31. Efecto del escorbuto sobre la generación de vasculatura glomeruloide en tumores U87MG.....	112
Figura 32. Efecto del escorbuto sobre la co-optación de vasos sanguíneos en tumores U87MG.....	114
Figura 33. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágenos.....	116
Figura 34. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágeno I en tumores inducidos en cobayo.....	118
Figura 35. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágeno IV en tumores inducidos en cobayo.....	119
Figura 36. Modelo de xenotransplante ortotópico derivado de paciente inducido en cobayo.....	121

Figura 37. Efecto del escorbuto sobre la generación de vasculatura glomeruloide e invasión de tumores HSVT-C3.....	124
Figura 38. Análisis de la invasión de las células de Glioblastoma mediante CLARITY.....	128
Figura 39. Compartimentalización de la vitamina C en el Retículo Endoplasmático Rugoso.....	137
Figura 40. Rol de la vitamina C en el desarrollo y progresión del glioblastoma	155
Figura Suplementaria 1. Controles de la Inmunohistoquímica para la detección de GFAP, Vimentina y Tubulina β -III.....	159
Figura Suplementaria 2. Expresión de marcadores de Glioblastoma en distintas regiones tumorales.....	160
Figura Suplementaria 3. Gemistocitos expresan SVCT2 intracelular.....	161
Figura Suplementaria 4. Evaluación de distintos anticuerpos para la detección de SVCT2 en cortes adyacentes de muestras humanas.....	162
Figura Suplementaria 5. Validación del anticuerpo SC-A16 por la sobreexpresión de SVCT2 en células U87MG de glioblastoma.....	163
Figura Suplementaria 6. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de marcadores de Glioblastoma en células RAV27.....	164
Figura Suplementaria 7. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores neurales en células de glioblastoma.....	166

Figura Suplementaria 8. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores nucleares en células de glioblastoma.....	167
Figura Suplementaria 9. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores de Célula Troncal Neural en células de glioblastoma.....	168
Figura Suplementaria 10. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores epitelio/mesenquima en células de glioblastoma.....	169
Figura Suplementaria 11. Western Blot para la detección de SVCT2, GLUT1 y GLUT3.....	170
Figura Suplementaria 12. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante Sistema BacMam en células U87MG	171
Figura Suplementaria 13. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante Sistema BacMam en células HSVT-C3	172
Figura Suplementaria 14. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante Sistema BacMam en células RAV27	173
Figura Suplementaria 15. Efecto del Peróxido de Hidrógeno en la translocación de SVCT2 hacia la membrana de células HSVT-C3.....	174
Figura Suplementaria 16. Viabilidad de las rebanadas de cerebro en cultivo hasta 14 DIV.....	175

Figura Suplementaria 17. Evaluación de distintos anticuerpos para la detección de SVCT2 en cortes seriados de un tumor inducido con células U87MG en el parénquima de un cobayo.....	176
Figura Suplementaria 18. SVCT2 se localiza en la membrana plasmática de las células perinecroticas.....	177
Figura Suplementaria 19. CLARITY para la detección de la red astrocítica en el cerebro de rata.....	178
Figura Suplementaria 20. Diferencias de la red actrocítica en diferentes regiones del cerebro.....	179
Figura Suplementaria 21. Red vascular de la corteza cerebral externa.....	180
Figura Suplementaria 22. Diferencias estructurales de la barrera hematoencefálica en un modelo de deterioro cognitivo asociado al envejecimiento.....	181
Figura Suplementaria 23. Análisis de la transducción adenoviral mediante CLARITY.....	182

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos de experimentación empleados para evaluar el efecto de la vitamina C en el desarrollo y progresión tumoral.....	31
Tabla 3. Oligonucléotidos.....	42
Tabla 3. Anticuerpos primarios.....	45
Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados.....	47
Tabla 5. Anticuerpos primarios conjugados.....	54
Tabla 6. Células de glioblastoma humano.....	68
Tabla 7. Frecuencia de las características histopatológicas de glioblastomas inducidos con células U87MG en cobayos control y escorbúticos.....	111
Tabla 8. Frecuencia de las características histopatológicas de glioblastomas inducidos con células HSVT-C3 en cobayos control y escorbúticos.....	125

IV. ABREVIATURAS

AA	Ácido Ascórbico
AML	Leucemia Mieloide Aguda
bFGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (del inglés, basic Fibroblast Growth Factor)
BAPN	β -Aminopropionitrilo
BEHAB	Proteína de Unión al Ácido Hialurónico enriquecida en el Cerebro (del inglés, Brain-Enriched Hyaluronan-Binding Protein)
BSA	Albúmina Sérica Bovina (del inglés, Bovine Serum Albumin)
BTIC	Células Inicadoras de Tumores Cerebrales (del inglés, Brain Tumor Initiating Cells)
cDNA	Ácido Deoxirribonucléico complementario (del inglés, complementary Deoxyribonucleic Acid)
DHA	Ácido Dehidroascórbico (del inglés, Dehydroascorbic Acid)
DKG	Ácido 2,3 diceto-L-gulonico
DNA	Ácido Deoxirribonucléico (del inglés, Deoxyribonucleic Acid)
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés, Epidermal Growth Factor)
EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor)

ESC	Célula Troncal Embrionaria (del inglés, Embryonic Stem Cell)
FBS	Suero Fetal Bovino (del inglés, Fetan Bovine Serum)
Fe ²⁺ /αKGDD	Dioxigenasa dependiente de Fe ²⁺ /α-Cetoglutarato
GBM	Glioblastoma Multiforme
GFP	Proteína Verde Fluorescente (del inglés, Green Fluorescent Protein)
GSC	Célula Troncal de Glioblastoma (del inglés, Glioblastoma Stem Cell)
GULO	L-Gulono-γ -lactona Oxidasa
HRP	Peroxidasa de Rábano (del inglés, Horseradish Peroxidase)
IDH	Isocitrato Dehidrogenasa
MEC	Matriz Extracelular
MGMT	O-6-Metilguanina-DNA Metiltransferasa
MMPs	Metaloproteínasas (del inglés, Matrix Metralloproteinasas)
NSC	Célula Troncal Neural (del inglés, Neural Stem Cell)
OBSC	Cultivos Organotípicos de Cortes Cerebrales (del inglés, Oganotypic Brain Slice Culture)
PFA	Parafolmaldehído
PMA	Acetato de Forbol Meristato (del inglés, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate)
PRS	Tinción con Rojo Picrosirius (del inglés, Picrosirius Red Staining)

RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RNA	Ácido Ribonucléico (del inglés, Ribonucleic Acid)
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SHG	Generación de Segundos Armónicos (del inglés, Second Harmonic Generation)
SPARC	Proteína Secretada Ácida y Rica en Cisteína (del inglés, Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein).
SVZ	Región Sub-Ventricular (del inglés, Sub-Ventricular Zone)
VEGF	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor)



V. RESUMEN

El glioblastoma es uno de los tumores más agresivos, con una media de supervivencia de 15 meses después del diagnóstico y tratamiento. Son altamente invasivos y su agresividad se debe, en parte, a la presencia de células troncales que aumentan la resistencia oxidativa al daño por radio y quimioterapia. Estos tumores, modifican su metabolismo, incrementando la expresión de transportadores de glucosa, GLUTs, los cuales incorporan glucosa y la forma oxidada de la Vitamina C, el ácido dehidroascórbico (DHA). Además, se desconocen los niveles de expresión y la función de SVCT2, el transportador de ácido ascórbico (AA, vitamina C reducida), en estos tumores. Los antecedentes bibliográficos indican que los glioblastomas se adaptan para aumentar su defensa antioxidativa, optimizando la captación de vitamina C. De esta forma hemos propuesto como hipótesis que “las células de glioblastoma incorporan preferentemente la forma oxidada de la vitamina C (DHA), esta molécula es reducida intracelularmente, favoreciendo la defensa antioxidativa, la biosíntesis de colágeno y además, potenciando un fenotipo agresivo”. Para el estudio de esta Tesis, desarrollamos los siguientes objetivos específicos: i) determinar si la forma de vitamina C (AA o DHA) preferentemente captada por las células U87MG, HST-C3 y RAV27 (derivadas de glioblastoma humano), modifican la defensa antioxidativa y la migración celular *in vitro*; ii) definir si bajas concentraciones de vitamina C *in vivo*, tienen efecto sobre la angiogénesis e

invasividad de los glioblastomas inducidos en el parénquima cerebral de cobayos. Nuestros resultados mostraron que las células de glioblastoma expresan GLUT1, GLUT3 y SVCT2. Los tres tipos celulares captan casi exclusivamente DHA a través de GLUT1. GLUT3 y SVCT2 se encuentran preferentemente intracelular. Utilizando un sistema de baculovirus y análisis bioquímicos de sub-fraccionamiento celular, definimos que SVCT2 está preferentemente en el RER. Esta forma de SVCT2, corresponde a una isoforma corta que no alcanza la membrana celular. Observamos que AA es compartimentalizado, estimulando la biosíntesis de colágeno IV, y además, su secreción. Vitamina C incrementa la migración de células que secretan colágeno, *in vitro* e *in situ*. Finalmente, al inducir tumores en cerebros de cobayos inmunocompetentes, con células U87 (tumor mesenquimático) y C3 (tumor de célula troncal), observamos que el escorbuto (déficit de vitamina C) retiene intracelularmente el colágeno biosintetizado por las células tumorales, reduce la invasión de los vasos sanguíneos (migración/co-optación) y afecta la formación de vasculatura glomeruloide, condiciones patológicas asociadas a malignidad. En esta Tesis, mostramos el rol funcional de la vitamina C en el desarrollo del glioblastoma.

VI. ABSTRACT

Glioblastoma is one of the most aggressive tumors, with an average survival of 15 months after diagnosis and treatment. Tumors are highly invasive and its aggressiveness is due, in part, to the presence of stem cells that increase oxidative resistance to damage by radio and chemotherapy. These tumors modify their metabolism, increasing the expression of glucose transporters, GLUTs, which incorporate glucose and the oxidized form of Vitamin C, dehydroascorbic acid (DHA). Furthermore, the expression level and function of SVCT2, the ascorbic acid (AA, reduced vitamin C) transporter, in these tumors is unknown. The bibliographic background indicates that glioblastomas adapt to increase its antioxidant defense, optimizing the uptake of vitamin C. In this sense we have hypothesized that "glioblastoma cells preferentially uptakes the oxidized form of vitamin C (DHA), this molecule is reduced intracellularly, promoting antioxidant defense, collagen biosynthesis and also, enhancing an aggressive phenotype". For this Thesis, we developed the following specific objectives: i) to determine if the form of vitamin C (AA or DHA) preferentially up taken by U87MG, HSVT-C3 and RAV27 cells (derived from human glioblastoma), modify the antioxidant defense and in vitro cell migration; ii) To define whether low concentrations of vitamin C in vivo have an effect on the angiogenesis and invasiveness of glioblastomas induced in guinea pig brain parenchyma. Our results showed that glioblastoma cells express GLUT1, GLUT3, and SVCT2. All three cell types uptakes DHA almost exclusively through GLUT1. GLUT3 and SVCT2 are

preferably intracellular. Using a baculovirus system and biochemical analysis of cellular sub-fractionation, we defined that SVCT2 is mainly located in the RER. SVCT2 corresponds to a short isoform that does not reach the cell membrane. We observe that AA is compartmentalized, stimulating collagen IV biosynthesis, and also its secretion. Vitamin C increases the migration of cells that secrete collagen, in vitro, and in situ. Finally, by inducing tumors in the brains of immunocompetent guinea pigs, with U87MG cells (mesenchymal tumor) and HSVT-C3 (stem cell tumor), we observe that scurvy (vitamin C deficiency) intracellularly retains collagen biosynthesized by tumor cells, reduces invasion of blood vessels (migration/co-option) and affects the formation of glomeruloid vasculature, pathological conditions associated with malignancy. In this Thesis, we show the functional role of vitamin C in the development of glioblastoma.

VII. INTRODUCCIÓN

GLIOBLASTOMA

El Glioblastoma multiforme (GBM) es uno de los tipos más agresivos de cáncer. Los pacientes poseen una media de supervivencia de 15 meses después del diagnóstico y tratamiento (Zanders et al., 2019). Se considera como un glioma difuso de origen astrocítico (de grado IV), de acuerdo a la actual clasificación de tumores cerebrales de la Organización Mundial de la Salud (Perry and Wesseling, 2016). Los tumores en su mayoría (91-95%), son primarios, es decir, su origen ocurre *de novo*; mientras que los tumores secundarios, que derivan de un tumor previo de menor grado, son más infrecuentes (Ohgaki et al., 2014, Ohgaki and Kleihues, 2013).

El 80% de los glioblastomas secundarios presenta la mutación en el residuo 132 del sitio catalítico de la Isocitrato Dehidrogenasa 1 (IDH1), con un cambio de Arginina por una Histidina (R132H) (Dang et al., 2009). Además de la mutación en la IDH1 (R132H), los Glioblastoma pueden presentar otras alteraciones como mutaciones en las IDH1/2 (IDH1/2 mut); El estado de metilación del Promotor de la O-6-Metilguanina-DNA Metiltransferasa (MGMT); la amplificación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y la ganancia del cromosoma 7p correlacionada a la pérdida del cromosoma 10q (7p gain/10q loss) (Ferris et al., 2017). En base a estas marcas moleculares, los GBM son subclasificados como

Clásicos, Mesenquimales, Proneurales y Neurales (Verhaak et al., 2010, Martinez-Lage et al., 2019).

Los glioblastomas poseen características histopatológicas asociadas a la elevada progresión tumoral: alta densidad celular, necrosis intratumoral, hiperplasia e hipertrofia vascular y la proliferación microvascular glomerular o también conocida como vasculatura glomeruloide (Perry and Wesseling, 2016). Además, presentan una alta heterogeneidad celular, misma que puede ser explicada a través de los modelos existentes de la jerarquía de las Células Troncales. Se ha demostrado en múltiples tipos tumorales, la presencia de Células Troncales de Cáncer, incluyendo a los glioblastomas. En este caso son llamadas Células Troncales de Glioblastoma (GSCs) y presentan similitud a las Células Troncales Neurales (Neural Stem Cells, NSCs), en cuanto a la expresión de marcadores y su relación con los nichos neurogénicos del adulto, ubicados en la Región Subventricular (SVZ) (Uchida et al., 2000) (Sanai et al., 2005).

Las GSCs han sido aisladas por la expresión de la Prominina 1 (CD133), demostrando su potencial diferenciativo y su autorenovación mediante ensayos funcionales *in vitro* (Singh et al., 2003). En un modelo *in vivo* de xenotransplante ortotópico en ratones inmunocomprometidos (NOD-SCID), las células CD133+ mostraron la capacidad de generar tumores idénticos a los observados en pacientes; con la expresión de marcadores como Nestina, GFAP y TUJ1/Tubulina β -III (Singh et al., 2004, Lathia et al., 2015). También se han postulado como las

responsables de la resistencia a radio y quimioterapéuticos (Bao et al., 2006, Chen et al., 2012).

Invasión del Tejido Sano

Otra característica distintiva de los glioblastomas es su alta invasividad. Hans Joachim Scherer en 1938, postuló la formación de estructuras secundarias que dependen del tejido preexistente. El autor observó en muestras de tejido circundante a tumores humanos, el crecimiento de células tumorales de manera parenquimal, perivascular, hacia la superficie pial (en el espacio leptomeníngeo) e intrafasicular en la materia blanca (Scherer, 1938). Se ha postulado que la formación de las estructuras secundarias de Scherer puede deberse tanto a la expresión de moléculas quimioatrayentes, como a la capacidad que tienen las células de glioblastoma para remodelar su microambiente con componentes de la Matriz Extracelular (MEC).

El Factor derivado de Estroma 1 (SDF1, por sus siglas en inglés) o CXCL12, es una quimiocina que se encuentra expresada en muchos órganos incluyendo el cerebro. Y los receptores para CXCL12 son CXCR4 y CXCR7 (receptores acoplado a proteína G). En células de glioblastoma se ha observado una alta expresión de CXCR4, y puede estar incrementada hasta 300 veces en GSCs CD133+ (Liu et al., 2006); también se ha propuesto como un marcador de mal pronóstico para el paciente (Bian et al., 2007). Por otra parte, la expresión de CXCL12 se ha observado en células endoteliales (Rao et al., 2012), durante la

satelitosis perivascular (Co-optación de vasos sanguíneos) y en neuronas durante la invasión perineural (Zagzag et al., 2008). Experimentalmente, se ha descrito que tumores inducidos en el cuerpo estriado de ratones, migran a través del cuerpo calloso hacia los nichos de la SVZ, acción mediada por CXCL12 (Cheng et al., 2013, Barone et al., 2014).

Las células de glioblastoma al invadir el parénquima cerebral adyacente, prefieren infiltrarse en el tejido sano a través de “andamios” de MEC, que otorgan mayor resistencia física; similar a lo que ocurre durante la migración de los precursores neurales durante el desarrollo embrionario (Canoll and Goldman, 2008). A través del espacio perivascular, las células pueden migrar y alcanzar el espacio subaracnoideo, pero interesantemente y por razones aún no conocidas, las células no invaden el lumen vascular (o es muy raro, 0,4-2%); como ocurre durante la metástasis en otros tipos agresivos de cáncer (Cuddapah et al., 2014). Durante la co-optación de vasos sanguíneos, las células tumorales migran empleando dos rutas: a través de una migración tipo intersticial con la glía limitante, desplazando a los astrocitos circundantes o bien; penetrando el espacio perivascular, hasta alcanzar las membranas basales de los vasos sanguíneos y migrar sobre ellas (Gritsenko et al., 2012, Farin et al., 2006, Watkins et al., 2014). Existen diferencias entre la MEC normal y la MEC tumoral. En la figura 1 se enlistan algunas moléculas claves en el desarrollo del glioblastoma. El parénquima cerebral carece de colágeno y fibronectina, haciendo de éste un tejido “suave”; sin embargo otras moléculas como proteoglicanos, ácido

hialurónico y tenacina-C se encuentran presentes y se han postulado como esenciales en la progresión tumoral. Además, el tumor genera su propia MEC secretando colágeno, vitonectina, etc. (de Gooijer et al., 2018). En el caso de la MEC normal del espacio perivascular, ésta es rica en componentes que favorecen la migración de las células tumorales (de Gooijer et al., 2018, Cuddapah et al., 2014). En ese sentido, se ha descrito que la Fibronectina, Vitronectina y Colágenos I y IV que están presentes en glioblastomas humanos (Chintala et al., 1996b) potencian la migración de células de glioblastoma en ensayos con gliomaesferas formadas a partir de líneas celulares (SNB19 y U251) y con muestras de biopsias humanas (Chintala et al., 1996a, Mahesparan et al., 1997, Mahesparan et al., 1999). Mediante un ensayo de invasión de esferoides sobre cultivos organotípicos de rebanas de cerebros (OBSC) se observó que el Colágeno VI está involucrado en la migración de células U87MG de glioblastoma (Han et al., 1995). También se ha demostrado que el Colágeno III favorece la migración de células SNB19, U251, UWR1 y UWR2 de glioblastoma en ensayos con cámaras de Boyden y de invasión en matrigel (Chintala et al., 1996c).

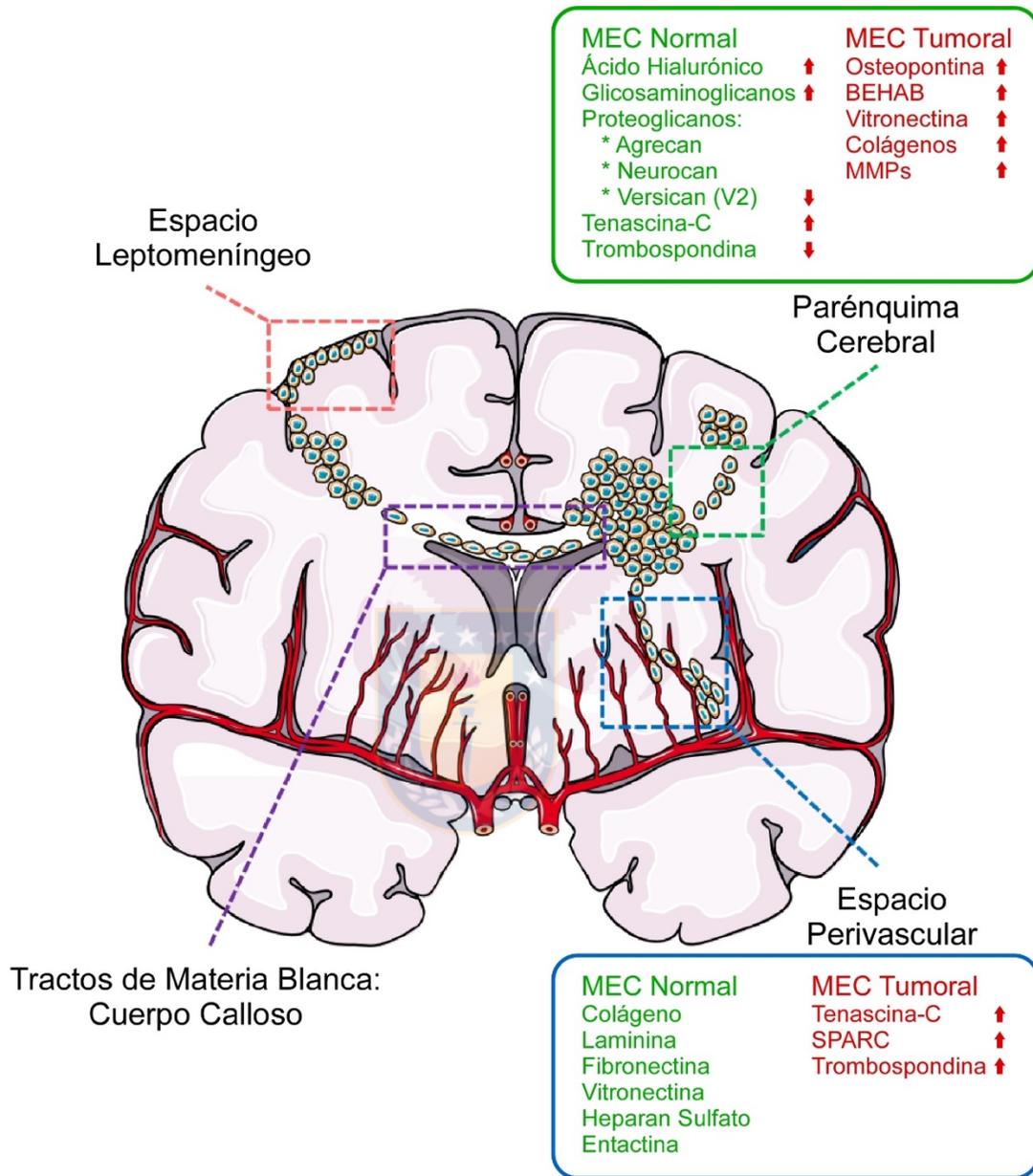


Figura 1. Componentes de la Matriz Extracelular asociados a la invasión de las células de glioblastoma. Se muestran las rutas descritas en el proceso de invasión en el cerebro: vía parénquima cerebral, por el espacio perivascular, a través de los tractos de materia blanca y en el espacio leptomeníngeo o subaracnoideo. En letras verdes se muestran los componentes fisiológicamente presentes de la Matriz Extracelular (MEC) normal. Las letras en rojo corresponden a los componentes de la MEC tumoral. Las flechas indican los cambios conocidos en la composición de la MEC. BEHAB, Proteína de Unión al Ácido Hialurónico enriquecida en el Cerebro; MMPs, Metaloproteinasas; SPARC, Proteína Secretada Acídica y Rica en Cisteína. Figura Adaptada de (de Gooijer et al., 2018).

Como se ha observado anteriormente, los colágenos (además de otros componentes de la MEC) tienen una función primordial en la migración de las células de glioblastoma durante la invasión y generación de estructuras secundarias. Por otro lado, las fibras de colágeno I se encuentra como componente en los nichos perivasculares, favoreciendo la expresión de marcadores de indiferenciación como CD133, sugiriendo un papel importante de la MEC en el mantenimiento de las GSCs (Motegi et al., 2014). Se sabe que al inhibir a la Lisil-Oxidasa con el uso de β -Aminopropionitrilo (BAPN) y D-Penicilamina se impide la formación de las fibras de colágeno *in vivo*, por lo tanto se reduce la angiogénesis tumoral, la actividad de metaloproteasas (MMP-2 y -9); finalmente, se compromete el tamaño del tumor (Mammoto et al., 2013). Además, se ha demostrado *in vitro*, que células U87MG de glioblastoma, incrementan la síntesis de colágeno VI al suplementar los cultivos celulares con Vitamina C (Han and Daniel, 1995). Sugiriendo, que la vitamina C favorece la síntesis y secreción de colágeno por parte de las células tumorales, permitiendo generar un microambiente que favorece la progresión del Glioblastoma; sin embargo, es necesario elucidar dicha asociación *in vitro* e *in vivo*.

Origen Anatómico de los Glioblastomas

En el año 2011, empleando una sofisticada estrategia molecular de mosaicos, se elucidó el origen celular de los gliomas, proponiendo que alteraciones en p53 y neurofibromatosis 1 (frecuentes en glioblastoma) afectan principalmente a los

oligodendroblastos, posicionándolos como fundadores en el desarrollo del glioblastoma (Liu et al., 2011). Además, muestras colectadas en diferente posición dentro de un mismo tumor, han mostrado diferencias fenotípicas que pueden ser rastreadas filogenéticamente para determinar el origen tumoral, sugiriendo la alta heterogeneidad en un mismo tumor (Aubry et al., 2015). No obstante, no solo es relevante el origen celular, sino también la ubicación donde se desarrolle el tumor. Los subtipos moleculares de glioblastomas ocupan diferentes regiones en el cerebro, pero varían de acuerdo a su proximidad con la SVZ; en ese sentido, tumores proneurales y neurales están más asociados a la SVZ; mientras que tumores clásicos y mesenquimales se desarrollan preferentemente en el parénquima cerebral (Steed et al., 2016). Análisis de expresión global de un amplio número de muestras permitieron correlacionar la frecuencia en la expresión de algunos marcadores moleculares con la ubicación del tumor, como el Receptor al Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) y Notch 1; observándose un incremento en la expresión de estos genes en tumores periventriculares (Denicolai et al., 2016), proponiendo que tumores periventriculares pudieran tener una respuesta diferente a estímulos angiogénicos. En el laboratorio, hemos observado que tumores inducidos en la SVZ, con células derivadas de un tumor subventricular humano, su volumen y proliferación se ven afectados cuando se desarrollan en cobayos deficientes en vitamina C; sin embargo, no hay diferencia con células de origen parenquimal (Jara et al., 2020). Bajo esta diversidad de glioblastomas y su alta heterogeneidad

celular, es conveniente considerar que la respuesta a la vitamina C difiera en glioblastomas periventriculares, de aquellos que se desarrollen en el parénquima cerebral. Es por ello que nos preguntamos si la vitamina C tiene efecto sobre el desarrollo del glioblastoma en tumores inducidos en el cuerpo estriado de cobayos escorbúticos.

VITAMINA C

La vitamina C es considerada como un micronutriente y tiene que ser incluida en la dieta de los humanos. Aunque la mayoría de los mamíferos la sintetizan los primates incluyendo al humano, los cobayos y algunos murciélagos son incapaces de hacerlo, ya que expresan una L-Gulono- γ -lactona Oxidasa (GULO) no funcional; enzima responsable del último paso en la síntesis de Vitamina C (Nishikimi et al., 1992, Nishikimi et al., 1994). La deficiencia de ésta Vitamina, induce una condición patológica conocida como Escorbuto. Se ha estimado que un alto porcentaje de la población actual padece cierto grado de deficiencia. Países desarrollados como Estados Unidos presentan 7,1% de incidencia, o Australia con 21,4%. Mientras que regiones en pobreza puede llegar hasta un 73,9% como ocurre en el norte de India (Ravindran et al., 2018, Maxfield and Crane, 2019).

La vitamina C es una molécula de 6 carbonos hidrosoluble que participa como donador de electrones (o agente reductor) en varios procesos bioquímicos, por

ejemplo durante la biosíntesis del colágeno, donde funciona como cofactor enzimático de las Hidroxilasas de Lisina y Prolina (Murad et al., 1981). Por su naturaleza química, la vitamina C pierde electrones de manera secuencial; en su estado reducido, el Ácido Ascórbico (AA) se encuentra mayormente como Anión Ascorbato. Al perder su primer electrón se convierte en Radical Ascorbato, el cual es muy inestable y tiende a perder un segundo electrón; convirtiéndose en la forma oxidada de la Vitamina C, el Ácido Dehidroascórbico (DHA). Fisiológicamente, el DHA se encuentra hidratado, lo que permite adquirir una conformación hemiacetal bicíclica, muy similar a la estructura espacial “en silla” de la glucosa. El DHA puede ser reducido nuevamente por acción enzimática, o bien, degradado de manera irreversible por la hidrólisis de su anillo para formar Ácido 2,3 diceto-L-gulonico (DKG) (Padayatty and Levine, 2016, Ngo et al., 2019).

Una de las funciones de la Vitamina C es mantener algunos minerales como el Hierro (Fe) y el Cobre (Cu) en estado reducido. El AA actúa como cofactor de Monooxigenasas dependientes de Cu^{2+} y de las Dioxigenasas dependientes de Fe^{2+}/α -Cetoglutarato ($\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{KGDDs}$). En estas últimas, el AA reduce al ion Férrico (Fe^{3+}) convirtiéndolo en ion Ferroso (Fe^{2+}), regresando a la enzima a un estado activo (Englard and Seifter, 1986). Algunas enzimas $\text{Fe}^{2+}/\alpha\text{KGDDs}$ son importantes en procesos como: las Prolil 4-Hidroxilasas (P4HA1/2/3), Prolil 3-Hidroxilasa y Lisil Hidroxilasa que participan en la síntesis de colágeno. En la regulación epigenética participan las Demetilasas de Citosinas de la familia “Ten-

Eleven Translocation” (TET1/2/3) y las Demetilasas de Histonas que contienen dominios Jumonji-C (JHDM) (Kuiper and Vissers, 2014, Markolovic et al., 2015, Cimmino et al., 2018). Se ha postulado que la Vitamina C participa en varios procesos fisiológicos y fisiopatológicos; desde el mantenimiento de las células troncales, la diferenciación, la reprogramación hasta la tumorigénesis.

En las Células Troncales Embrionarias (ESCs), la vitamina C actúa como un regulador directo de la actividad de la TET1, permitiendo la demetilación de genes asociados a la línea germinal (Blaschke et al., 2013). Su deficiencia en ratones *Gulo*^{-/-} en gestación, induce la hipermetilación de las regiones cercanas a 55 genes asociados a la regulación de la línea germinal; impactando en el número de células primordiales de las hembras embrionarias (DiTroia et al., 2019). Estos datos sugieren la importancia de la Vitamina C (de la nutrición materna) en la regulación de las células troncales, en el desarrollo del ovario y la fertilidad femenina.

En el adulto, las células troncales poseen un potencial diferenciativo más restringido y se encargan del recambio tisular, un ejemplo de ellas son las Células Troncales Hematopoyéticas (HSCs). En estas células se ha observado una mayor acumulación de AA, respecto a las células indiferenciadas. Lo cual correlaciona con la Actividad de TET2/3 y su DNA hipometilado (Agathocleous et al., 2017). La deficiencia de Vitamina C induce una actividad ineficiente de las TETs, incrementa la frecuencia de HSCs y promueve la Leucemia Mieloide Aguda (AML) (Agathocleous et al., 2017). Por otro lado, en HSCs deficientes de

TET2, el tratamiento con Vitamina C aumenta el estado demetilado del DNA, reduce la autorenovación aberrante de las HSCs y suprime la progresión leucémica *in vivo* (Cimmino et al., 2017). Estos dos grupos, asocian la deficiencia de Vitamina C en el desarrollo de la AML. Sin embargo, Células de Leucemia Linfoblástica Crónica de Linfocitos B, presentan 15 veces mayor contenido de AA que linfocitos B de personas sanas y de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda y AML (Liebes et al., 1981). Estas publicaciones hacen pensar que el efecto que tiene la Vitamina C en el desarrollo y progresión tumoral depende de múltiples factores, principalmente asociados al fenotipo celular y su capacidad para incorporar, acumular y metabolizar Vitamina C.



Transporte de Vitamina C

El mecanismo para ingresar Vitamina C a la célula depende de su forma química. El DHA es captado a través de transportadores de glucosa (GLUTs, miembros de la Clase I y III), incluso con mayor afinidad al DHA que a la glucosa (Rumsey et al., 1997). Para la captación de AA, las células expresan los Transportadores de Vitamina C dependientes de Sodio (SVCTs) (Daruwala et al., 1999, Tsukaguchi et al., 1999, Nualart et al., 2014). En la Figura 2 se muestran los SVCTs y GLUTs hasta el momento reportados para la captación de AA y DHA respectivamente, anotando la Constante de Afinidad (Km) para cada uno.

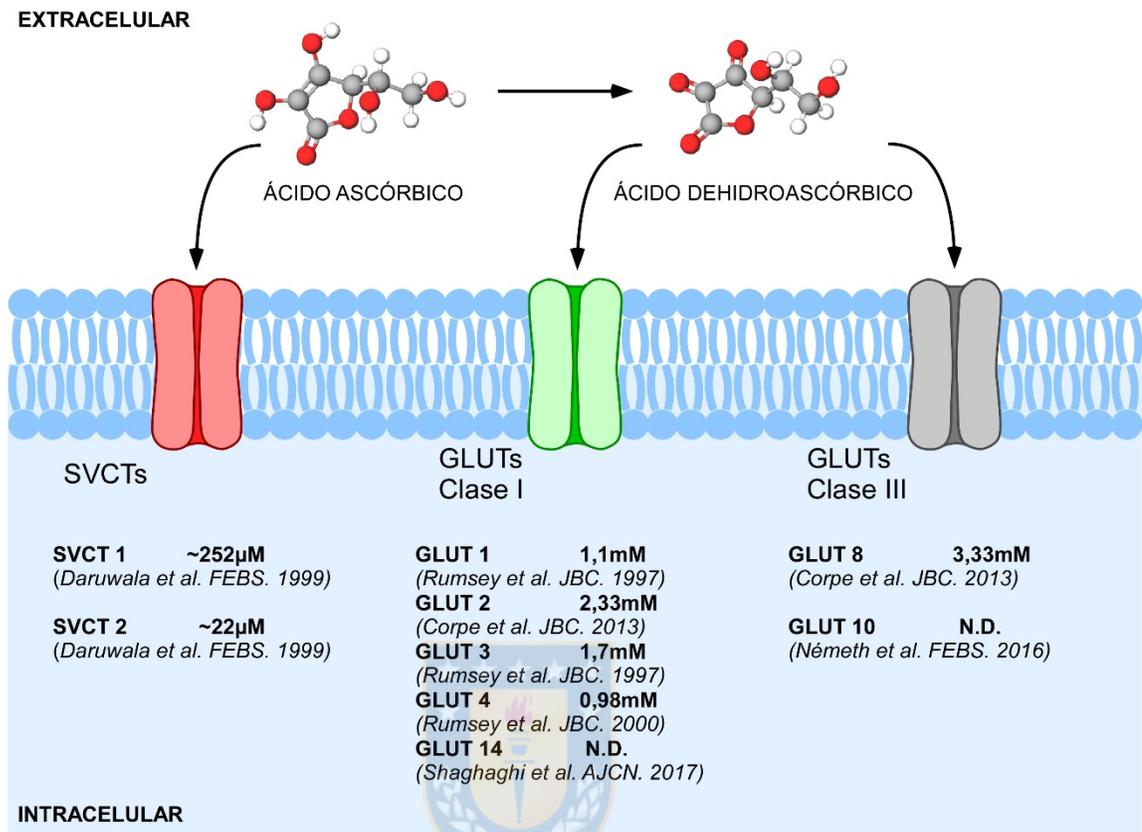


Figura 2. Esquema de los transportadores de Vitamina C. La incorporación de la Vitamina C a la célula depende de su forma química. El Ácido Ascórbico es transportado por los SVCTs, en la mayoría de los tejidos por SVCT2. La oxidación extracelular permite la captación del Ácido Dehidroascórbico por los transportadores de Glucosa (GLUTs) clases I y III. Para GLUT10 y GLUT14 se ha observado la captación de DHA, pero no se tienen datos cinéticos de transporte.

Los GLUTs son proteínas integrales de membrana y median el transporte facilitado de la glucosa. Se han reportado 14 miembros de la familia de los GLUTs, los cuales muestran diferencias por su expresión y su afinidad al sustrato. La glucosa y el DHA no son los únicos sustratos, también pueden transportar Fructosa, Galactosa, Manosa, Glucosamina y mioinositol (Barron et al., 2016).

Aunque poseen una alta homología entre ellos, se han agrupado en tres clases principalmente por la presencia de un “loop” extracelular que contiene sitios de N-glicosilación, ubicado entre los dominios transmembrana (TM) 1 y 2 (Clases I y III), o bien, entre los dominios TM 9 y 10 (Clase II) (Barron et al., 2016). Además, se han resuelto la estructura de GLUT1 (Deng et al., 2014) y GLUT3 (Deng et al., 2015) humanos; confirmando los 12 dominios transmembrana y el mecanismo de transporte asociado a la alternancia en la presentación de los sitios de unión endo- y exofacial del transportador. El transporte puede ser inhibido por Citocalasina B, compitiendo por el sitio de unión a la glucosa endofacial (IC_{50} 2.2 μ M en presencia de 1mM de Glucosa) (Kapoor et al., 2016, Jung and Rampal, 1977).

Mientras que la distribución de GLUTs en los tejidos es ubicua, los SVCTs se expresan de manera específica. En humanos, se han descrito tres miembros de SVCTs (1/2/3) (Burzle et al., 2013). SVCT1 participa en la absorción de la vitamina C a través de la membrana de los enterocitos, también se expresa en el riñón, hígado y pulmón (Tsukaguchi et al., 1999). SVCT2 se expresa en varios tejidos, incluyendo el cerebro; focalizando su expresión en los plexos coroideos, donde participa en la captación de AA desde la sangre al líquido cefalorraquídeo (Astuya et al., 2005, Ulloa et al., 2019, Sotiriou et al., 2002). SVCT3, es un transportador huérfano, del que poco se conoce su función (Burzle et al., 2013). SVCT1 y SVCT2 fueron clonados y secuenciados desde rata (Tsukaguchi et al., 1999) y humano (Daruwala et al., 1999, Rajan et al., 1999). En rata, se propuso

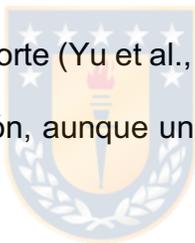
la estructura de SVCT2 en base a los patrones de hidrofobicidad. Dicha estructura cuenta con 12 dominios transmembrana, 2 sitios putativos de N-Glicosilación (Asn132 y Asn140), sitios de fosforilación por PKC (Ser397, 455, 584 y Thr571) y por PKA (Ser584) (Tsukaguchi et al., 1999). La secuencia de SVCT2 humano, tiene homología con la de rata (96%) y se identificaron 1.950pb en el marco de lectura abierto que codifican para 650 aminoácidos. Análisis funcionales de expresión en Oocitos de rana *Xenopus sp.* mostraron una Km de 22,2µM. Además de ser específico para AA y no para DHA (Daruwala et al., 1999).

SVCT2 es un transportador activado por Sodio (Na^+), donde el Na^+ coopera con el transportador para llevarlo de una baja a una alta afinidad (Godoy et al., 2007). Al sobre-expresar SVCT2 en células HEK293, se observaron diferentes estados del transportador: Un estado inactivo en ausencia de Magnesio (Mg^{2+}) y Calcio (Ca^{2+}), mostrando su dependencia a estos cationes. Un estado activo de baja afinidad a concentraciones menores a 20mM de Na^+ y, dos estados activos de alta afinidad a concentraciones elevadas de Na^+ , donde la cooperatividad sería regulada por la concentración de AA (Godoy et al., 2007). Estos datos sugieren que SVCT2 pudiera estar activo con baja afinidad en un ambiente intracelular (con Mg^{2+} , con fluctuaciones de Ca^{2+} , <20mM de Na^+ y >200µM de AA); mientras que en la membrana celular (con Mg^{2+} , con Ca^{2+} , 135mM de Na^+ y >200µM de AA) funcionaría con alta afinidad.

Se ha propuesto un mecanismo de transporte en base a la estructura resuelta por cristalografía de rayos X del transportador de Uracilo/H⁺ UraA; un miembro de la familia de Transportadores de Nucleobases/Ascorbato (NAT), a la que SVCT1 y SVCT2 pertenecen. En este transportador se observó que tres aminoácidos del dominio central son esenciales en el simporte de protones (Glu 241, His 245 y Glu 290). El Glutamato 241 no varía en todos los NAT; mientras que la Histidina 245 cambia a Ácido Aspártico en los SVCTs. El estado conformacional “*default*” del transportador se encuentra con el sitio exofacial abierto, permitiendo la unión al Uracilo y la protonación de al menos uno de los glutamatos; lo que conlleva al cambio conformacional (con la apertura del sitio endofacial). La translocación del protón a la Histidina 245 y la subsecuente deprotonación de los residuos generan cambios locales que permiten la disociación con el Uracilo para su liberación al espacio intracelular (Lu et al., 2011). Los autores sugieren un mecanismo de transporte conservado. Así como la Histidina 245 de UraA tiene un rol importante en el transporte de protones, el Aspartato 245 de SVCT2 tendría un rol similar con el Sodio (Lu et al., 2011).

La estructura cristalizada del UraA de 14 segmentos transmembrana (TMs) (Fig. 3), corresponden a dos repeticiones invertidas (7+7) organizadas en un dominio central (TM1-TM4 y TM8-TM11) y un dominio de compuerta compuesto por los otros seis segmentos, principalmente por los TM5 y TM12. La interacción con el sustrato ocurre en el TM10 donde se ubica la Glicina 289 y el Glutamato 290 del motivo NAT (Lu et al., 2011). Posteriormente se logró cristalizar UraA en una

conformación endofacial abierta observando cambios considerables en los TM5 y TM12, girando en su propio eje y de manera casi perpendicular en la interfaz de los dominios central y de compuerta (Yu et al., 2017). Similares resultados se observaron en el transportador de Purina/H⁺, UapA (Alguel et al., 2016), sugiriendo que los cambios conformaciones de los TM5 y TM12 de UraA y UapA, entre los estados ocluido y endofacial abierto se conservan a lo largo de todos los NAT, incluyendo SVCT2. Adicionalmente, se observó que la dimerización del transportador incrementaba su actividad un 70%; e interesantemente, el heterodímero con mutantes con pérdida de función (E241A, H245A) también incrementa la V_{max} del transporte (Yu et al., 2017), sugiriendo que la dimerización es requerida para la captación, aunque un solo transportador es suficiente para la translación del sustrato.



De acuerdo a los mapas de hidrofobicidad se ha propuesto que la estructura de SVCT2 contiene 12 TMs (Tsukaguchi et al., 1999), mientras que las estructuras de alta resolución (2,7-3,7Å) de UraA (Lu et al., 2011) y UapA (Alguel et al., 2016) suponen 14 TMs, y presentan una similitud de secuencia de 27,53% y 19,04% respectivamente (SWISS MODEL); sin embargo, las secuencias asociadas al sitio catalítico (motivo NAT) y del dominio de compuerta (TM5 y TM12) se mantienen conservadas, sugiriendo que SVCT2 tendría un mecanismo similar de captación. Interesantemente, se ha descrito una isoforma corta de SVCT2, la cual carece del dominio TM5, por lo que podría cambiar la forma de funcionar del transportador, incluyendo su direccionalidad

Expresión la isoforma corta de SVCT2

A partir de tejido cerebral fetal humano se clonó una isoforma corta de SVCT2, que resulta de *splicing* alternativo y carece de 345pb que corresponde a la delección parcial del dominio 4 y completa de los dominios 5, 6 (Lutsenko et al., 2004). Se encontró expresada en varios tejidos incluyendo el cerebro fetal y adulto humano. Y funciona como una dominante negativa para el transporte de AA (Lutsenko et al., 2004). En un modelo de células N2a de neuroblastoma de ratón, se confirmó la hetero-oligomerización de ambas isoformas reduciendo la captación de vitamina C. Además se observó que la expresión de la isoforma corta correlaciona con el desarrollo postnatal de la corteza cerebral (Salazar et al., 2014). Estos reportes sugieren que la expresión de la isoforma corta pudiera estar participando en la regulación de la función de SVCT2 de manera temporal y tejido-específica.

Captación y reciclamiento de la Vitamina C en el Cerebro

La vitamina C una vez que es absorbida por los enterocitos, pasa al torrente sanguíneo (a una concentración de $50\mu\text{M}$), donde es distribuida a todo el cuerpo, incluyendo el cerebro; el cual posee barreras anatómicas que son selectivas el paso de sustancias. Se ha propuesto que la vitamina C en circulación, ingresa al cerebro principalmente a través de los plexos coroideos (Figura 4A) (Astuya et al., 2005, Ulloa et al., 2019, Angelow et al., 2003); en esta estructura, la microvasculatura (MV) se encuentra fenestrada, por lo que el AA difundiría

libremente al Estroma del Plexo Coroideo (EPC). La presencia de células mieloides tentativamente podría inducir la oxidación extracelular del AA (Efecto Bystander) (Ulloa et al., 2013). Otra alternativa sería el transporte de DHA generado localmente a través de las células endoteliales que expresan GLUT1, liberando el DHA al EPC. Las Células del Plexo Coroideo, forman un epitelio simple, con la expresión de SVCT2 y GLUT1 en su membrana basolateral, sugiriendo la incorporación de AA y DHA a la célula epitelial (Ulloa et al., 2019). El DHA puede ser reducido en el interior de las células del Plexo y ser liberado a través de transportadores de eflujo hacia el Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en los Ventrículos (a concentración de 500 μ M) (Angelow et al., 2003, Stamford et al., 1984). El AA en el LCR, llegaría a las células endodiales, las cuales expresan SVCT2 en la membrana apical (García Mde et al., 2005). Finalmente se entregaría el AA al Parénquima Cerebral (PC), alcanzando concentraciones de 200-400 μ M (Estriado [220 μ M], en la corteza cerebral [300 μ M] y en el cuerpo calloso [370 μ M]) (Figura 3A) (Stamford et al., 1984).

No se puede descartar que la incorporación de AA ocurra a través de la Barrera Hematoencefálica (Figura 4B). Debido a que las células endoteliales de la microvascularura cerebral no expresan SVCT2 (Qiao and May, 2008), el DHA pasaría a través del endotelio vascular por GLUT1, llegando al espacio perivascular (EPV). Probablemente en este espacio, sea de suma importancia el reciclamiento de la vitamina C, ya que se ha observado que los Pericitos expresan SVCT2 y captan AA (Parker et al., 2015), además, tienen la capacidad

de secretarlo al EPV (May and Qu, 2015) y son los responsables del mantenimiento de las membranas basales (MB) en la deposición de Colágeno IV (Qiao et al., 2009). Finalmente el DHA cruza a través de la glia por la expresión de GLUT1 en los pies terminales de los astrocitos (Morgello et al., 1995). Aunque esta manera de incorporación de vitamina C al cerebro, fue propuesta por Agus y colaboradores en 1997 (Agus et al., 1997), cada vez existe más evidencia de que los Plexos Coroideos son los responsables en la incorporación de Vitamina C en el cerebro (Astuya et al., 2005, Ulloa et al., 2019).

En el cerebro, tanto las neuronas como los astrocitos acumulan vitamina C (10mM y 0,9mM respectivamente) (Rice and Russo-Menna, 1998) y poseen una captación diferencial de cada una de las formas químicas. Se ha demostrado que neuronas captan AA, debido a que expresan SVCT2 (Caprile et al., 2009, Qiu et al., 2007, Mun et al., 2006), mientras que los astrocitos no lo expresan bajo condiciones fisiológicas. Sin embargo, se induce su expresión durante la astrogliosis reactiva en varias condiciones patológicas (Salazar et al., 2018). Por su parte, el DHA es captado por astrocitos mediante GLUT1 (Astuya et al., 2005; Garcia-Krauss et al., 2015) y en las neuronas por la expresión de GLUT3 (Nagamatsu et al., 1992, Simpson et al., 2008). En las neuronas, el AA es oxidado a DHA y éste último puede regular el metabolismo energético (Cisternas et al., 2014), promover su muerte celular (Garcia-Krauss et al., 2015) y en condiciones de estrés oxidativo, inducir necroptosis neuronal (Ferrada et al., 2020). Sin embargo, los astrocitos que captan DHA, tiene la capacidad de reducirlo, ya que

poseen una concentración mayor de glutatión (GSH), 3,8mM en astrocitos y 2,5mM en neuronas (con una relación AA/GSH de 1:4 en astrocitos y 4:1 en neuronas) (Rice and Russo-Menna, 1998). El DHA protege a los astrocitos frente a estrés oxidativo, mediado por un aumento en la actividad de la Glutatión Peroxidasa (GPx) y Glutatión Reductasa (GR), incrementando los niveles intracelulares de GSH (Kim et al., 2008, Kim et al., 2005). Tanto en un ambiente sano, como bajo estrés oxidativo, los astrocitos toman el DHA extracelular evitando comprometer la viabilidad neuronal. De esta manera, se postuló que los astrocitos confieren protección a las neuronas favoreciendo el reciclamiento de vitamina C de acuerdo al modelo de “*Bystander*” (Figura 4C) (Nualart et al., 2003, Nualart et al., 2014, Garcia-Krauss et al., 2016).



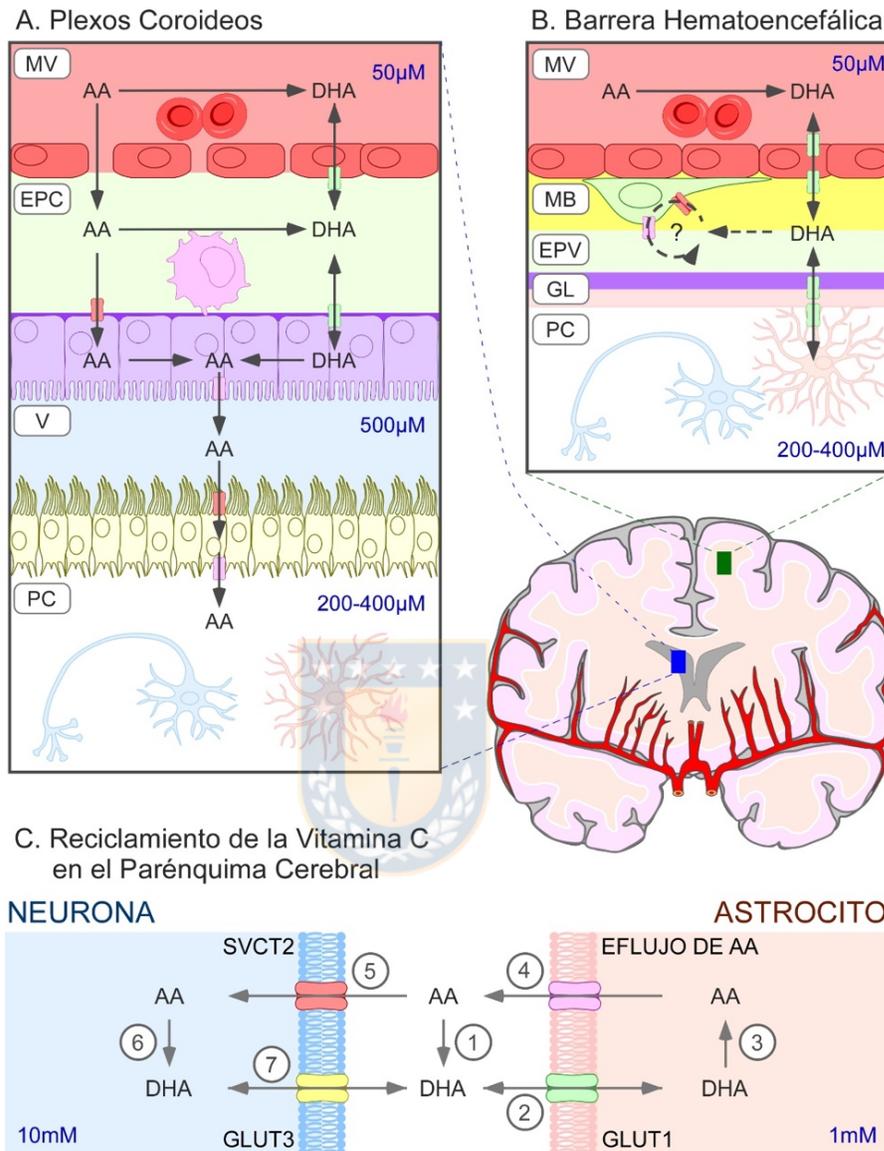


Figura 4. Incorporación y reciclamiento de la vitamina C en el cerebro. La vitamina C es captada en el cerebro por los Plexos corioides (A), o por la Barrera Hematoencefálica (B). Una vez que llega al parénquima cerebral ocurre el reciclamiento (C). En el espacio extracelular puede ocurrir la oxidación del Ácido Ascórbico, AA a su forma de Ácido Dehidroascórbico, DHA (1) permitiendo la incorporación de DHA al astrocito a través de GLUT1 (2). El astrocito es capaz de reducirlo a AA (3) y poder liberarlo al espacio extracelular por transportadores de eflujo (4). El AA es captado por las neuronas, mediante SVCT2 (5). En la neurona, el AA es empleado como antioxidante, lo que induce la formación de DHA (6), mismo que puede ser liberado por GLUT3 y de esta manera ser reciclado (7). MV, Microvasculatura; EPC, Estroma del Plexo Coroideo; V, Ventriculo; PC, Parénquima Cerebral; MB, Membrana Basal; EPV, Espacio Perivascular; GL, Glia Limitante.

Efecto Bystander

Se conoce como “efecto bystander” al proceso en el que una población celular capta de manera pasiva la vitamina C en forma de DHA. Para que esto ocurra, otro tipo celular oxida la vitamina C; ya sea como resultado de su metabolismo o bien, como se describió originalmente, por la oxidación extracelular mediada por el superóxido producido por células del sistema inmune (Figura 5) (Nualart et al., 2003). Los primeros resultados se observaron en células DU-145 de cáncer de próstata, que no expresan un transporte funcional de AA. Sin embargo, cuando estas células fueron co-cultivadas con células HL-60 de origen promielocítico, y que generan superóxido al ser activadas con Acetato de Forbol Meristato (PMA), las células DU-145 captan DHA. Estos resultados fueron reproducibles en otros tipos celulares, tanto normales como tumorales y, que captan exclusivamente DHA o ambas formas químicas de la vitamina C (Nualart et al., 2003). Más reciente aún, Células de Papiloma de Plexo Coroideo humano (HCPPCs), expresan SVCT2 y GLUT1, por lo tanto tienen la habilidad de captar ambas formas químicas de Vitamina C. No obstante, captan preferentemente DHA, cuando son expuestas a células HL-60 activadas, obedeciendo el modelo del Efecto Bystander (Ulloa et al., 2013). También, como se analizó anteriormente, esto pudiera ocurrir de manera fisiológica en los plexos coroides (Ulloa et al., 2013). Existe un aumento en literatura respecto a la captación de DHA por parte de células tumorales (Yun et al., 2015, Ngo et al., 2019). Y que esto puede

asociarse a la sobreexpresión de los GLUTs en cáncer (Godoy et al., 2006). Sin embargo, en circulación sanguínea, la vitamina C se encuentra reducida, por lo que un modelo de oxidación local permitiría entender la captación de Vitamina C en células que no expresan un transporte funcional para AA. Además, El efecto Bystader puede entenderse de manera general en un contexto normal o tumoral.

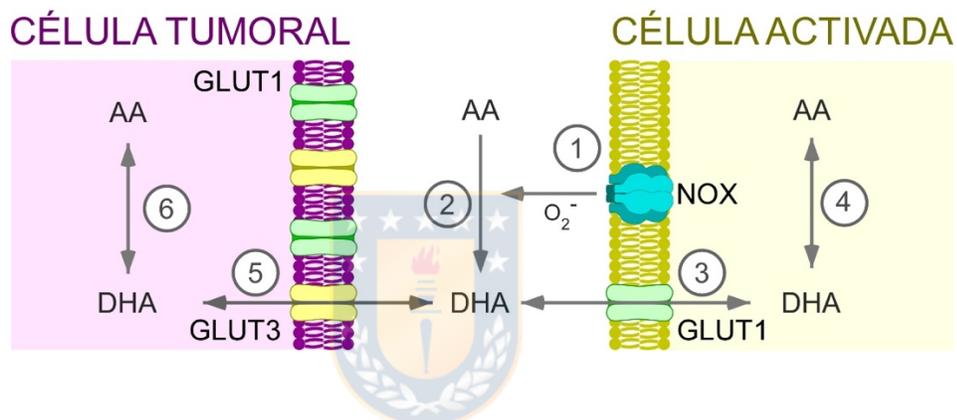


Figura 5. Efecto Bystander en tumores infiltrados con células activadas. Tumores infiltrados con células mieloides, producen superóxido al estroma al activarse la NADPH Oxisadasa NOX (1), permitiendo la oxidación extracelular de la Vitamina C a DHA (2). Este DHA puede ser captado por las células activadas (3) y reducirlo (4). Sin embargo, la célula tumoral que sobre expresa GLUTs, captaría el DHA generado por la célula activada (5), mismo que reduciría y acumularía intracelularmente (6).

Tumores cerebrales como los glioblastomas, se encuentran infiltrados por células del sistema inmune; como macrófagos activados asociados al tumor (TAM) y microglía, teniendo 30-50% del aporte celular en el tumor (Hambardzumyan et al., 2016). Sorprendentemente, la presencia de estas células favorece la progresión tumoral. Se observó que la ablación de la microglía *in vivo*, reduce el tamaño del tumor y mejora la supervivencia; pero, la activación de la misma,

promueve la proliferación de las células tumorales y se asocia al aumento en el tamaño del tumor (Platten et al., 2003, Zhai et al., 2011). Se ha demostrado que la microglía activada produce superóxido generado por NADPH oxidasa (NOX), principalmente por la elevada expresión de la NOX2 que se localiza en la membrana celular (Sankarapandi et al., 1998, Haslund-Vinding et al., 2017). De esta manera, pensamos que células de Glioblastoma captarían preferentemente DHA generado localmente bajo modelo Bystander.

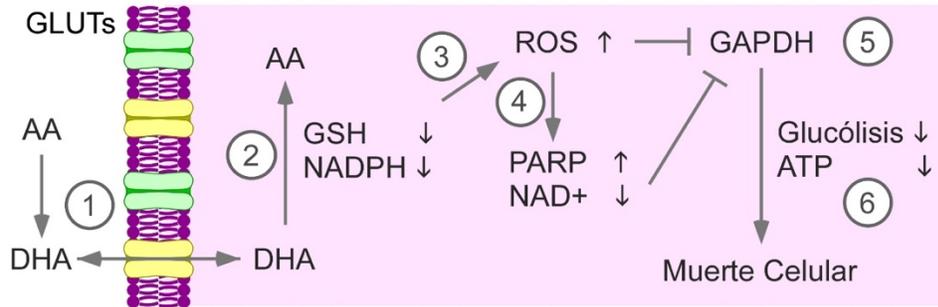
Vitamina C y tratamiento contra el cáncer

Uno de los temas controversiales en la ciencia es el uso de la vitamina C para el tratamiento contra el cáncer. Linus Pauling junto a Ewan Cameron propusieron en los años 70s el uso de las megadosis de vitamina C para el tratamiento contra el cáncer (Cameron and Pauling, 1976, Cameron and Pauling, 1978); siendo refutada años más tarde, al sugerir que bajo las mismas condiciones los pacientes tratados con ascorbato, a aquellos que recibían un placebo, no presentaban diferencias significativas (Moertel et al., 1985, Creagan et al., 1979).

Para ese entonces, no se prestaba una delicada atención a la forma química que se empleaba. Y por lo tanto las respuestas biológicas pudieran ser controversiales. Sin embargo en los últimos años, se ha postulado que el efecto citotóxico de la vitamina C en las terapias contra el cáncer pudiera deberse al DHA. En el año 2015, se postuló un posible mecanismo, donde la vitamina C

favorece la muerte de células tumorales. Se observó que en tumores y líneas celulares de cáncer colorectal, con mutaciones en KRAS y BRAF (asociado a una elevada expresión de GLUT1 y su dependencia metabólica a la glucólisis), el DHA favorece la muerte celular y afecta el tamaño del tumor, esto mediado por la inhibición de la Gliceraldehido-3-Fosfato Dehidrogenasa (GAPDH), limitando la glucólisis y la síntesis de ATP (Yun et al., 2015). Sin embargo, este efecto citotóxico solo se observa en las líneas celulares con las mutaciones mencionadas y no en todas las células de cáncer colorectal. Incluso, al evaluar la sensibilidad a concentraciones farmacológicas de DHA en 43 líneas celulares de diferentes tipos de cáncer; el 16% de líneas celulares fueron resistentes a DHA 20 mM (células H1229, U383, U87MG, RPMI8226, HT29 y Hs587T) que corresponden a tipos agresivos de cáncer como carcinoma pulmonar metastásico, glioblastoma, mieloma, cáncer de colon y de mama (Chen et al., 2008). Proponemos que la respuesta al tratamiento con DHA está asociada al metabolismo y fenotipo celular; es decir, existen células que son sensibles al DHA o bien, pueden ser resistentes y verse favorecidas por el DHA (Figura 6) (Ferrada et al., 2019).

CÉLULA SENSIBLE AL DHA



CÉLULA BENEFICIADA POR DHA

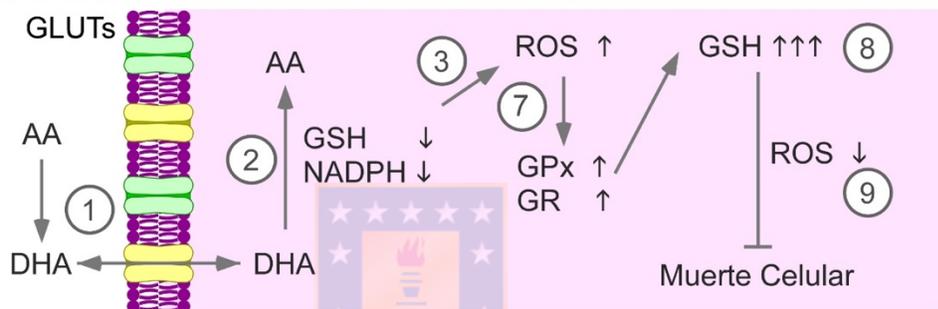


Figura 6. Modelo de muerte y protección por parte del DHA. Las células tumorales captan preferentemente DHA por la sobreexpresión de GLUTs (1). Todas las células son capaces de reducir el DHA a AA con gasto de GSH y NADPH (2), lo que induce un aumento en ROS (3). En las células sensibles al DHA, el ROS intracelular conllevaría a un aumento de la actividad de la Poli ADP-Ribosa Polimerasa (PARP) agotando el NAD⁺ (4); al igual que la inhibición de la GAPDH (5), reduciendo la Glucólisis y la formación de ATP (6), lo que conllevaría a la muerte celular. Sin embargo, algunos tipos celulares, el ROS intracelular estimularía la actividad de las Glutación Peroxidasa (GPx) y Glutación Reductasa (GR) (7), aumentando el GSH intracelular disminuyendo el ROS (9) y finalmente se impediría la muerte celular inducida por ROS.

Existen algunos reportes en los que el uso de la vitamina C puede afectar el éxito de los tratamientos para diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, en células de adenocarcinoma de mama, al ser tratadas con Tamoxifeno, el AA incrementa la supervivencia de las células, favoreciendo su resistencia al fármaco (Subramani et al., 2014). En un modelo de mieloma *in vivo e in vitro*, se demostró que la vitamina C (a concentraciones fisiológicas), interactúa directamente con bortezomib (inhibidor del proteasoma), antagonizando su actividad al reducir su afinidad por la subunidad tipo quimiotripsina (Perrone et al., 2009). En ensayos sobre células de linfoma, se observó que la acumulación de AA, captada principalmente en su forma oxidada (DHA), atenúa la citotoxicidad de algunos fármacos antineoplásicos como la doxorubicina, resultando en la reducción substancial de la eficacia del tratamiento (Heaney et al., 2008).

Aunque existe evidencia contradictoria, pensamos que la discrepancia en los resultados es debido a múltiples factores: El diseño de los experimentos, diferencias en la vía de administración, en la forma química, en las concentraciones empleadas, el modelo celular utilizado y el contexto biológico.

Vitamina C en el desarrollo y progresión tumoral

Para evaluar el desarrollo tumoral es necesario considerar el uso de animales de experimentación. Generalmente en los laboratorios se emplean ratones y ratas de cepas silvestres o ratones inmunocomprometidos, pero éstos sintetizan su propia vitamina C. No obstante, se han desarrollado ratones transgénicos que

recapitulan la deficiencia vitamínica (ratones GULO^{-/-} y SFX). Además es posible inducir escorbuto en cobayos. En la tabla 1 se muestran algunos experimentos donde se observa el efecto de la vitamina C en el desarrollo tumoral en animales que sintetizan vitamina C y aquellos que no lo hacen.

Tabla 1. Modelos de experimentación empleados para evaluar el efecto de la Vitamina C en el desarrollo y progresión tumoral.

Cepa	Modelo	Tratamiento	Efecto	Referencia
Animales que sintetizan Vitamina C				
Ratones Silvestres				
RIII/Imr	Cáncer de mama Espontáneos en esta cepa	D: 0.76% - 8,3% Vía: Oral, en alimentos. Tx. <i>Ad libitum</i> hasta 114 semanas	Dieta baja en Vitamina C incrementa la aparición de tumores mamarios	(Pauling et al., 1985)
Ratones Ncr-un/nu				
	Cáncer de Ovario Células Ovar5 Cáncer de Páncreas de ratón Células Pan02 Glioma de rata Células 9L	D: 4g/kg Vía: IP Tx: Una o dos veces por día. Hasta 12 o 30 días	La aplicación farmacológica diaria de AA reduce el tamaño de los tumores.	(Chen et al., 2008)
Ratones SCID				
	Linfoma Células P493	D: 5g/L AA Vía: Oral en agua de uso. Tx. <i>Ad libitum</i> por 22 días	La Vitamina C no permite el crecimiento tumoral.	(Gao et al., 2007)
	Linfoma No Hodking Células RL	D: 250mg/kg DHA Vía: IP Tx: cada 2 días hasta los 28 días.	La vitamina C reduce el efecto de Doxorubicina.	(Heaney et al., 2008)

	Mieloma Múltiple Células RPMI8826	D: 40mg/kg Vía: IV Tx: diaria por 26 días.	La Vitamina C reduce la actividad del Botozemib <i>in vivo</i> .	(Perrone et al., 2009)
	Melamoma Células B16	D: 3g/kg AA Vía: IP Tx: 2 veces al día por 5 días. Sacrificio hasta 14 días	La vitamina C reduce el tamaño tumoral.	(Serrano et al., 2015)
Ratas				
F344/Crj LEW/Crj (Lewis)	Cáncer de Vejiga. Espontaneo inducido con BBN	D: 5% AS Vía: Oral en agua de uso. Tx: <i>Ad libitum</i> Por 32 semanas	El tx con AS incrementa significativamente la inducción de lesiones neoplásicas en ambas sepas de rata.	(Mori et al., 1987)
WS/Shi ODS/Shi- Od/od LEW/Crj	Cáncer de Vejiga. Espontaneo inducido con BBN	D: 5% AS Vía: Oral en agua de uso. Tx: <i>Ad libitum</i> Por 32 semanas	La administración de SA incrementa significativamente carcinomas, principalmente en la sepa LEW.	(Murai et al., 1997)
Wistar	Glioblastoma Xenotransplante Células U87MG	D: 1g/kg (5mM AA) 2g/kg (10mM AA) Vía: IV Tx: Dos inyecciones al día 3 y 7	Ambas dosis disminuyeron el área del tumor.	(Ryszawy et al., 2019)
Animales que no sintetizan Vitamina C				
Cobayos				
Cepa 2	Fibrosarcoma y Liposarcoma Espontaneos inducidos con 20-MC	D: 0,3mg/kg, 10mg/kg y 1g/kg de AA. Vía: Oral. Tx: Cada día disuelta en agua. Por 24 semanas	La dieta baja en AA favoreció la reducción de los tumores. Mientras que megadosis de AA permitió el crecimiento tumoral.	(Migliozi, 1977)

	Fibrosarcoma y Liposarcoma Espontaneos inducidos con 20-MC	D: 100mg/kg AA Vía: SC Tx: inyección diaria por 4 meses. Con seguimiento por 584 días.	El tratamiento de AA potencia el efecto carcinogénico del 20-MC.	(Banic, 1981)
Sewall-Wright	Hepatocarcinoma Subcutaneo Células L-10	D:100 mg/kg Vía: Sc, Oral Tx: SC 1 al día; Oral, diluida en 150ml de agua.	Concentraciones intratumorales mayores a 1mM de AA, reducía el tamaño tumoral.	(Casciari et al., 2005)
Pirbright	Glioblastoma Células U87MG y HSVT-C3	Tx: Inducir Escorbuto previo al implante	El escorbuto reduce el tamaño de tumores subventriculares, así como la proliferación celular	(Jara et al., 2020)
Ratones Gulo^{-/-}				
	Carcinoma Pulmonar Células Lewis LC	D: 33mg/L y 330mg/L Vía: Oral Tx: <i>Ad libitum</i> por 2 semanas.	La restricción de AA reduce el tamaño del tumor, la deposición de colágeno.	(Telang et al., 2007)
	Cáncer de Ovario Células MOSEC	D:0,25g/L, 0,5g/L y 1g/L Vía: Oral Tx: <i>Ad libitum</i> Por 14 días	La restricción de AA favorece el aumento del tamaño tumoral asociado a una disminución en células inmunes.	(Kim et al., 2012)
Ratones Gulo^{-/-} (SFx)				
	Cáncer de mama Células 4T1	D: 330mg/L Vía: Oral Tx: <i>Ad libitum</i> por 3 semanas.	No hubo diferencia en la deposición de colágeno, el tamaño del tumor y en la angiogénesis.	(Parsons et al., 2006)
	Melanoma Células B16F0	D: 250mg/L Vía: Oral	La suplementación	(Cha et al., 2011)

		Tx: <i>Ad libitum</i> por 4 semanas.	con AA reduce el tamaño tumoral asociado al encapsulamiento del mismo.	
--	--	--------------------------------------	--	--

D, Dosis; Tx, Tratamiento; IV, Intravenosa; IP, Intraperitoneal, BBN, N-Butil-N-(4-hidroxi-butil) nitrosamina, AS, Ascorbato de Sodio; 20-MC, 20-Metilcolantreno;

Respecto al efecto de la vitamina C en el desarrollo tumoral, la mayoría de los reportes se enfocan en el uso farmacológico de la Vitamina C. Recientemente, en el laboratorio hemos empleado al cobayo como modelo para el estudio del desarrollo y progresión del glioblastoma. Empleamos células humanas U87MG y HSVT-C3, las cuales son implantadas de manera ortotópica en la región subventricular y los tumores generados recapitulan las características histopatológicas del Glioblastoma (Jara et al., 2020). Es por ello que consideramos es un buen modelo para conocer el efecto de la vitamina C en el contexto de la biología del tumor.

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al comparar la expresión de los GLUTs en tejidos sanos con su contraparte tumoral, se observa un incremento en su expresión, así como la presencia de otras isoformas (Godoy et al., 2006, Barron et al., 2016). La sobreexpresión de GLUTs conllevaría a un aumento en la captación de DHA, ya que se tiene mayor afinidad al DHA que a la glucosa (Rumsey et al., 1997). Incluso, se observó que células tumorales (melanoma) captan 15 veces más rápido DHA, en comparación con células normales (melanocitos); mientras que la captación de AA fue dos veces más rápida en melanocitos que en melanoma, ya que estas células expresan un transporte funcional para AA (Spielholz et al., 1997). Otro ejemplo son las células de AML, donde se observó exclusivamente la captación de DHA y no de AA (Heaney et al., 2008). Cada vez existe más evidencia de que independiente de la expresión de SVCT2, las células tumorales captan preferentemente DHA (Nualart et al., 2003, Chen et al., 2008, Ulloa et al., 2013, Yun et al., 2015, Ngo et al., 2019, Ferrada et al., 2019).

En el cerebro conocemos la expresión de GLUT1 en astrocitos y células endoteliales, así como GLUT3 en neuronas. Sin embargo, los glioblastomas expresan ambos (Nagamatsu et al., 1993, Boado et al., 1994, Flavahan et al., 2013). En el laboratorio hemos observado la expresión de GLUT1 y GLUT3 en células U87MG de Glioblastoma. Estas células fueron capaces de captar DHA y, en co-cultivo con neuronas actuaron como células Bystander, protegiendo a la

neurona del daño oxidativo inducido por H_2O_2 y DHA (Garcia-Krauss et al., 2016). Además, mostraron ser resistentes a la muerte inducida a concentraciones farmacológicas de DHA 20mM (Chen et al., 2008). Por lo tanto, sugerimos que el DHA beneficiaría a las células de glioblastoma bajo estrés oxidativo.

Todas la células tienen la capacidad de reducir el DHA intracelularmente, comprometiendo o no su viabilidad (Ferrada et al., 2019). Al reducir el AA, puede participar como cofactor de múltiples enzimas, entre ellas las Fe^{2+}/α KGDDs. Las hidroxilasas de prolina y lisina requieren de la vitamina C para la hidroxilación de estos aminoácidos, indispensables en la apropiada biosíntesis del colágeno (Murad et al., 1981). Se sabe que al alterar la estructura del colágeno, se inhibe la angiogénesis y por lo tanto el crecimiento tumoral de los glioblastomas (Mammoto et al., 2013). El colágeno I y IV favorecen la migración de las células de Glioblastoma (Chintala et al., 1996a, Mahesparan et al., 1999). Incluso se ha observado que células U87MG de glioblastoma expresan y secretan colágeno VI (Han and Daniel, 1995). También, hemos observado que tumores inducidos en la SVZ en cerebros de cobayos escorbúticos se disminuye la co-optación de vasos sanguíneos y disminuye el volumen tumoral proponiendo que la vitamina C es esencial en los procesos invasivos (Jara et al., 2020). En conjunto, pensamos que la vitamina C favorece la síntesis de colágeno en el glioblastoma, impactando de esta manera en el desarrollo del tumor.

IX. HIPÓTESIS

Las células de glioblastoma incorporan la forma oxidada de la vitamina C (DHA), esta molécula es reducida intracelularmente favoreciendo la defensa antioxidativa, la biosíntesis de colágeno y además, potenciando un fenotipo invasivo.

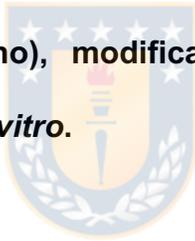


X. OBJETIVO GENERAL

Determinar la forma de vitamina C captada por los glioblastomas y su efecto antioxidante sobre el desarrollo tumoral y la migración celular.

XI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Determinar si la forma de vitamina C (AA o DHA) preferentemente captada por las células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 (derivadas de glioblastoma humano), modifican la defensa antioxidativa y la migración celular *in vitro*.**
- **Definir si bajas concentraciones de vitamina C *in vivo*, tienen efecto sobre la angiogénesis e invasividad de los glioblastomas inducidos en el parénquima cerebral de cobayos.**



XII. MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Cultivo celular. Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Se emplearon las células U87MG (ATCC® HTB-14™), HSVT-C3 (Human Subventricular Tumor - Clone 3, derivadas de un tumor sub ventricular (Pastor et al., 2013) y RAV27 (Regensburg Arabel Vollmann-Zwerens 27, Brain Tumor Initiating Cells Patient 27, donadas por colaboradores en el hospital universitario de la Universidad de Regensburg, Alemania durante pasantía). Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II. Las células fueron sembradas en placas de cultivo Petri de 10cm de diámetro y cultivadas en 10ml de medio completo. Para las células HSVT-C3 se empleó DMEM/F12 suplementado con Suero Fetal Bovino (SBF) 10% (v/v), Glutamina 2mM, Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100µg/ml y Anfotericina B 2,5µg/ml; para las células RAV27, DMEM/F12 suplementado con B27 2% (v/v), EGF 20ng/ml, bFGF 20ng/ml, Glutamina 2mM, Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100µg/ml y Anfotericina B 2,5µg/ml; y para las células U87MG, DMEM/H.G. suplementado con SBF 10% (v/v), Glutamina 2mM, Penicilina 100U/ml, Estreptomicina 100µg/ml y Anfotericina B 2,5µg/ml; con cambios de medio cada 3 días y subcultivo cada siete días.

Inducción de tumores en cobayos por estereotaxia. Se emplearon cobayos Pirbright machos adultos, de aproximadamente 300g de peso. Los cuales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura 20-25°C, fotoperíodo 12/12 horas luz/oscuridad, recibiendo acceso libre al agua y alimento diariamente. Los cobayos con un tratamiento control se mantuvieron bajo alimentación con pellet de cobayo con vitamina C, mientras que los cobayos con un tratamiento escorbútico, se alimentaron con pellet de conejo y sin vegetales durante 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. 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). Los animales fueron instalados en un marco estereotáxico. Una vez descubierto y limpio el cráneo, se localizó el Bregma (punto de referencia para las coordenadas estereotáxicas) y se posicionó la coordenada para inyectar en el estriatum del cerebro (0mm antero-posterior, 5mm lateral y 5mm dorso-ventral a partir del Bregma). A continuación, se inyectaron 1×10^6 células tumorales U87MG o HSVT-C3, contenidas en un volumen de 10 μ l, a un flujo de 1 μ l/min, utilizando una jeringa Hamilton de 50 μ l. Para el caso de los animales escorbúticos, la inducción del tumor se realizó 7 días posteriores a la depleción de vegetales con tal de generar el escorbuto. Todos los animales se mantuvieron por 2 semanas antes del sacrificio y en observación de acuerdo a los lineamientos de cuidado de animales

de experimentación para evaluar posible sufrimiento animal.

BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

RT-PCR convencional y qRT-PCR. Se realizó la extracción de RNA con el método de TriZol®, se cuantificó la cantidad de RNA y se evaluó su relación 260/280nm midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro Perkin-Elmer. Para la síntesis de cDNA, el RNA total de cada muestra se mezcla con 0,5µg de OligodT, denaturado a 70°C por 5 minutos y llevado a hielo por 2 minutos. Luego, se agregó el buffer de Transcripción (Tris-HCl 50mM, pH 8,3, KCl 50mM, MgCl₂ 4mM, DTT 10mM), la mezcla de dNTPs (0,2mM de cada uno) y 20U del inhibidor de RNAsa, esta mezcla se incubó a 37°C por 5 minutos. Posteriormente, se agregan 200U de la enzima Transcriptasa Reversa MuLV y se incubó por 1 hora a 42°C. Al finalizar la reacción la muestra se calienta a 70°C por 10 minutos. Los controles negativos para la amplificación de las muestras son tratados sin la enzima Transcriptasa Reversa.

La mezcla de reacción para PCR se realizará con Tris-HCl 10mM (pH 8,8), KCl 50mM, Nonidet P40 0,8%, MgCl₂ 1,5mM, mezcla de dNTPs (0,2mM de cada uno), partidores específicos (0,2µM de cada uno), Taq DNA Polimerasa 0,3U (Fermentas) y 1 o 2µl del producto de transcripción reversa, en un volumen final de 12,5µl. La mezcla se incubó a 95°C por 5 minutos, y luego se realizaron 35 ciclos de 95°C por 30 segundos 60°C y 72°C por 30 a 50 segundos, finalmente se realizaron una extensión a 72°C por 7 minutos. Todos los cDNAs utilizados

fueron probados con partidores específicos para β -Actina y GAPDH. Para el qRT-PCR, se realizó con el kit “Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix” (Stratagene, Cedar Creek, Texas) que utiliza SYBR green para la detección de amplicones. 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 genes de interés se compararon con la expresión de GAPDH.

Tabla 2. Oligonucleótidos

Gen	Secuencia <i>Forward</i> (5'-3')	Secuencia <i>Reverse</i> (5'-3')	Producto (pb)
GAPDH	CTTCTTTTGCGTCGCCAGCC	CTTCCCGTTCTCAGCCTTGACG	239
GLUT1	GTGGAGACTAAGCCCTGTCG	GATGGGAAGGGGCAAATCCT	200
GLUT3	GTTCTCACTGTTCCCTCTGCT	CACCTTTTCAAGCTAAAGCACAC	378
SVCT2	GGGGCTACAGCACTACCTG	GGATGGCCAGGATGATAG	647 (wt) 302 (sh)

Captación de Vitamina C. Después de 2 días en cultivo, las células de glioblastoma (U87MG, HSVT-C3 y RAV27), llegando a confluencia, fueron lavadas con solución tamponadora de incubación (HEPES 15mM, NaCl 135mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1.8mM y MgCl₂ 0.8 mM) e incubadas con el mismo medio por 5min a 37°C. Los análisis de captación fueron realizados de acuerdo al protocolo de (Garcia-Krauss et al., 2016). En 500µl del tampón de incubación con 0.1 µCi

$^{14}\text{C-AA/DHA}$ (actividad específica 4 mCi/mmol), a una concentración final de 100 μM . El DHA se obtuvo a partir de la oxidación de AA adicionando 0,02U de Ascorbato oxidasa/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA). La captación se detiene lavando las células con solución de detención (HEPES 15mM, NaCl 135mM, KCl 5mM, CaCl_2 1.8mM y MgCl_2 0.8 mM, HgCl_2 0.2mM) fría. Las células fueron lisadas con 400 μl de tampón de lisis (Tris-HCl 10mM, pH 8.0, y dodecil sulfato de sodio 0.2%). El homogeneizado es introducido en un tubo plástico y se incubó con 4ml de Ecosint. La radiactividad incorporada fue analizada por espectrometría de centelleo líquida. Como control en los experimentos de captación de AA se utilizó una solución tamponada sin Sodio (HEPES 15mM, Colina 135mM, KCl 5mM, CaCl_2 1.8mM y MgCl_2 0.8 mM). Mientras que para los experimentos de captación de DHA se emplearon inhibidores, los cuales fueron incubados por 5min previos a la incubación con DHA: Citocalacina B 20 μM , Citocalacina E 20 μM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Determinación de la concentración intracelular AA por FRASC. La concentración intracelular de AA fue determinada de manera colorimétrica por el método de FRASC (EnzyChrome™, Bioassay Systems) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y fueron suplementadas con 500 μM de AA o DHA por 30min. Las células fueron lavadas con PBS, y fueron incubadas con 100 μl de PBS frío, para posteriormente raspar la placa. Las células fueron lisadas

mediante centrifugación a 13.000rpm a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, el pellet fue descartado y el sobrenadante se utilizó para el análisis. Se preparó la solución de trabajo que contiene 85µl de Buffer, 1µl de Mix de Enzimas y 1µl de colorante. Se incubaron con 100µl de la muestra y se mantuvieron por 10min. La concentración de AA fue determinada a 570nm y los cálculos se realizaron utilizando un estándar.

INMUNODETECCIÓN

Inmunocitoquímica. Se utilizaron células adheridas en cubreobjetos y fijadas en Paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v). Las células fueron lavadas tres veces en tampón Tris-PO₄ 10mM (Tris 10mM, NaCl 120mM, Na₂HPO₄ 8,4mM, KH₂PO₄ 3,5mM, pH 7,8). Se incluye uno de los lavados con solución permeabilizante Triton X-100 0,2% (v/v) en Tris-PO₄ 10mM. Posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios en tampón Tris-PO₄ 10mM y Abúmina Sérica de Bovino 1% (p/v, Tris-BSA) por 16 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente (Ver tabla 1 de anticuerpos primarios). Posteriormente, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-PO₄ 10mM e incubadas durante dos horas con los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos (diluídos en una proporción 1:200 en Tris-BSA, ver tabla 2 de anticuerpos secundarios), con tinción nuclear con Hoechst o TOPRO-3 (1:1000) y en algunos experimentos con faloidina conjugada a Alexa Flour (AF) 488, en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-PO₄ 10mM. Finalmente, las

muestras fueron montadas con medio de montaje para fluorescencia en portaobjetos. Las preparaciones se analizaron en microscopio de epifluorescencia para después ser llevadas al Centro de Microscopía Avanzada del Bío-bío para su observación en un microscopio confocal modelo LSM780 o de súper resolución modelo ELYRA.

Tabla 3. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Tipo/Origen	Empresa / REF	Lote (s)	IF	IHC	WB
CD133	Policlonal Conejo	SIGMA C9493	068K0504	1/100	N.D.	N.D.
COL I	Monoclonal Conejo	ABCAM Ab138492		1/100	N.D.	N.D.
COL1A1 (C-18)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-8784	H2715	1/50	1/50	N.D.
COL I	Policlonal Conejo	DONADO	-	1/50	1/50	N.D.
COLLAGEN IV	Policlonal Conejo	ABCAM Ab6586	GR322984-4	1/100	1/100	N.D.
COL6A1 (B-4)	Monoclonal Ratón	Santa Cruz Biotechnology SC-377143	D2215	1/50	1/50	N.D.
COL6A1/2/3 (172C)	Monoclonal Ratón	Santa Cruz Biotechnology SC-47764	S/I	1/50	1/50	N.D.
CYTOKERATIN COCKTAIL (AE1 & AE3)	Monoclonal Ratón	Millipore DONADO	S/I	1/200	N.D.	N.D.
GFAP	Policlonal Conejo	DAKO Z0334	94739	1/200	1/200	1/2000
GFP	Policlonal Pollo	Aves GFP-1020	GFP879484	1/1000	1/1000	1/5000

Anticuerpo	Tipo/Origen	Empresa / REF	Lote (s)	IF	IHC	WB
GLUT1	Policlonal Conejo	EMD Millipore 07-1401	3232356	1/500	1/500	1/5000
GLUT3 (M-20)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-7582	D292	1/100	1/100	1/1000
IBA-1	Policlonal Cabra	ABCAM Ab5076	GR44857-1 GR3180601-1	1/100	1/100	N.D.
LMNB1 (C-20)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-6216	Alicuota donada	1/50	N.D.	N.D.
NESTIN (rat-401)	Monoclonal Ratón	Millipore MAB353	2932512 3160129	1/50	1/50	N.D.
PCNA (PC10)	Monoclonal Ratón	DAKO M0879	59333	1/200	1/200	N.D.
PDI (E-20)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-17222	C0904	1/50	1/50	1/500
SOX2	Conejo	DONADO	-	1/200	N.D.	N.D.
SVCT2 (A16)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-31992	I1106	1/25	1/25	1/500
SVCT2 (G19)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-9927	L3013 D1910	1/25	1/25	1/500
SVCT2 (H70)	Policlonal Conejo	Santa Cruz Biotechnology SC-30114	K0305	1/25	1/25	N.D.
SVCT2 (T19)	Policlonal Cabra	Santa Cruz Biotechnology SC-31991	G1808	1/25	1/25	N.D.
SVCT2 NOVUS	Policlonal Conejo	Novus NBP2-3319	A104456	N.D.	N.D.	1/2000
TUBULINA β-III	Monoclonal Ratón	PROMEGA G712A	262943 346917	1/1000	1/1000	1/5000
VDAC, PAN-	Policlonal Conejo	Alomone Labs AVC-001	AV0001AN015 0	N.D.	N.D.	1/4000
VIMENTIN	Policlonal Pollo	Millipore AB5733	28191 3132968	1/400	1/400	N.D.

Anticuerpo	Tipo/Origen	Empresa / REF	Lote (s)	IF	IHC	WB
VIMENTIN (V9)	Monoclonal Ratón	DAKO M0725	20002900	N.D.	1/20	N.D.

N.D. No determinado; S/I, Sin información.

Tabla 4. Anticuerpos secundarios conjugados

Anticuerpo	Conjugación	Origen	Empresa	REF	Lote (s)	Dilución
Anti-Cabra	AF488	Burro	Jackson Immunoresearch	705-545-147	143223	1/200
	Cy3	Burro	Jackson Immunoresearch	705-165-147	Alicuota	1/200
	Cy5	Burro	Jackson Immunoresearch	705-175-147	Alicuota	1/200
	HRP	Conejo	Jackson Immunoresearch	305-035-045	117560 135312	1/2000
Anti-Conejo	AF488	Burro	Jackson Immunoresearch	711-545-152	141606	1/200
	AF647	Burro	Jackson Immunoresearch	711-605-152	118217	1/200
	Cy3	Cabra	Jackson Immunoresearch	111-165-003	135294	1/200
Anti-Pollo	Cy5	Burro	Jackson Immunoresearch	711-175-152	Alicuota	1/200
	HRP	Cabra	Jackson Immunoresearch	111-035-144	132676	1/2000
	Cy2	Burro	Jackson Immunoresearch	703-225-155	Alicuota	1/200
	Cy3	Burro	Jackson Immunoresearch	703-165-155	Alicuota	1/200
	Cy5	Burro	Jackson Immunoresearch	703-175-155	Alicuota	1/200
	HRP	Burro	Jackson Immunoresearch	703-035-155	144297	1/2000
Anti-Ratón	DL405	Burro	Jackson Immunoresearch	715-475-150	144285	1/200

Anticuerpo	Conjugación	Origen	Empresa	REF	Lote (s)	Dilución
	AF488	Burro	Jackson Immunoresearch	715-545-151	130814	1/200
	Cy3	Burro	Jackson Immunoresearch	715-165-150	133644	1/200
	Cy5	Burro	Jackson Immunoresearch	715-175-151	132423	1/200
	HRP	Cabra	Jackson Immunoresearch	115-035-166	123309	1/2000

Inmunocitoquímica acoplada a tinción con Rojo Picosirius para la detección de colágeno. Se utilizaron células adheridas en cubreobjetos y fijadas en Paraformaldehído (PFA) al 4% (p/v). Las células fueron lavadas tres veces en tampón Tris-PO₄ 10mM (Tris 10mM, NaCl 120mM, Na₂HPO₄ 8,4mM, KH₂PO₄ 3,5mM, pH 7,8). Posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios en tampón Tris-PO₄ 10mM y Albúmina Sérica de Bovino 1% (p/v, Tris-BSA) por 16 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente (ver tabla de anticuerpos primarios). Posteriormente, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-PO₄ 10mM e incubadas durante dos horas con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa-Fluor 488 (diluídos en una proporción 1:200 en Tris-BSA, ver tabla de anticuerpos secundarios) y con tinción nuclear con Hoechst (1:1000), en una cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las muestras fueron lavadas en tampón Tris-PO₄ 10mM. Finalmente, son teñidos en solución de Rojo Picosirius 0,1% (p/v, Rojo Sirius F3B4, en solución acuosa saturada de ácido pícrico) por una hora. Posteriormente, los cortes fueron

lavados rápidamente en agua acidificada (Ácido acético glacial 0,5% v/v) y montadas con medio de montaje para fluorescencia en portaobjetos. Las preparaciones se analizaron en microscopio de epifluorescencia para después ser llevadas al Centro de Microscopía Avanzada, CMA Bío-bío para su observación en un microscopio confocal modelo LSM780.

Técnica histológica e inmunohistoquímica. Los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito por (Jara et al., 2016). Los cerebros de cobayo fueron fijados por inmersión en Bouin Posteriormente, fueron lavados en etanol 70% v/v, deshidratados en una batería de etanol a concentraciones crecientes y luego se pasarán 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 realizaron cortes seriados de 7µm de grosor utilizando un micrótopo (Leica Reichert-Jung 2040 Autocut Microtome) y luego, fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina al 0,02% (p/v). Los cortes de 7 µm, 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 5min cada una. Posteriormente, los cortes son incubados en H₂O₂ al 3% (v/v) en metanol por 15 min, para inhibir la actividad de las Peroxidasas endógenas. Los cortes fueron lavados 3 veces por 10min en tampón Tris-PO₄ 10mM (Tris 10mM, NaCl 120mM,

Na_2HPO_4 8,4mM, KH_2PO_4 3,5mM, pH 7,8) y luego incubados con los anticuerpos primarios preparados en tampón Tris- PO_4 10mM y albúmina sérica de bovino al 1% (p/v, Tris-BSA). La incubación se realizó en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 16h. Posteriormente, los cortes fueron lavados 3 veces por 10min en tampón Tris- PO_4 10mM e incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con Peroxidasa de rábano (HRP), preparados en Tris-BSA por 2h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, los cortes fueron lavados 3 veces por 10min en tampón Tris- PO_4 10mM y luego la actividad enzimática de la Peroxidasa fue revelada utilizando una solución de Diaminobenzidina 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y H_2O_2 al 0,03 % (v/v) en tampón Tris- PO_4 10mM por 15 min en oscuridad. La reacción es detenida con lavados en agua destilada. A continuación, los cortes se sometieron a una tinción de contraste nuclear con Hematoxilina de Harris y finalmente, 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®. Para realizar inmunofluorescencia, los cortes fueron lavados en tampón Tris-fosfato 10mM (pH 7,8) 3 veces por 10min e incubados con los anticuerpos primarios preparados en Tris-BSA-Tritón X-100 0,2% (v/v), por 16 h en una cámara húmeda y a temperatura ambiente. De manera simultánea, en algunos experimentos, se empleó Isolectina B4 conjugada a FITC. Transcurrida la incubación, los cortes fueron lavados nuevamente 3 veces por 10min en tampón Tris-fosfato 10mM (pH

7,8) e incubados con los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos junto con la tinción nuclear por 2h en una cámara húmeda, en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados 3 veces por 10min en tampón Tris-PO₄ 10mM y montados en medio de montaje para fluorescencia (Dako, Carpinteria, CA, EE.UU).

Tinción histológica con Rojo Picosirius para la detección de colágeno. Se utilizaron cortes histológicos de muestras de biopsias humanas y cerebro de cobayos, los que previamente montados sobre cubreobjetos impregnados en Poli-L-Lisina 0,02% (p/v). 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 Harris durante 3 min. Luego los cortes fueron lavados en agua corriente por 10 min, en agua destilada por 5 min y teñidos en solución de Rojo Picosirius 0,1% (p/v, Rojo Sirius F3B4, en solución acuosa saturada de ácido pícrico) por una hora. Posteriormente, los cortes fueron lavados rápidamente en agua acidificada (Ácido acético glacial 0,5% v/v). 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®. Las muestras fueron analizadas por microscopía óptica, de fluorescencia y de luz polarizada con el microscopio Leica LMD 7000.

CLARITY. Esta técnica se realizó de acuerdo al protocolo general de CLARITY elaborado por (Tomer et al., 2014), con modificaciones al protocolo desarrollado por (Poguzhelskaya et al., 2014). 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). Posteriormente fueron perfundidos transcardialmente con 20ml de hidrogel frío (Acrilamida 4% v/v, Bis-Acrilamida 0.005% v/v, iniciador VA-044 0.025% p/v, PBS 10% v/v, PFA 4% p/v) a una velocidad de 10ml por min. Rápidamente se extrae el cerebro y se incuba en un tubo cónico de 50ml con 20ml de hidrogel. Se cubre con papel aluminio (para evitar fotoblanqueo, si se contiene fluorescencia como GFP) y se refrigera a 4°C, de uno a dos días para asegurar la penetración del hidrogel a la muestra. Posteriormente, el tejido se deseca en una cámara de extracción, llena con nitrógeno con bomba de vacío. Se mantiene el vacío 10min y se permite el ingreso del nitrógeno al tubo con la muestra, se abre el desecador y se cierra herméticamente el tubo con la muestra minimizando la exposición al oxígeno (ya que impide la polimerización del hidrogel). Se incuba a 37°C con rotación por 3 horas o hasta que se haya polimerizado. En campana de extracción se retira el cerebro embebido del gel. Con un vibrátomo se realizan cortes coronales (de 1 a 1.5mm de grosor) y se colocan en tubos cónicos de 50ml numerados con 10ml de solución de aclaramiento (Ácido bórico 0.2M, Dodecil Sulfato de Sodio 40% p/v, pH. 8,5) y se incuban de 7 a 10 días a 37°C y agitación a 21rpm. Se cambia la solución cada tres días y se va evaluando el aclaramiento. Posteriormente, las

rebanadas aclaradas, son lavadas en PBST (PBS 1X con Triton-X 100 al 0.1% v/v) por dos días. Una vez aclaradas las rebanadas, se procede a la inmunotinción. Se incuba el anticuerpo primario a una dilución de 1:500 por dos días, posteriormente se realizan varios lavados con PBST durante un día. El anticuerpo secundario se incuba a una dilución 1:200 por dos días y se lava una vez con PBST durante un día. Posteriormente, las muestras son mantenidas en Glicerol al 80% (v/v) por al menos 3 horas antes de llevarlas al microscopio. Después del montaje, se utilizó el sistema de imagen confocal y de dos fotones (Zeiss). Las imágenes fueron analizadas con el software Zen (Zeiss AIM Software).



Western Blot. Para la obtención de extractos totales de proteínas, las células fueron incubadas en inhibidor de proteasa, posteriormente son sonicadas a 4°C y centrifugadas por 10 minutos a 8.000xg a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -80°C para su posterior utilización. La concentración de proteínas se cuantifica por el método de Bradford (Bio-Rad), midiendo la absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro Eppendor Biophotometer D30. Se utilizaron de 12,5µg a 100µg de extractos totales en un gel de acrilamida. Se realizó la transferencia a la membrana con buffer Tris-Glicina con Metanol 20% (v/v). Se dejó corriendo 14 horas a 40mA. Se tiñen las membranas con Rojo Ponceau para evaluar la transferencia a la membrana. Posteriormente, Se lavan las membranas con agua para remover el colorante y se realizaron 5 lavados de 5 min con TBS 1x Tween-

20 por 5min c/u, posteriormente 5 lavados con con TBS 1x Tween-leche 5% (p/v) por 5min c/u. Se dejó incubando por dos horas con la misma solución y se incubó el anticuerpo primario por toda la noche. Se realizaron 5 lavados de 5min con TBS 1x Tween por 5min c/u, posteriormente 5 lavados con con TBS1x Tween Leche 5% (p/v) por 5min c/u. Se incubó el anticuerpo secundario asociado a Peroxidasa de Rábano (HRP) por dos horas, o bien con anticuerpos primarios conjugados (ver tabla 3 de anticuerpos secundarios conjugados). Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 5 lavados de 5min con TBS 1x Tween por 5min c/u. Se reveló con sustrato quimioluminiscente (Wester Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer) y las membranas se observaron en un fotodocumentador (ImageQuant LAS 500, GE).



Tabla 5. Anticuerpos primarios conjugados

Anticuerpo	Conjugación	Origen	Empresa	REF	Lote	Dilución WB
β-Actina (C4)	HRP	Monoclonal Ratón	Santa Cruz Biotechnology	SC-47778	J2915	1/50.000

ENSAYOS FUNCIONALES

Ensayo de Viabilidad con XTT. Las células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 fueron colocadas en placas multipozo de 24 pocillos (50000cell/pocillo, en placas multipozo de 24). 48 horas después de sembrarlas, fueron lavadas con PBS tibio y se establecieron las condiciones a evaluar por dos horas. Posteriormente las

células son lavadas con PBS y e incubadas con el reactivo XTT (Biological Industries) disuelto en medio de cultivo libre de rojo fenol, durante 2 horas. Finalmente, la viabilidad fue determinada de manera colorimétrica a 490nm.

Ensayo *in vitro* de migración de esferoides. Estos ensayos se realizarán de acuerdo a (Seliger et al., 2016). Se sembraron 5000 células sobre pocillos revestidos con agarosa (1% de agarosa en PBS 1x, p/v). Las células se cultivaron durante 24 h para permitir la formación de esferoides. Los esferoides maduros fueron transferidos a placas de 96 pocillos de fondo redondo y tratados para cultivo celular. La migración celular se monitoreó a 0, 12, 24 y 48 horas, teniendo en cuenta el punto de tiempo más temprano, cuando la migración pueda ser medida y evitar el error de los resultados por efectos de proliferación. El área cubierta por las células que migran más lejos del esferoide fue fotografiada en los puntos indicados de tiempo, y su diámetro más grande fue medido manualmente (software de ImageJ, NIH, EEUU). Los ensayos se realizaron por 6 réplicas y se repitieron tres veces.

Ensayo *in situ* de Migración de esferoides sobre Cultivos Organotípicos de Cortes Cerebrales (OBSC). Este ensayo se realizaron con adaptaciones al protocolo de(Seliger et al., 2016). Ratas postnatal de 6 días, fueron y se usaron para obtener cultivos organotípicos de cortes cerebrales (OBSC). Para almacenamiento y corte, los cerebros se mantuvieron en un medio de

preparación que contiene suero de caballo al 5% (v/v), 1,6% de polvo MEM, 50U de penicilina, estreptomina al 0,05% (v/v), D-glucosa 25 mM, L-glutamina 2mM y Tris base 1mM. Después de la extracción, los cerebros se embeben en agarosa de bajo punto de fusión al 5% (p/v) y se cortarán en rodajas axiales de 350µm de espesor en un Vibratomo (VT 1000S, Leica); Solamente las rebanadas con estructuras del hipocampo completamente conservadas fueron reubicadas en membranas de inserto (0,4 mm, OMNILAB). Los insertos se transfirieron a placas de 6 pocillos (OMNILAB) que contenían 1,2 ml de medio de cultivo que consiste en 25% (v/v) de HBSS (Gibco), 25% (v/v) de suero de caballo, 0,8% (p/v) de bicarbonato de sodio, 50U de penicilina, 0,05% (v/v) de estreptomina, 0,05% (v/v) de ITS (Roche), 25 mM de D-glucosa 4 mM, L - glutamina y Tris base 0,5 mM. Las rodajas de cerebro se cultivaron en incubadora a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas antes de la implantación de los esferoides para permitir que se ajustaran a las condiciones de incubación.

Cuarenta y ocho horas antes de la implantación, las células de glioblastoma (U87MG-GFP, RAV27-GFP) fueron sembradas en placas de 96 pocillos revestidas con agarosa 1% (p/v) (5000 células/pocillo) para permitir la formación de esferoides. Se colocaron un esferoide por hemisferio sobre el OBSC, frente a la formación del hipocampo. Con el fin de monitorear la migración, los esferoides implantados se visualizaron bajo un microscopio fluorescente (Zeiss Axio Observer.Z1, Visitron Systems GmbH) una vez por semana. Las imágenes se montarán utilizando el software Pixelmator, versión 3.3.2. El área cubierta por las

células que migran más lejos del esferoide fue fotografiada en los puntos indicados del tiempo, y su diámetro más grande fue medido manualmente (software de ImageJ, NIH, EEUU).

ENSAYOS DE LOCALIZACIÓN INTRACELULAR

Experimentos con sistema BacMam. Las células de glioblastoma U87MG, HSVT-C3 y RAV27 fueron sembradas sobre cristales a una razón de 25000 cell/pocillo en una placa multipozo de 24. Pasadas 24 horas, se renueva el medio y se incubaron los baculovirus CellLight™ Golgi-GFP BacMam 2.0 (Molecular Probes) y CellLight™ ER-RFP BacMam 2.0 (Molecular Probes) en proporción de 25 a 50 partículas virales por célula. Se incubaron por 24 horas en incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Posteriormente, son fijadas en PFA 4% (p/v) por 30min y se procedió a realizar inmunocitoquímica (ver procedimiento) para cada uno de los transportadores de vitamina C, empleando como anticuerpo secundario conjugado con Cy5. Las preparaciones fueron analizadas por microscopía confocal (Carl Zeiss LSM780) y microscopía de súper resolución (Carl Zeiss Elyra). La cualificación de las imágenes fue realizada mediante el software IMRAIS 9.1 (Bitplane, Oxford Instruments).

Extracción de Retículo endoplasmático. Este procedimiento fue realizado con adaptaciones al protocolo de (Cha et al., 2018) y de acuerdo a las especificaciones del Kit de enriquecimiento de retículo en endoplasmático (Novus Biologicals). Las células de glioblastoma U87MG, HSVCT-C3 y RAV27 fueron sembradas en placas Petri de 10cm hasta llegar a confluencia. Posteriormente, fueron disgregadas con Tripsina y el pellet (aproximadamente 500mg), es colocado en una solución de Homogenización isosmótica (HEPES, sacarosa, KCl) y un cocktail de inhibidores de proteasas. Las muestras fueron sonicadas ligeramente por 4 segundos y posteriormente las muestras se centrifugan a 1.000g por 10min a 4°C. Se retira el sobrenadante y es colocado en un tubo limpio. El pellet contiene núcleos y debris celular. El sobrenadante, fue centrifugado a 12.000g por 15min a 4°C. El nuevo sobrenadante es colocado en un vaso de precipitados con un agitador magnético. El Pellet contiene mitocondria y debris celular. EL sobrenadante fue agitado mientras se colocan 15 veces el volumen de Cloruro de Calcio gota a gota durante 15min, con el fin de precipitar el retículo endoplasmático rugoso. Posteriormente, se centrifugó a 8.000g por 10min a 4°C. Finalmente el pellet es resuspendido en solución de suspensión (HEPES, sacarosa, KCl, EGTA) y se cuantifica la proteína mediante el método de Bradford para analizar posteriormente por Western Blot.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos en esta tesis fueron analizados estadísticamente con el uso del software PRISM 6.01 (GraphPad). Para todos los casos, al menos se realizaron tres experimentos independientes en triplicado, los cuales fueron representados por su media \pm desviación estándar y analizados mediante la prueba de t-student de dos muestras no pareadas. Los valores $p < 0,05$ fueron considerados como estadísticamente significativos.



XIII. RESULTADOS

Expresión de los transportadores de Vitamina C en muestras de glioblastoma humano

Los glioblastomas son tumores que sobreexpresan transportadores de glucosa, en particular GLUT1 y GLUT3 los cuales transportan DHA, sin embargo se desconoce la expresión de SVCT2 y su localización celular. Es por ello que se evaluó la expresión de los transportadores de Vitamina C: SVCT2, GLUT1 y GLUT3 en muestras de tumores humanos. Se analizaron seis muestras de biopsias diagnosticadas como glioblastomas multiformes que fueron donadas por Instituto de Neurocirugía, Hospital el Salvador, Santiago, Chile. Mediante la tinción con Hematoxilina y Eosina se corroboraron las características histopatológicas de los glioblastomas; como la necrosis intratumoral rodeada por células en pseudopalisada (Fig. 7 A, P), hiperplasia e hipertrofia vascular y vasculatura glomeruloide (Fig. 7 B, E, H, K, N, Q). Adicionalmente, algunas muestras presentaron células con citoplasma extenso y eosinófilo, de núcleos excéntricos denominamos Gemistocitos (Fig 7. F, L, O, R).

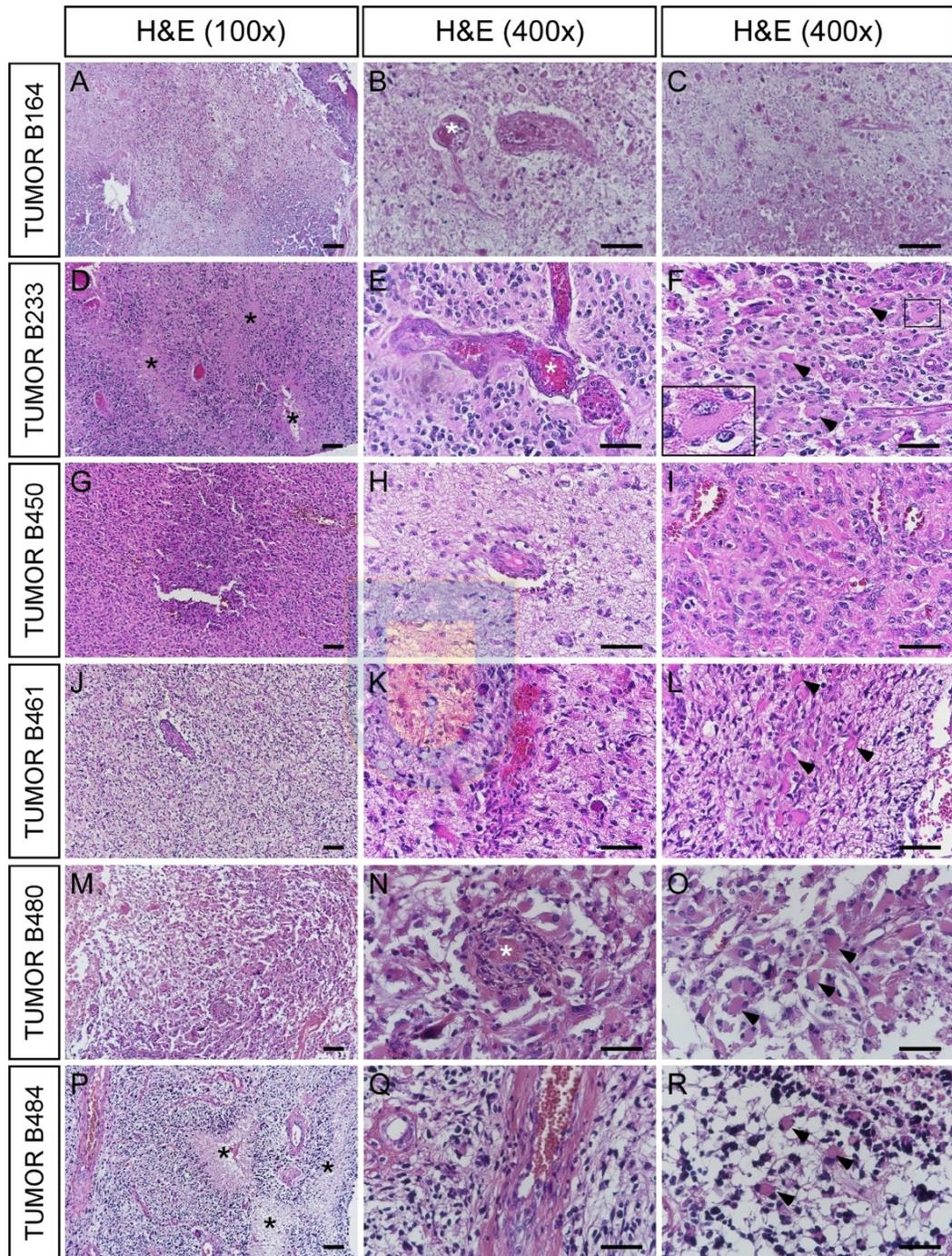


Figura 7. Características histopatológicas de los glioblastomas. Microfotografías tomadas con aumento de 100X y 400X de la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de seis biopsias humanas. Zonas de necrosis intratumoral (*). Vasculatura glomeruloide (* blanco). Gemistocitos (cabezas de flecha). En F, el recuadro corresponde al “zoom” de un gemistocito. Barras corresponden a 100 μ m (aumento 100X) y 50 μ m (aumento 400X) de longitud.

Se confirmó el fenotipo glial con reacción positiva para GFAP y Vimentina, observamos la expresión de Tubulina β -III notando la heterogeneidad propia de los glioblastomas (Fig. 8). En base a estas tinciones, logramos detectar distintas regiones en las muestras tumorales (Fig. sup. 2). Se observan regiones extensas del tumor con expresión de GFAP de manera heterogénea, mientras que vimentina se localiza cercana a la vasculatura glomeruloide, en la co-optación de vasos sanguíneos y en las zonas adyacentes al tumor con gliosis reactiva y la Tubulina β -III se presenta principalmente en regiones intratumorales. En todos los casos podemos detectar que los gemistocitos son positivos para los tres marcadores analizados (Fig. sup. 3).



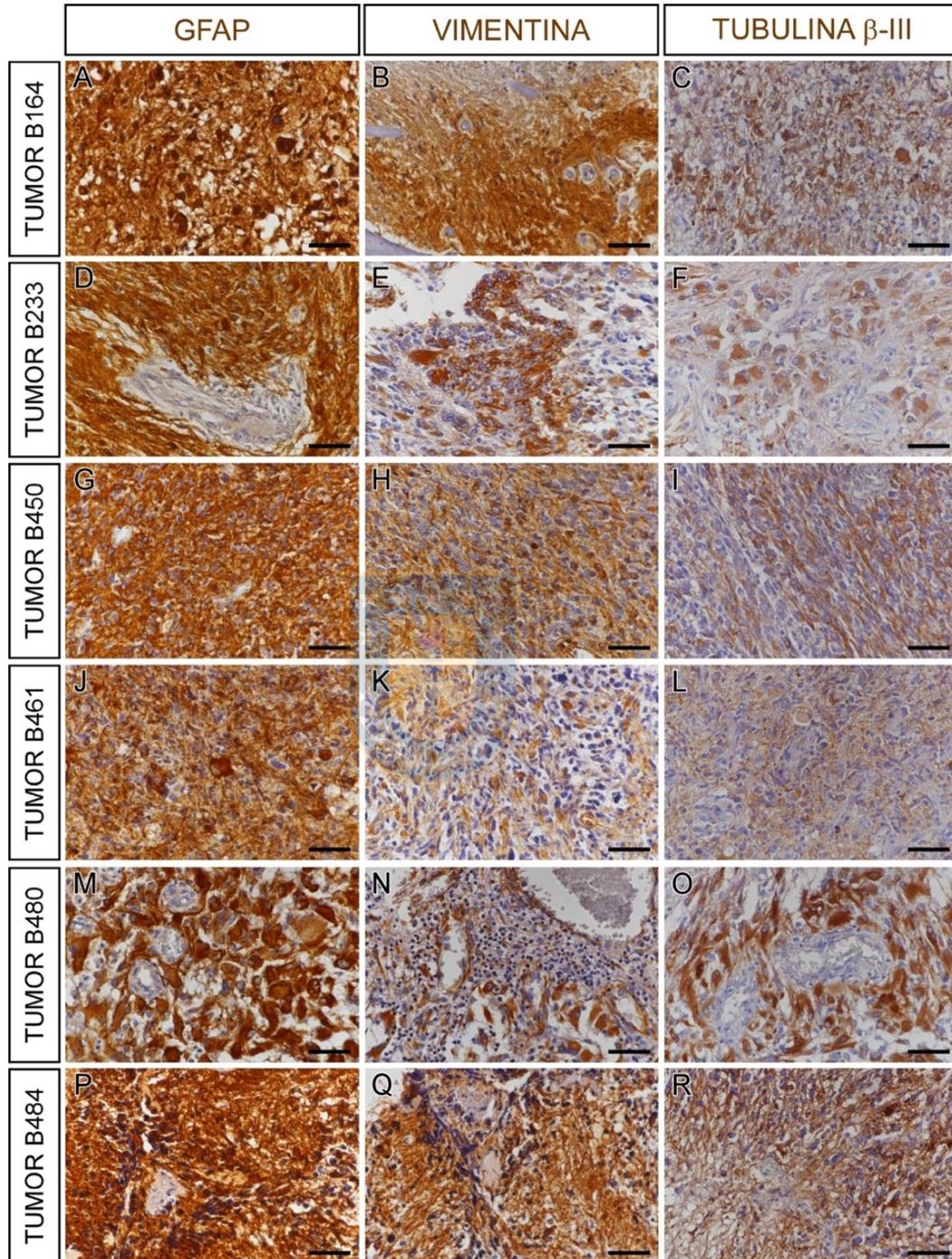


Figura 8. Caracterización inmunofenotípica de los glioblastomas. Tinción inmunohistoquímica para GFAP (DAKO, 1/200), Vimentina (DAKO 1/20) y Tubulina β -III (Promega, 1/1.000), en seis biopsias humanas. Las barras corresponden a 50 μ m de longitud. Los controles se muestran en la figura suplementaria 1. Microfotografías tomadas con aumento de 400X.

Los glioblastomas son tumores secretores de colágenos, por lo que analizamos la deposición de colágeno en las muestras humanas mediante la generación de segundos armónicos (Fig. 9) y con la tinción para rojo Picrosirius (Fig. 10). Mediante la microscopía espectral, podemos analizar la distribución de las fibras de colágeno acoplando la generación de segundos armónicos con la inmunofluorescencia; de esta manera notamos que los colágenos forman fibras asociadas principalmente a regiones positivas para Vimentina y no a células Tubulina β -III positivas (Fig. 9 A, E, I), sugiriendo que la secreción de colágeno puede ser realizada por células de un fenotipo más mesenquimal (Vimentina +). También podemos observar que se encuentran rodeando los vasos sanguíneos en la formación de vasculatura glomeruloide (Fig. 9 K, L, Fig. 9 G-I). El uso de la microscopía de luz polarizada, en la tinción con Rojo Picrosirius, nos permite además, aproximarnos al tipo de colágeno secretado; siendo en este caso, birrefringencia rojiza y amarilla, sugiriendo la presencia de Colágeno I (Fig. 10).

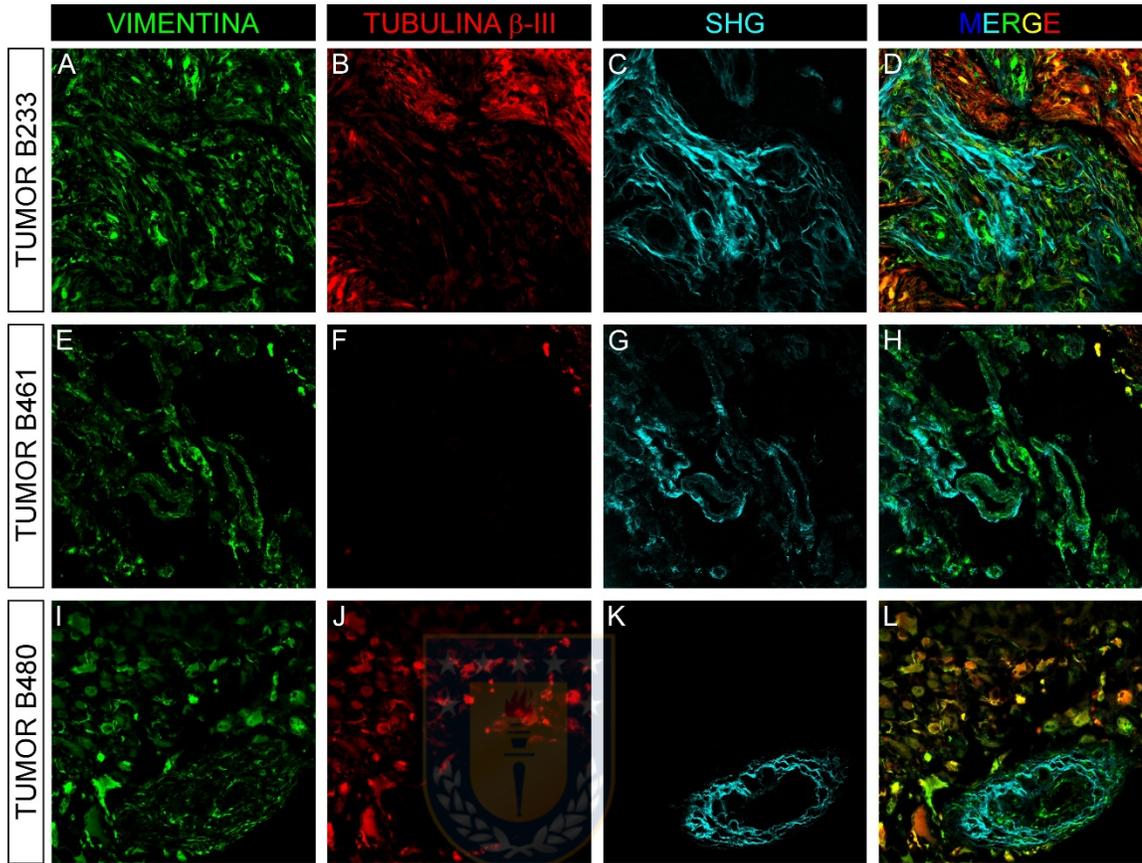


Figura 9. Detección de colágeno por Generación de Segundos Armónicos en muestras de glioblastomas humanos. La generación de Segundos Armónicos (SHG) se realizó con un láser pulsado de dos-fotones ajustado a una longitud de onda de 800nm, con una potencia de láser al 20%. Inmunohistoquímica para anti-vimentina (1/400) y anti-tubulina β -III (1/1.000). Microfotografías tomadas con un aumento de 400X.

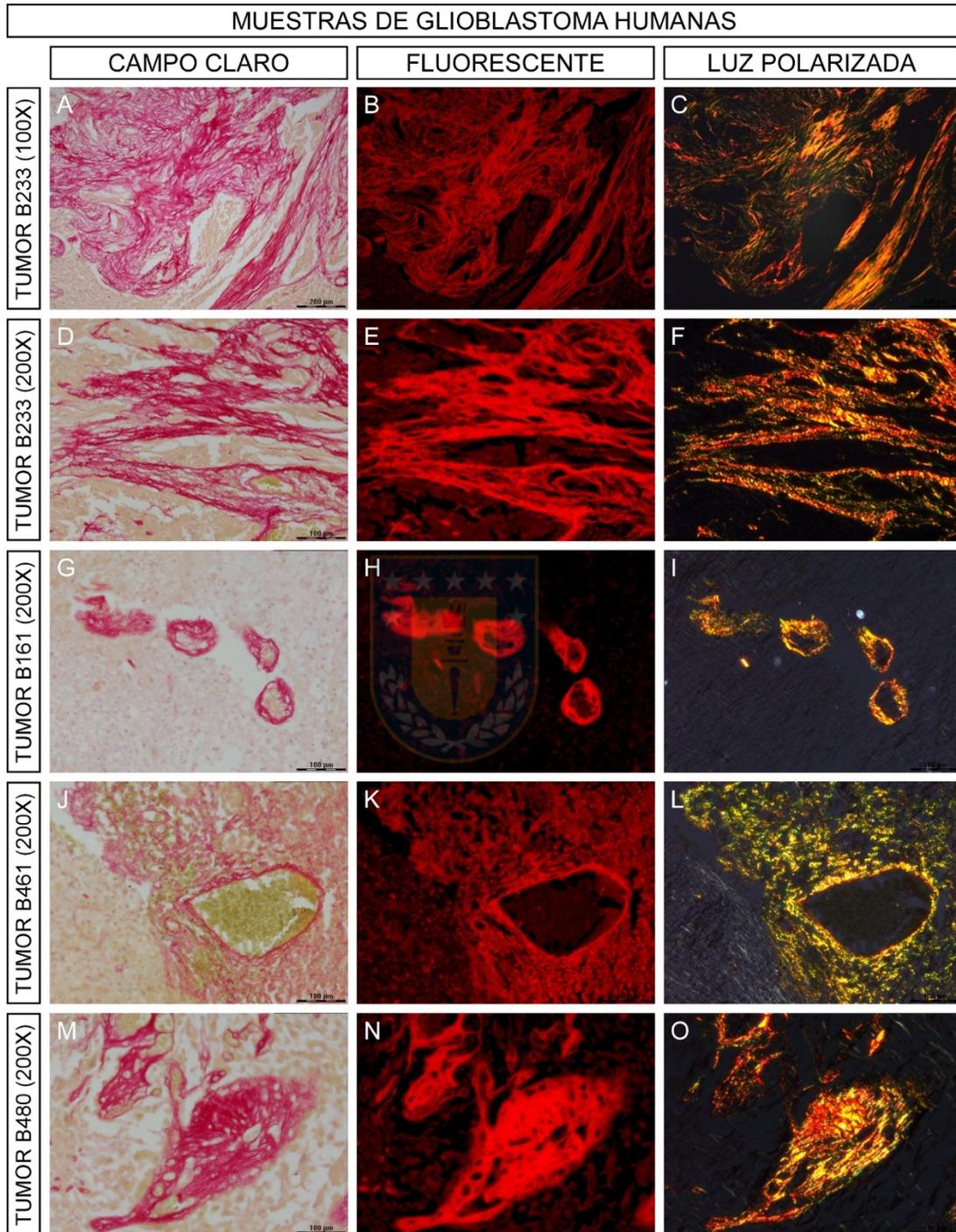


Figura 10. Detección de Colágeno por tinción de Rojo Picosirius en muestras de glioblastoma humano. Análisis de muestras en campo claro, fluorescencia y luz Polarizada utilizando un microscopio Leica LMD 7000. Barras de aumento: 100µm.

Previo al análisis de la expresión de los transportadores en las muestras humanas, se evaluaron distintos anticuerpos para SVCT2 mediante la reacción por inmunoperoxidasa en cortes contiguos de las biopsias (Fig. sup. 4). Los anticuerpos evaluados mostraron reacciones similares, pero una mejor tinción se logró con los anticuerpos A16 y G19 de Santa Cruz Biothecology; los cuales fueron usados mayormente en la realización de esta tesis. Además, estos anticuerpos han sido validados en el laboratorio, tanto por la sobre expresión de la isoforma humana (Fig. sup. 5), como por el Knock Out generado mediante tecnología de CRISPR-CAS9, datos publicados en (Ferrada et al., 2020).

Se evaluó la expresión de SVCT2, GLUT1 y GLUT3 en las seis muestras de biopsias de glioblastoma humano mediante inmunohistoquímica, donde observamos que GLUT1 es el principal transportador de DHA expresado en glioblastoma *in situ*, GLUT3 está bajamente expresado comparado a GLUT1 y SVCT2 se encuentra principalmente intracelular (Fig. 11). GLUT1 se localiza en las zonas necróticas y los vasos sanguíneos, distinguiendo su expresión en la membrana celular (Fig. 11 S). GLUT3 y SVCT2 se encuentran intracelulares y distribuidos en diferentes zonas del tumor de manera heterogénea (Fig. 11 T, U); en zonas gemistocíticas se puede observar que la localización de SVCT2 se mantiene intracelular (Fig. sup. 3).

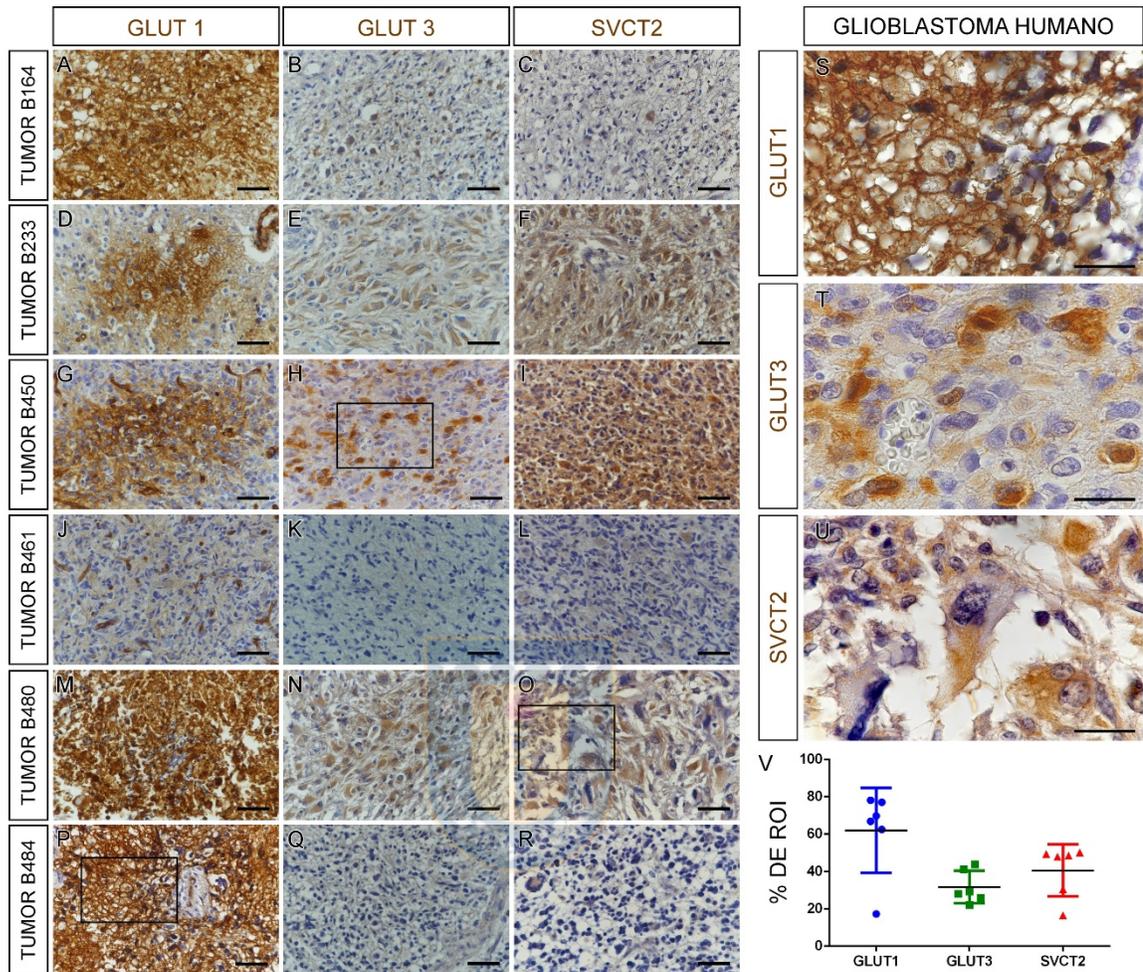


Figura 11. Inmunodetección de los transportadores de Vitamina C en glioblastomas humanos. Inmunohistoquímica para detectar GLUT1, GLUT3 y SVCT2. Recuadros en P, H y S corresponden a S, T y U, respectivamente. Mediante ImageJ se cuantificó el porcentaje de cada marca, empleando el ROI (V). Anticuerpos: GLUT1 (1/500), GLUT3 (1:100) y SVCT2-A16 (1/25). Barras de aumento, 50µm (A-U). Todos los datos representan la media ± SD (n=6).

Análisis in vitro de la expresión y localización de los transportadores de Vitamina C en células de glioblastoma

En el desarrollo del proyecto de investigación se utilizaron tres líneas celulares de glioblastoma humano, que representan a diferentes tipos de glioblastomas: La línea celular U87MG, derivada de un paciente con tumor parenquimal (ATCC, comercial), la línea HSVT-C3 derivada de un tumor subventricular humano y la línea RAV27, enriquecida en GSCs humanas (ver tabla 6).

Tabla 6. Células de glioblastoma humano

	U87MG	HSV-T-C3	RAV27
Nombre	Uppsala-87 Glioma Maligno	Tumor Sub-Ventricular Humano, Clon 3	Regensburg Arabel Vollmann, muestra 27
Procedencia	Comercial, U-87 MG (ATCC® HTB-14™)	Aisladas en el Laboratorio de Neurobiología y Células Madre, NeuroCellT. Concepción, Chile.	Donadas por el Laboratorio del Dr. Peter Hau, en el Hospital Universitario de Regensburg, Alemania.
Organismo	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
Tejido	Cerebro	Cerebro	Cerebro
Morfología	Epitelial	Epitelial	Epitelial
Cultivo	Adherencia	Adherencia	Adherencia
Enfermedad	Glioblastoma	Glioblastoma	Glioblastoma
Clasificación	N.D.	N.D.	Mesenquimal
Fenotipo IDH1(wt/mut)	IDH1 wt	N.D.	Tumor parental p.R132H. Células aisladas IDH1 wt

	U87MG	HSVT-C3	RAV27
Edad	Desconocido	15 años	42 Años
Supervivencia	N.D.	N.D.	32 semanas
Sexo	Masculino	Masculino	Desconocido
Raza	Desconocido	Caucásico	Desconocido
Observaciones		Tumor de origen Sub-ventricular	Células cultivadas con 62% de enriquecimiento de células CD133+.

N.D. No determinado.

Las tres líneas celulares fueron caracterizadas mediante inmunocitoquímica, presentando la expresión de marcadores de glioblastoma como GFAP, vimentina y tubulina β -III (Fig. 12 A-C), así como marcadores de células troncales neurales como nestina, Sox2 y CD133 y de proliferación como PCNA (Fig. 12 D-I). Se analizó la expresión de marcadores de fenotipo epitelial (Cocktail de Citoqueratinas y E-Cadherina) comparando el fenotipo mesenquimal (Vimentina) (Fig. 12 J-L). Adicionalmente, se evaluó el medio de cultivo sobre la expresión de algunos marcadores de células troncales en las células RAV27, ya que presentan un fenotipo enriquecido con GSCs; observando que las características se mantenían en células en adhesión y en la formación de gliomaesferas por la adición de factores de crecimiento (EGF 20ng/ml y bFGF 20ng/ml) y principalmente el Medio DMEM/F12 favorecía la expresión de Nestina y SOX2 (Fig. sup. 6).

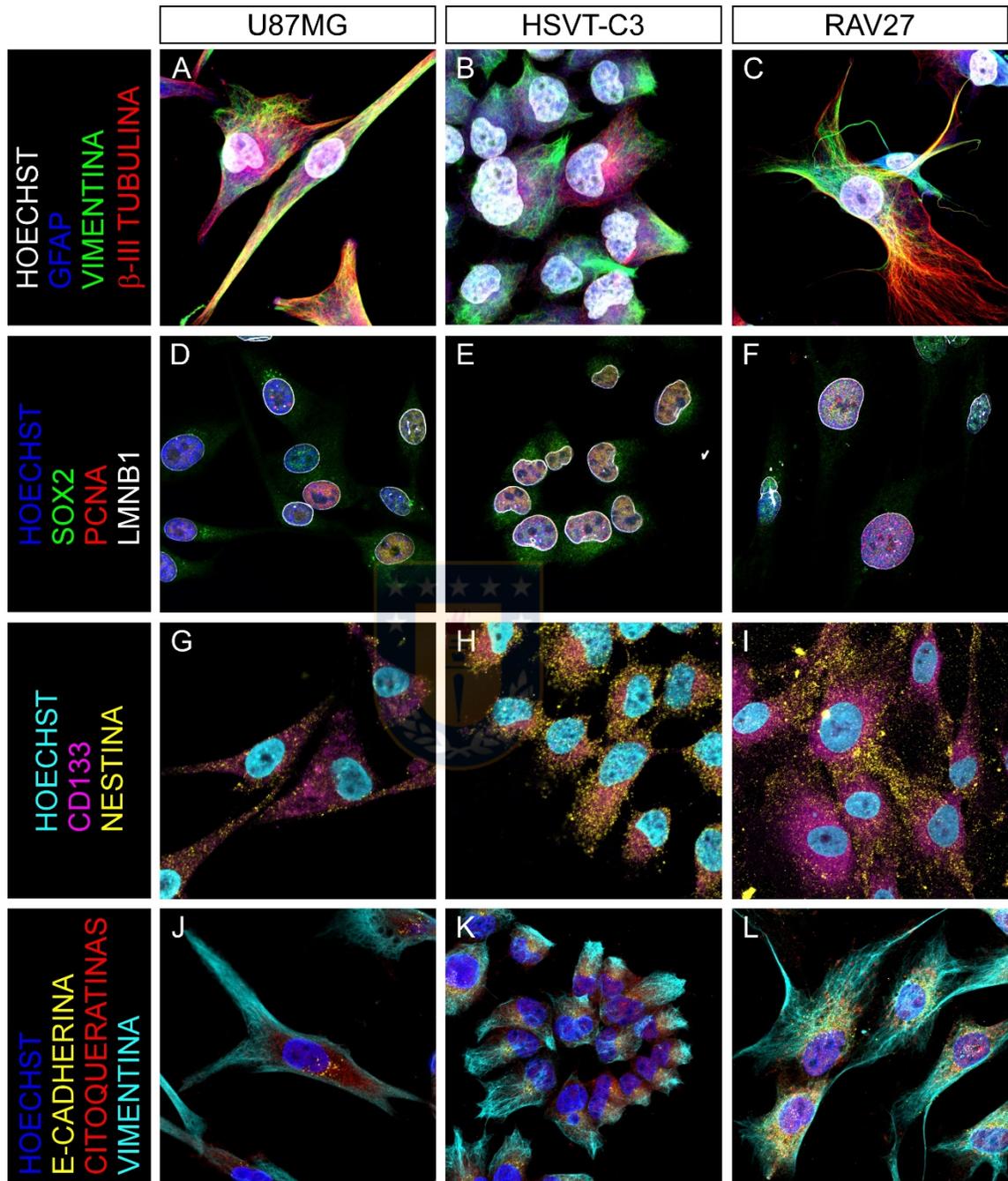


Figura 12. Caracterización inmunocitoquímica de las células de glioblastoma humano. Análisis de microscopía confocal espectral. Anticuerpos anti-GFAP (1/200), anti-vimentina (1/400), anti-tubulina β-III (1/1.000), anti-Sox2 (1/200), anti-PCNA (1/200), anti-LMNB1 (1/50), anti-CD133 (1/100), anti-nestina (1/50), anti-E-cadherina (1/200), anti-citoqueratinas (1/200). Para apreciar los marcadores por separado, ver figuras suplementarias 7-10. Microfotografías adquiridas con aumento a 400X.

In vitro, se caracterizó la expresión y distribución celular de los transportadores de vitamina C: SVCT2, GLUT1 y GLUT3, en líneas celulares U87MG, HSVT-C3 y RAV27, por PCR, WB, inmunocitoquímica asociada a microscopía confocal (Fig.13) y microscopía de súper resolución (Fig. 14). Los resultados, muestran la presencia de RNAs mensajeros para los tres marcadores. Al emplear los oligonucleótidos que permiten amplificar ambas isoformas de SVCT2, podemos notar la expresión de la isoforma corta con una longitud aproximada a 300pb, la cual ha sido reportada en células leucémicas HL-60 y que no se expresa en células HEK293 (Fig. 13 Panel inferior izquierdo).

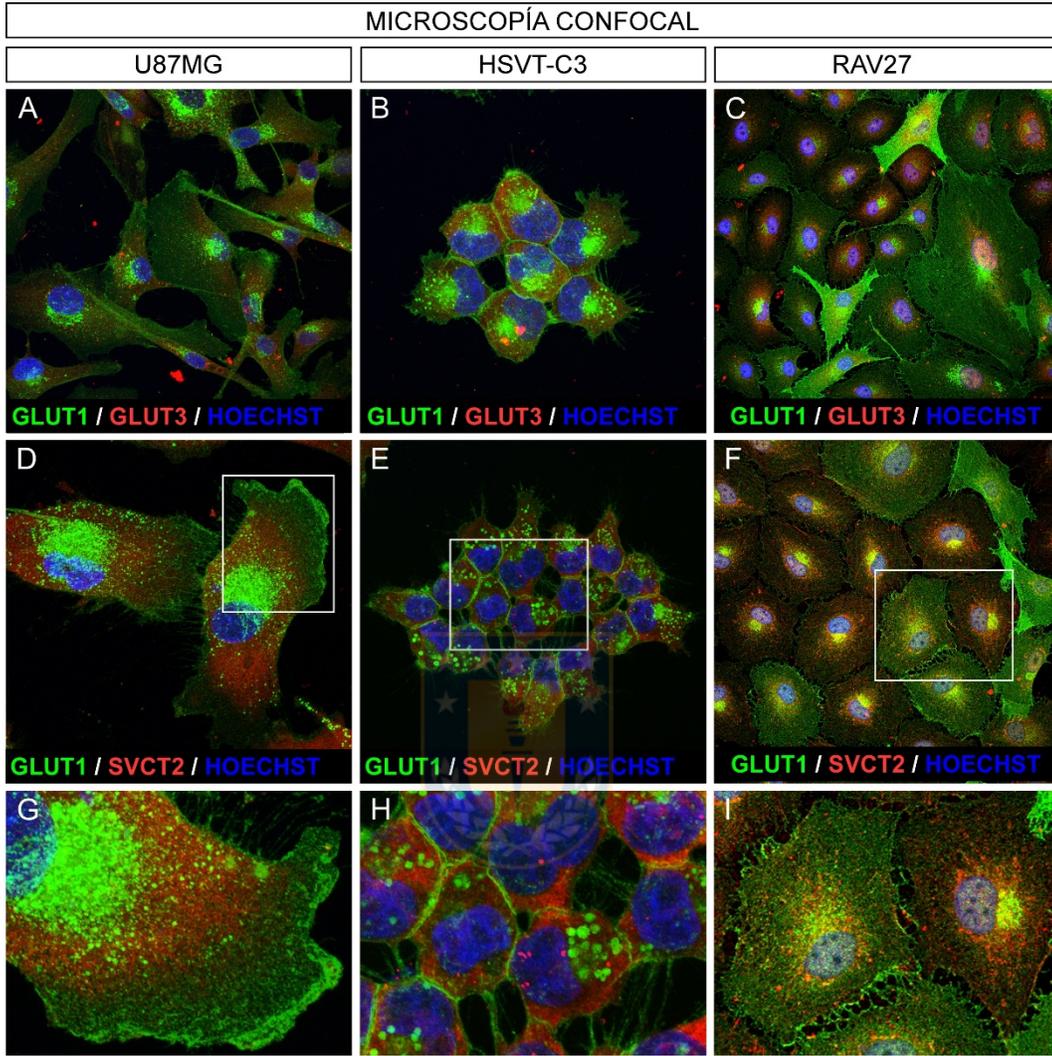
Mediante WB, confirmamos la presencia de las proteínas, detectándose una isoforma de SVCT2 de aproximadamente 45kDa, que es menor a lo que se ha reportado hasta el momento. Sin embargo, células N2a de neuroblastoma murino que expresan un transporte funcional para AA, muestran una banda de 70kDa (Fig 13. Panel inferior derecho), que correspondería a la forma larga de SVCT2.

Al evaluar la localización mediante inmunofluorescencia, podemos apreciar que GLUT1 se localiza principalmente en la membrana celular, pero también intracelularmente (Fig. 13). De manera similar a lo observado en las muestras de biopsias humanas, GLUT3 y SVCT2 se localizan intracelularmente. Para tener una mayor definición y una mejor aproximación a la localización, las preparaciones fueron analizadas por microscopía de súper-resolución confirmando la presencia de GLUT1 en la membrana celular, mientras que SVCT2 se localiza al interior de la célula (sub-membranal), siendo

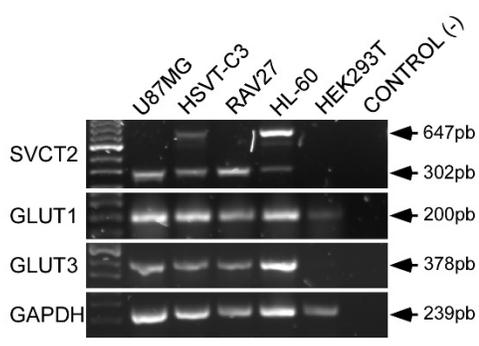
aproximadamente 250 ± 18 nm distantes entre GLUT1 y SVCT2 (la reacción más cerca de membrana) en las células RAV27 (Fig. 14). La localización de GLUT1 en la membrana, confirma su rol en la captación de vitamina C en su forma oxidada (DHA).



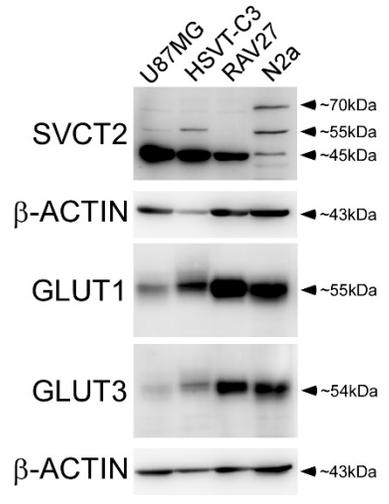
Figura 13. Expresión de los transportadores de Vitamina C en las células de glioblastoma. Inmunicitoquímica y microscopia confocal para la detección de GLUT1 (A – F), GLUT3 (A – C) y SVCT2 (D – I), en células U87MG (A, D, G), HSVT-C3 (B, E, H) y RAV27 (C, F, I). Imágenes en G, H e I corresponden al zoom de los recuadros en D, E y F, respectivamente. RT-PCR para la detección de los mensajeros de SVCT2, GLUT1, GLUT3 y GAPDH, en células U87MG, HSVT-C3, RAV27, HL-60, HEK293T. Inmunodetección de la proteína por Western Blot para SVCT2, GLUT1, GLUT1 y β -Actina (control de carga) en células U87MG, HSVT-C3, RAV27 y N2a. Anticuerpos ICQ: GLUT1 (1/500), GLUT3 (1/200), SVCT2-A16 (1/25). Anticuerpos para WB: GLUT1 (1/5000), GLUT3 (1/2000) y SVCT2 (1/2000). Aumento de células, 200x y 400x.



PCR



WESTERN BLOT



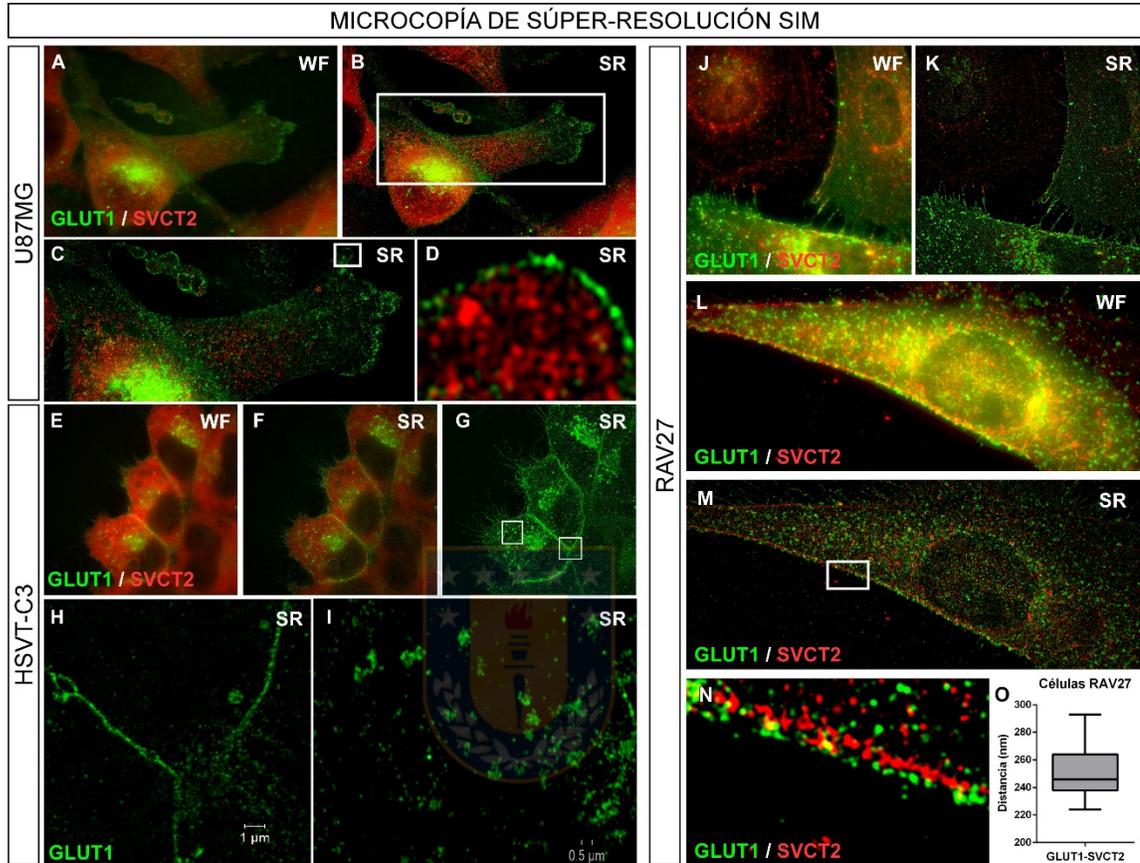


Figura 14. Análisis de la localización celular de GLUT1 y SVCT2 por Microscopía de Súper-Resolución. Microscopía de Súper-Resolución SIM para la detección de GLUT1 y SVCT2. Las imágenes se muestran en campo general (WF) y en súper-resolución (SR), observando diferentes aumentos para cada tipo celular. Cuantificación de la distancia de GLUT1 y SVCT2 en las células RAV27, con el uso del Software Zen de Zeiss (O). Anticuerpos: anti-GLUT1 (1/500) y anti-SVCT2-A16 (1/25).

Análisis funcional del transporte de vitamina C en células de glioblastoma y su compartimentalización intracelular

Se evaluó la capacidad de las células para transportar vitamina C (reducida y oxidada) con ensayos de captación con vitamina C radiactiva. Observamos que las tres líneas celulares captan bajas concentraciones de AA (> 400 pmoles por cada millón de células) y que este no se ve alterado por la ausencia de sodio. Sin embargo, cuando las células son expuestas a DHA por 5 minutos, la captación incrementa (células U87MG 1777 ± 45 pmol/ 1×10^6 cel; HSVT-C3 1158 ± 104 pmol/ 1×10^6 cel; RAV27 1913 ± 26 pmol/ 1×10^6 cel). Previo a la captación, se adicionaron Citocalasina B o E, las cuales son falotoxinas que impiden la dinámica del citoesqueleto, sin embargo, la Citocalasina B es capaz de unirse a los transportadores GLUTs (1-4), inhibiendo el transporte de DHA. De esta manera observamos que el transporte de DHA es inhibido parcialmente por Citocalasina B (en las células U87MG y RAV27), mientras que la Citocalasina E no afecta la captación de DHA (Fig. 15), indicando que las células de glioblastoma poseen una captación preferencial por la vitamina C oxidada, DHA.

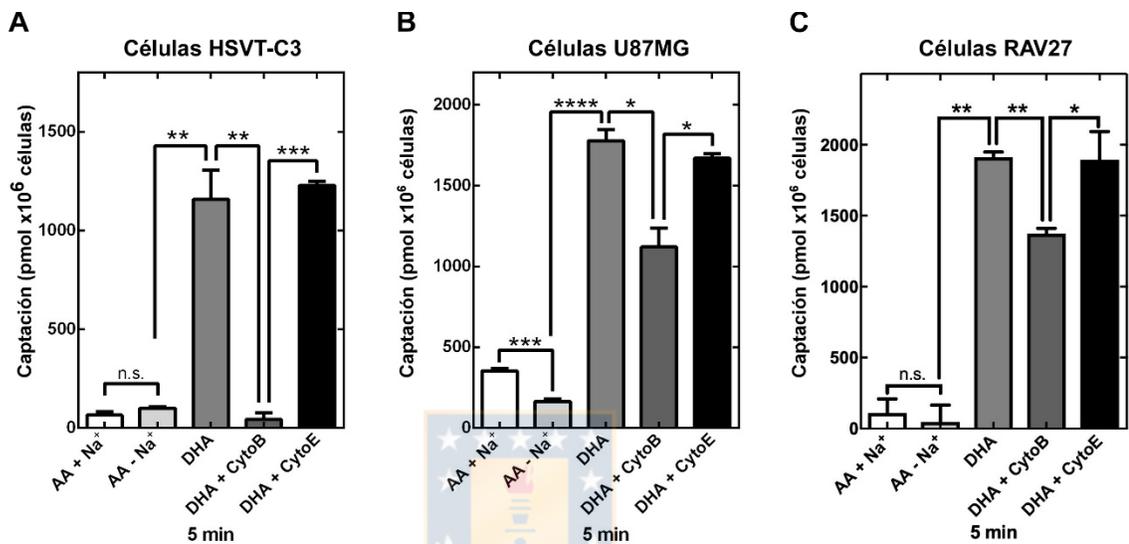


Figura 15. Análisis de la captación de Vitamina C en células de glioblastoma humano. Ensayos de transporte de vitamina C (5min, AA 100 μ M) en células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 en presencia de sodio (Na⁺) o Cloruro de Colina (-Na⁺) y captación de DHA 100 μ M en presencia de citocalasina B (Cyto B) 20 μ M o Citocalasina E (Cyto E) 20 μ M. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student.

Se ha descrito que algunas células tumorales acumulan vitamina C intracelular (mayormente reducida); sin embargo, si las células son lisadas suavemente con detergente, la vitamina C no sale de la célula. Esto sugiere que la vitamina C es compartimentalizada subcelularmente. Por lo tanto, nos preguntamos si la localización intracelular de los transportadores de vitamina C en glioblastoma, permite su compartimentalización. Para evaluar este concepto, se midió la concentración de AA en el citosol. La estrategia consistió en incubar las células con AA o DHA [500 μ M] por 30min. Posteriormente, con una lisis suave en PBS frío (indicaciones del kit), seguido de una centrifugación, se extrajo la fracción citosólica, la cual fue analizada por la técnica de FRASC (Fig. 16 A). A través de estos experimentos, observamos que las tres líneas celulares mantienen bajas concentraciones de AA en el citosol, independiente de la forma de vitamina C captada por la células. Las células RAV27 presentaron una mayor cantidad de AA citosólico (211,1 \pm 5,6 pmoles/1x10⁶ células) cuando se incubaron con DHA (Fig. 16 B), lo que sugiere una menor capacidad de compartimentalización. Estas células mostraron la menor cantidad de transportador SVCT2 en los análisis inmunocitoquímicos y de Western blot. Además, presentaron la menor densidad de RER (ver Fig. 18B, comparar E, J, O). En conjunto, los datos sugieren que gran parte de la vitamina C intracelular, esta compartimentalizada en las células de glioblastoma después de 30 minutos de incubación.

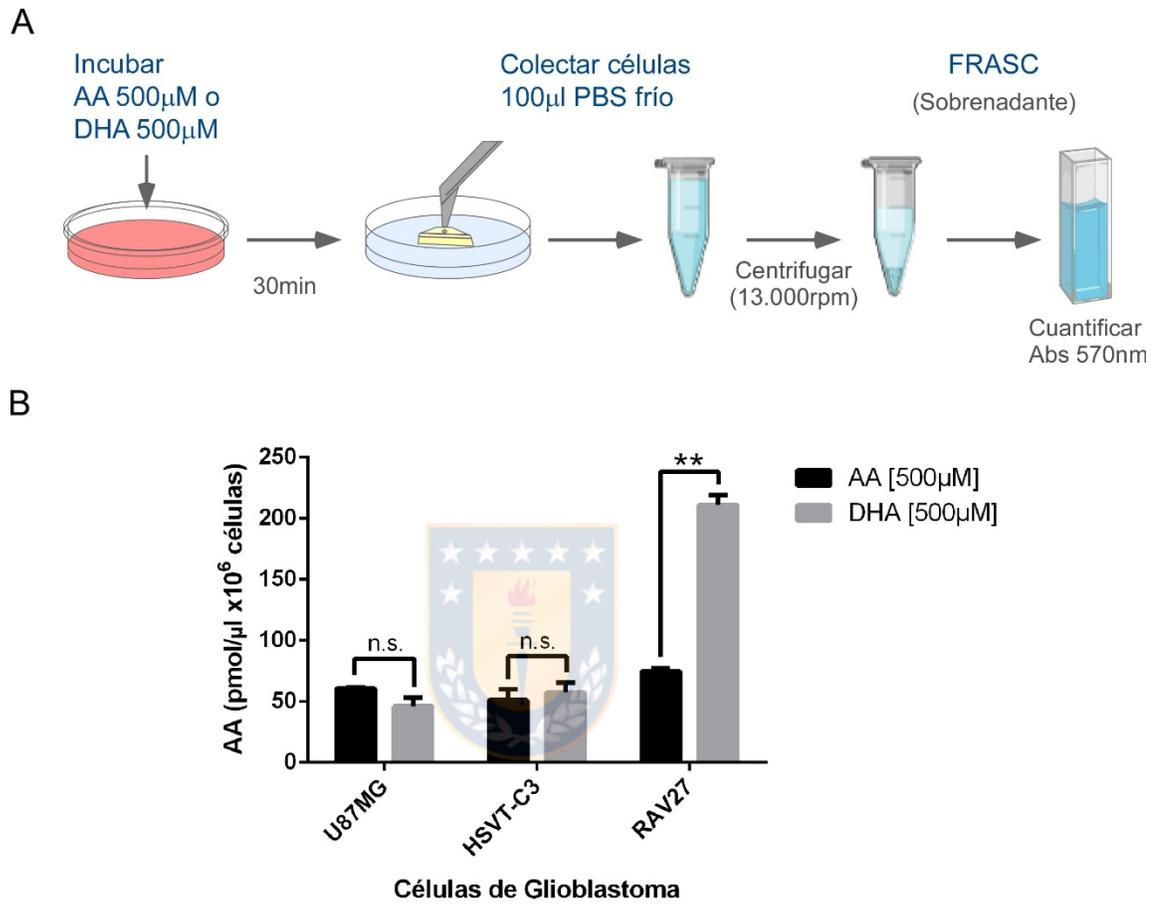


Figura 16. Análisis de la acumulación citosólica de vitamina C en células de glioblastoma humano. Las células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 fueron incubadas con AA o DHA 500 μ M. Posteriormente, se obtiene la fracción citosólica por lisis y centrifugación en frío. Finalmente, la concentración de AA se mide con el método de FRASC (A). Cuantificación del AA citosólico en las células de glioblastoma (B). Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05; n.s. no significativo. Análisis estadístico de t -student.

Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C

Como se ha demostrado previamente, las células de glioblastoma tienen un transporte funcional para DHA, molécula que puede ser reducida y compartimentalizada. También observamos que GLUT1, GLUT3 y SVCT2 se localizan intracelularmente. Es por ello que nos preguntamos por los posibles organelos donde se podría estar acumulando la vitamina C. Se propuso como candidato al Retículo Endoplasmático Rugoso (RER), debido a que algunos procesos celulares que requieren vitamina C, como la biosíntesis del colágeno, ocurren en el lumen del RER. Además, como los transportadores poseen secuencias de incorporación a la vía secretora clásica, evaluamos su asociación al (RER) y/o al Aparato de Golgi.

La distribución intracelular fue analizada utilizando un sistema de Baculovirus con expresión de proteínas de fusión fluorescentes específicas para el RER (Calreticulina KDEL-RFP, RER-RFP) o para el Aparato de Golgi (N-Acetilgalactosamina Transferasa-GFP, Golgi-GFP). Posterior a la transducción, las células fueron fijadas y analizadas por inmunofluorescencia (Fig. 17 A). De esta manera pudimos observar que GLUT1 se encuentra en el RER, en el aparato de Golgi y en la membrana plasmática (Fig. 17 B, C). GLUT3 se asocia fundamentalmente al RER (Fig. 17 B, C). SVCT2 se localizó preferentemente a nivel del RER (color rosado intracelular), en células U87MG, HSVT-C3 y RAV27 (Fig. 17 B), lo que queda claramente definido al analizar el coeficiente de correlación de la tinción para SVCT2 y la marca del RER-RFP (Fig. 17 C).

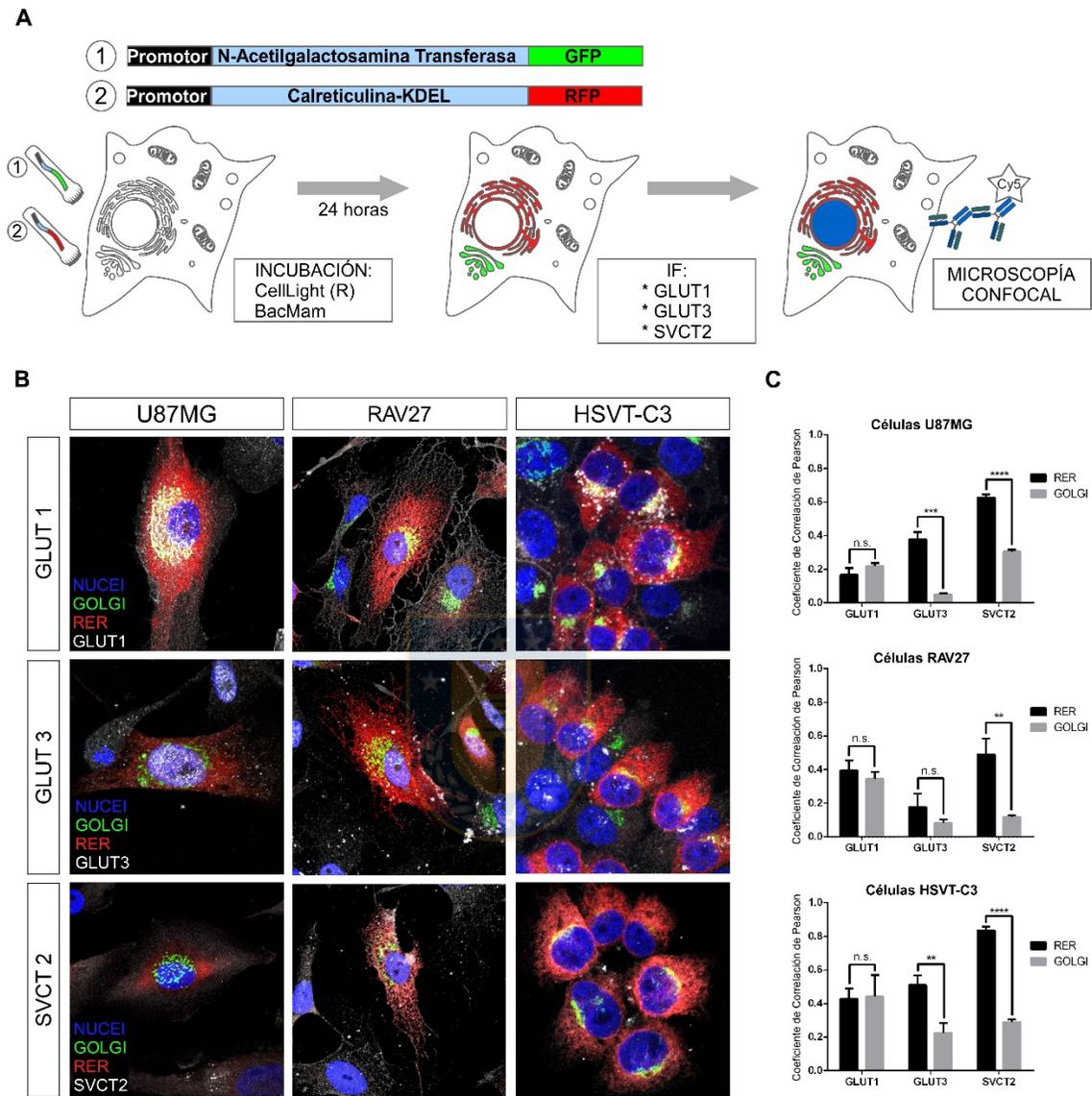


Figura 17. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C, mediante sistema BacMam. Esquema representativo de la transducción de baculovirus, los cuales fueron incubados por 24 horas. Posteriormente, las células fueron fijadas y se realizó inmunocitoquímica para la detección de GLUT1, GLUT3 y SVCT2 (A). Se observa la co-distribución de GLUT1, GLUT3 y SVCT2 (blanco) con el baculovirus que marca el RER (rojo, calreticulina-KDEL-RFP) o el baculovirus que marca el aparato de Golgi (verde, N-acetil-galactosamina transferasa-GFP), en las células U87MG, RAV27 y HSV-C3 (B). Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson para cada línea celular (C). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD ($n=3$). *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de t -student. Para apreciar los marcadores por separado ver figuras suplementarias 12-14. Microfotografías tomadas con aumento de 400X (zoom digital).

Para corroborar los resultados obtenidos, con los experimentos de co-distribución con los organelos fluorescentes; y en particular por la asociación de SVCT2 al RER, se realizó microscopía de súper-resolución SIM. La técnica nos permite analizar dos canales simultáneos, de esta forma, se empleó el baculovirus para la expresión de Calreticulina KDEL- RFP (en el canal rojo) y para el canal verde la tinción de SVCT2, con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor 488 (Fig. 18 A). Al observar las imágenes de súper-resolución, podemos definir que SVCT2 se localiza en el RER en las tres líneas celulares (Fig. 18 A-D, F-I, K.N). Si analizamos el zoom de un solo plano focal, notamos con mayor detalle dicha co-distribución (Fig. 18 D, I, N). Además, se evidencia una mayor co-localización en las células HSVT-C3, misma que condice con la asociación parcial indicada por el coeficiente de correlación y las superposiciones de cada canal (M1 y M2) (Fig. 18 C). En conjunto, los experimentos de microscopía confocal y de súper resolución, sugieren fuertemente que el transportador de vitamina C SVCT2, se localiza principalmente en el retículo endoplasmático rugoso.

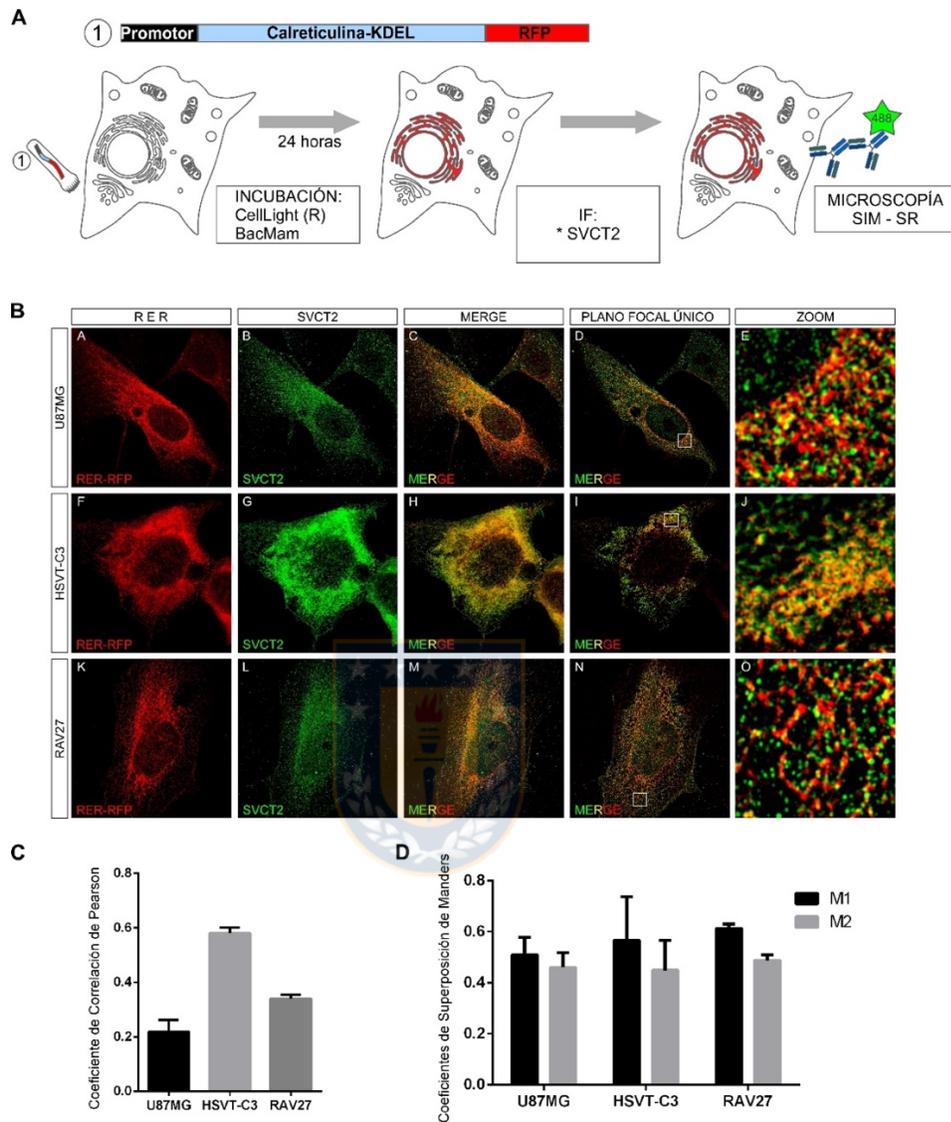


Figura 18. Análisis de la localización de SVCT2 en el Retículo Endoplasmático Rugoso por microscopía de Súper Resolución SIM. Esquema representativo de la transducción con baculovirus RER-RFP, los cuales fueron incubados por 24 horas. Posteriormente, las células fueron fijadas y se realizó inmunocitoquímica para la detección por microscopía SIM-SR de SVCT2-AF488 (A). Se observa la reconstrucción tridimensional de la proyección de máximas intensidades, analizando la co-distribución de SVCT2 (color verde) con el baculovirus que marca el RER (color rojo, calreticulina-KDEL-RFP), en células U87MG, HSV1-C3 y RAV27. Se muestra el “zoom” de los recuadros del plano focal único para cada línea celular. Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson (C) y de superposiciones de Mander M1 y M2 (D). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas con aumento de 630X (con zoom digital).

Posteriormente, realizamos extracción de retículo endoplasmático de las células HSVT-C3, ya que presentan una mayor co-distribución del transportador con el RER. Para ello se empleó un kit de enriquecimiento de RER. En el primer paso obtenemos mitocondrias y debris celular; posteriormente precipitamos el RER con CaCl_2 y finalmente analizamos las fracciones por Western blot (Fig. 19 A). Se emplearon los anticuerpos para detectar SVCT2, los canales de aniones dependientes de voltaje (VDAC 1/2/3), como marcador de la mitocondria; y un anticuerpo que reconoce la secuencia KDEL de la GPR-78, como marcador de RER. En los inmunoblots se puede observar que la isoforma de 45kDa de SVCT2, se localiza principalmente en la fracción enriquecida en RER. VDAC se localiza en fracción mitocondrial, pero no en el RER; mientras que podemos detectar la secuencia KDEL mayormente en la fracción del RER (Fig. 19 B). Estos datos confirman la localización de SVCT2 en el retículo endoplasmático rugoso de células HSVT-C3 de glioblastoma y sugieren que se trata de una isoforma pequeña de ~45kDa.

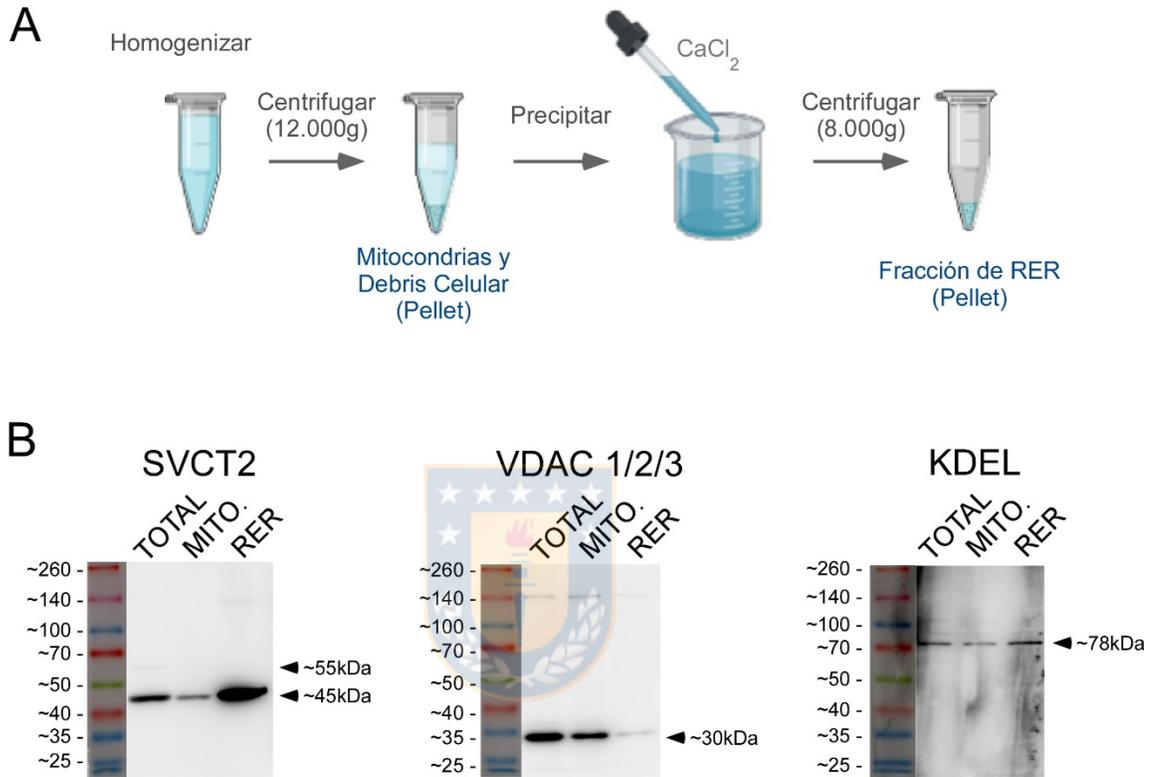


Figura 19. Análisis de la localización de SVCT2 en extractos de Retículo Endoplasmático Rugoso de células HSVT-C3. Esquema representativo del Kit de enriquecimiento de RER (A). Inmunoblots para la detección de SVCT2, VDAC y KDEL (B). Anticuerpos: anti-SVCT2 (SC-G19 1/500), anti-PAN-VDAC (1/4000), anti-KDEL-GPR78 (1/500).

Análisis de la sobre-expresión de SVCT2wt y su localización subcelular

Hemos definido que las células de glioblastoma expresan una isoforma pequeña de SVCT2, que se localiza preferentemente en el RER. De esta forma nos preguntamos si estas células tienen la capacidad para exportar el transportador SVCT2wt a la membrana celular. Para ello, determinamos si la sobreexpresión de la isoforma silvestre de SVCT2 se localiza en la membrana plasmática y analizamos su distribución en el RER con el sistema de Baculovirus (Fig. 20 A). Previamente se realizó la construcción de los vectores lentivirales para la expresión de SVCT2 fusionada a la proteína amarilla fluorescente (Lenti-hSVCT2wt-EYFP), así como un lentivirus control para la expresión de la proteína verde fluorescente (Lenti-EGFP). En las imágenes adquiridas por microscopía confocal, de las tres líneas celulares, observamos que la transducción con el lentivirus control, EGFP se concentra principalmente en el núcleo (Fig. 20 B, H, N). También confirmamos en estas células la co-distribución del RER-RFP y SVCT2 endógeno (detectado con el anticuerpo en color blanco) (Fig. 20 C, I, O). Cuando analizamos la sobreexpresión de SVCT2wt, notamos que hSVCT2wt-EYFP se localiza principalmente en la membrana plasmática (Fig. 20 D, J, P; color verde). El anticuerpo anti-SVCT2 confirmó al transportador en la membrana celular (Fig. 20 E, K, Q; color blanco). Los análisis en “merge” se observan en las dos últimas líneas de imágenes en figura 20 (Fig. 20 F, G, L, M, R, S). Estos datos confirman que la forma larga de SVCT2wt puede ser localizada en la membrana celular en las células de glioblastoma. Su ausencia en condiciones normales,

potencia aun más la idea, que estas células sintetizan una forma corta de SVCT2, que queda en el RER.

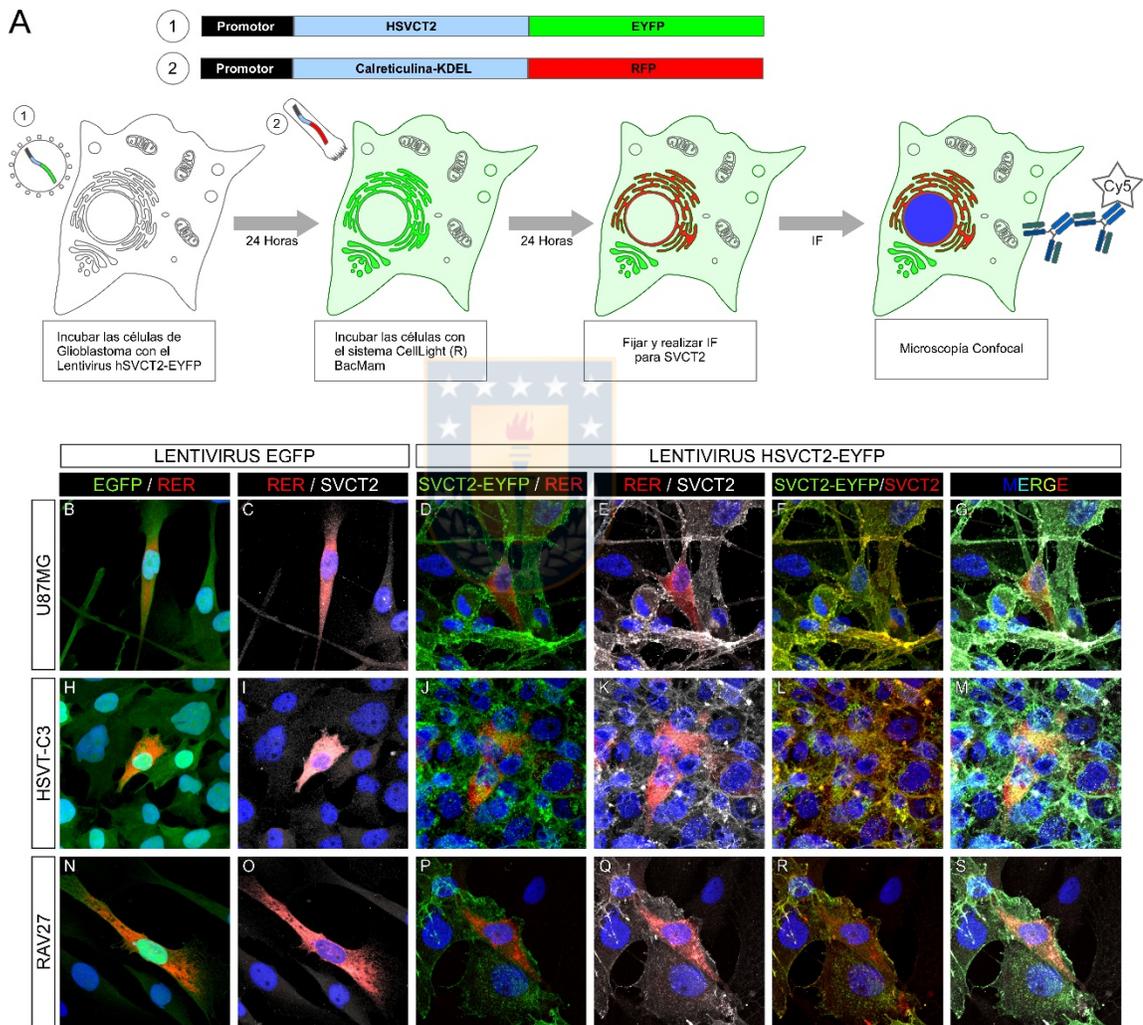


Figura 20. Análisis de la localización subcelular de la sobreexpresión de SVCT2. Esquema representativo de la transducción con el lentivirus hSVCT2-EYFP o EGFP y el baculovirus RER-RFP, los cuales fueron incubados por 24 horas, cada uno. Posteriormente, las células fueron fijadas y se realizó inmunocitoquímica para la detección por microscopía confocal de SVCT2-Cy5 (A). Co-distribución de SVCT2 con el RER en lentivirus control EGFP (B, C, H, I, N, O) o con lentivirus hSVCT2-EYFP (D-G, J-M, P-S). Microfotografías tomadas con aumento de 400X (con zoom digital).

Para profundizar aun más en este punto, se decidió analizar las muestras por microscopía de súper resolución. Confirmamos que SVCT2wt sobreexpresado (SVCT2-EYFP) se ubica preferentemente en la membrana celular e intracelular (Fig. 21 B). La localización en la membrana celular queda claramente definida al observar las pequeñas filopodias (Fig. 21, merge-zoom). Al analizar el solapamiento de EYFP con el marcador de RER, podemos notar que una baja proporción de moléculas hSVCT2wt-EYFP se localizan en el RER (Fig. 21 B). De esta forma, la biosíntesis de la forma SVCT2wt larga, parece transitar muy rápidamente por el RER, para alcanzar la membrana plasmática.



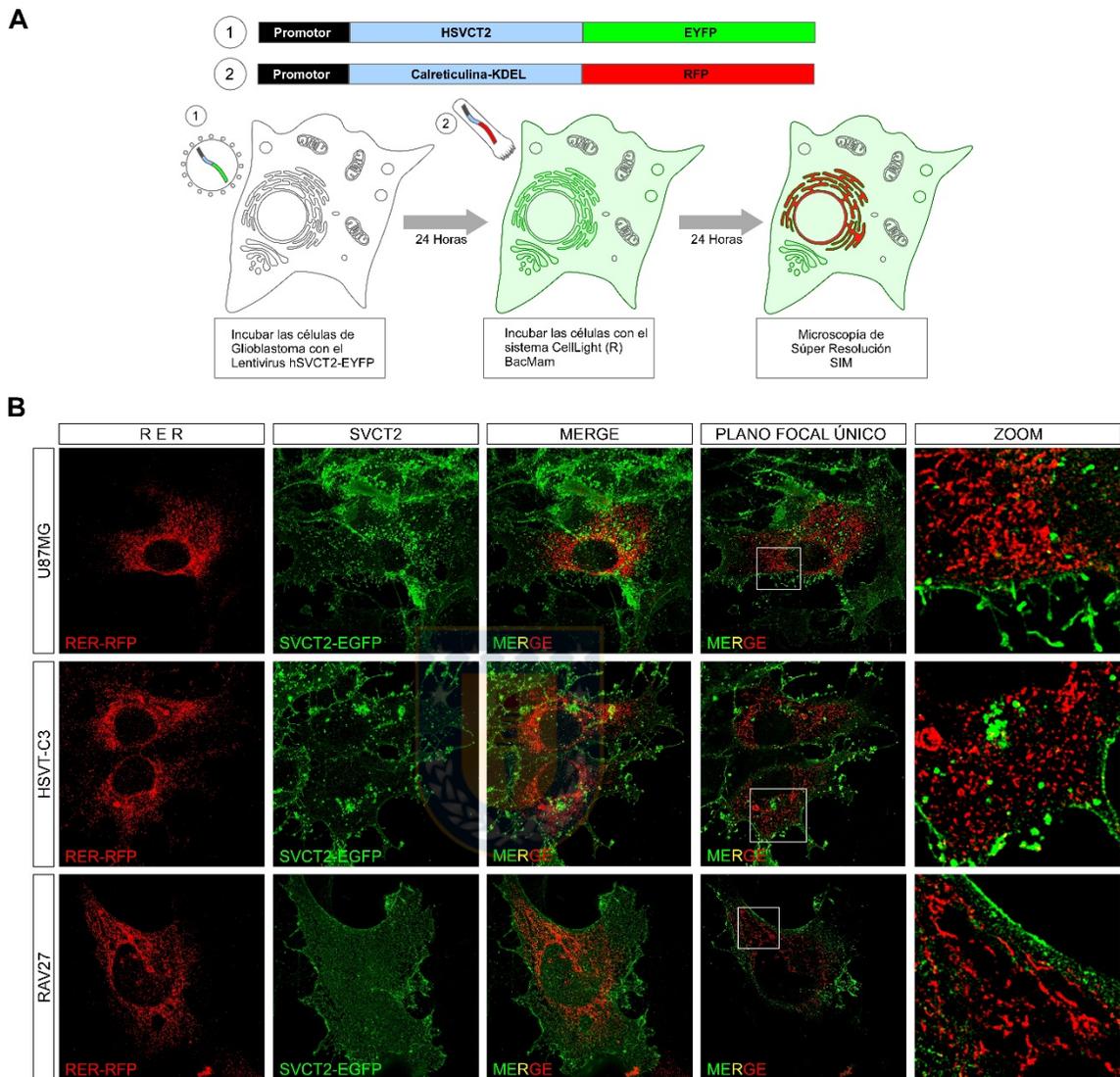


Figura 21. Análisis por microscopía de Súper Resolución SIM de la localización subcelular de la sobreexpresión de SVCT2. Esquema representativo de la transducción con lentivirus (hSVCT2-EYFP o EGFP) y/o baculovirus RER-RFP, los cuales fueron incubados por 24 horas. Posteriormente, las células fueron observadas utilizando microscopía de súper resolución SIM (A). Se observa la reconstrucción tridimensional utilizando proyección de máximas intensidades. Co-distribución de hSVCT2-EYFP (color verde) con el baculovirus que marca el RER (color rojo, calreticulina-KDEL-RFP), en células U87MG, HSVT-C3 y RAV27. Se muestra el “zoom” de los recuadros del plano focal único para cada línea celular. Microfotografías tomadas con aumento a 630X (con zoom digital).

Efecto del ácido dehydroascorbico sobre la viabilidad celular frente al estrés oxidativo

El DHA es un sustrato transportado por células de glioblastoma, que es fácilmente generado en condiciones de estrés oxidativo; que puede ser producido endógenamente por medio de radiación o quimioterapia. Las células de glioblastoma al ser fenotípicamente asociadas al linaje astrogial, podrían verse beneficiadas por el consumo del DHA en condiciones de estrés. Es fundamental indicar que estas células resisten los tratamientos implementados para reducir la enfermedad en humanos. Para estudiar este concepto, se evaluó el efecto de la suplementación de DHA sobre la supervivencia celular, bajo la inducción de estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 1mM. Los experimentos fueron cuantificados con el uso de XTT y mediante microscopía confocal, se corroboró la integridad de las células fijadas con PFA, después de los tratamientos (Fig. 22). En los experimentos con XTT, observamos que el tratamiento con DHA no induce ningún cambio respecto al medio control; sin embargo, el H_2O_2 reduce la viabilidad de las células U87MG ($49,7\pm 6,1\%$), HSVT-C3 ($34,5\pm 10,9$) y RAV27 ($15,3\pm 0,7\%$). Interesantemente, el tratamiento con DHA bajo estrés oxidativo ($H_2O_2 + DHA$) recupera la viabilidad celular aproximadamente al doble, U87MG ($78\pm 4,6$), HSVT-C3 ($68,2\pm 12,8\%$) y RAV27 ($27,6\pm 1,1\%$). Cuando analizamos la estructura celular, notamos que el tratamiento con H_2O_2 produce una retracción de las células, disminuyendo la adhesión al sustrato y adquieren una forma esférica. Posterior a 4 horas con medio completo, para permitir la recuperación

de las células, el efecto es diverso, células U87MG y HSVT-C3 se mantienen y recuperan, mientras que las células RAV27 no (Fig. 22 C). Al tratar con H_2O_2 + DHA, observamos el mantenimiento de las adhesiones y además, la formación de fibras de estrés (tinción para la actina filamentosa), las cuales se observan mejor a las 6 horas (Fig. 22 C). En general, el DHA muestra una recuperación en la viabilidad celular, al tratar las células con peróxido de hidrógeno, mas no el AA (datos no mostrados).

Adicionalmente, observamos que el H_2O_2 induce la translocación de SVCT2 reticular a la membrana celular (Fig. Sup. 15), indicando que probablemente la isoforma reticular de SVCT2 tiene algún rol en el transporte de vitamina C durante el estrés oxidativo, o solamente, la célula traslada membranas internas a la membrana celular en respuesta a stress, de esta forma, SVCT2 reticular llegaría a nivel externo. En forma paralela, las células tratadas con H_2O_2 fueron además tratadas con AA, no observandose ningún efecto protector (datos no mostrados). Esto puede indicar que el transportador corto que llega a la membrana celular en no tiene la capacidad para captar AA. Será necesario realizar un mayor número de estudios para definir estas propuestas.

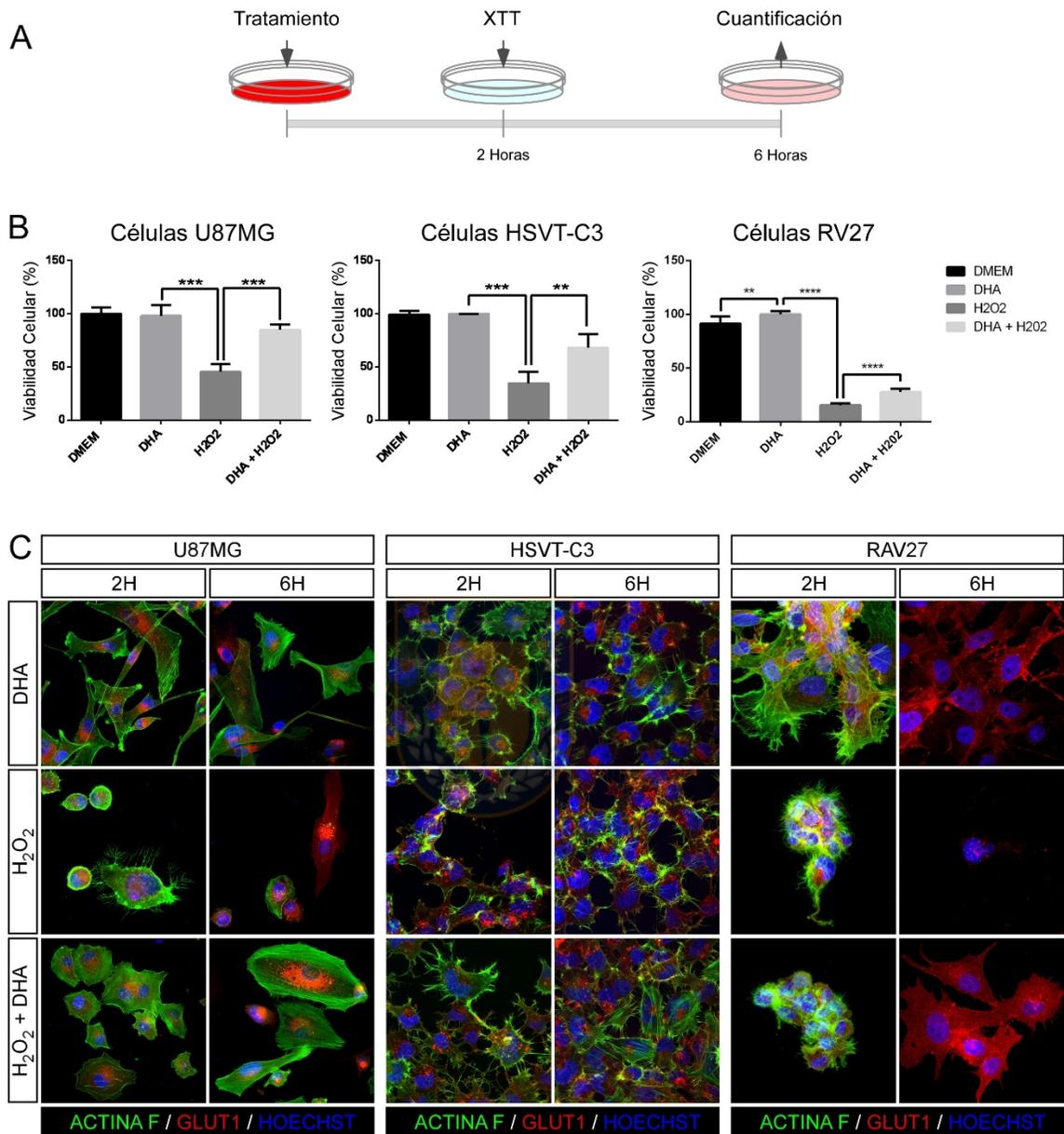


Figura 22. Efecto del DHA sobre la viabilidad celular frente a estrés oxidativo inducido por Peróxido de Hidrógeno. Esquema representativo de los experimentos (A). Cuantificación de la viabilidad celular por el método de XTT, en células U87MG, HSVT-C3 y RAV27. Tratamientos control (DMEM), DHA 1mM, H₂O₂ 1mM o DHA 1mM + H₂O₂ 1mM (B). Se observa la actina filamentosa (Actina F, en color verde), GLUT1 (en color rojo) y los núcleos (Hoechst, en color azul) (C). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas con aumento a 400X (con zoom digital).

Efecto de la suplementación con vitamina C sobre la secreción de colágeno *in vitro*

Nuestros resultados muestran que las células de glioblastoma captan vitamina C y la compartimentalizan, sugiriendo su acumulación en el RER. En este organelo ocurre el apropiado plegamiento de las fibras de colágeno y es bien conocido que la vitamina C participa en este proceso. Además, biopsias de glioblastomas humanos, muestran deposiciones de colágenos, siendo esenciales en el desarrollo tumoral. Consideramos que la vitamina C en el RER de las células de glioblastoma favorece la secreción de colágeno; es por ello que determinamos si la suplementación con vitamina C, a concentraciones fisiológicas, puede tener un efecto en la deposición de colágeno *in vitro*.

Para ello, se evaluó y estandarizó un protocolo para la detección de colágeno *in vitro* con el uso de la técnica histoquímica de Rojo Picrosirius, acoplada a la inmunocitoquímica (PRS-IF) (Fig. 23) y a través de la inmunodetección de colágeno I y IV (Fig. 24). La estrategia experimental consistió básicamente en suplementar las células en cultivo cada 12 horas con vitamina C (AA y DHA 200 μ M), terminando el experimento a las 72 horas, con la fijación de las células. Hasta el momento sabemos que las células de glioblastoma capta DHA, sin embargo, se decidió incluir en los experimentos la suplementación con AA, ya que en condiciones de cultivo, el AA a las 12 horas se ha oxidado en un 50% a DHA, pudiendo suponer así una oxidación extracelular gradual durante un tiempo de incubación prolongado.

Las imágenes adquiridas por microscopio confocal de las tinciones con PRS-IF fueron realizadas inmediatamente después de haber montado las preparaciones, para evitar la difusión del colorante y tener una mejor precisión en el marcaje. Se empleó a la vimentina como marcador de las células de Glioblastoma, donde observamos que tiñe el citoesqueleto de las mismas; aunque no se observa una diferencia en la intensidad de fluorescencia, el tratamiento con AA y DHA induce un aparente aumento de la polarización (Figura 23, verde); sin embargo, deberá ser estudiado con profundidad. Mientras que la tinción de PRS se nota intracelular, la suplementación con AA y DHA favorece una mayor tinción intracelular y principalmente se concentra en los bordes celulares (Fig. 23, rojo), lo que indicaría un probable aumento en la secreción de colágeno. Sin embargo, es necesario detectar las moléculas que pudieran estar siendo secretadas. Para ello se emplearon anticuerpos para Colágeno I y IV (Fig. 24). Cuando examinamos el colágeno I, no observamos diferencia en los diferentes tratamientos (Fig. 24, rojo); sin embargo, cuando analizamos el colágeno IV, notamos que en la condición control este se ubica intracelular y en algunos puntos de mayor intensidad (Fig. 24 A), mientras que el tratamiento con AA y DHA, induce un aumento en contenido intracelular de colágeno IV en las células U87MG y HSVT-C3 (Fig. 24 B, C, E, F). La diferencia más evidente se observa en las células RAV27 que secretan y generan una matriz de Colágeno IV (Fig. 24 H, I). Estos datos nos muestran que la vitamina C induce la expresión de

colágeno IV en las células de Glioblastoma; sin embargo, solo algunas células tienen la capacidad de secretarlo in vitro.

Para poder estimar el volumen de colágeno IV secretado por las células RAV27, se empleó el software IMARIS. La estrategia consistió en delimitar el volumen celular ocupando los canales rojo y blanco como molde, de esta manera se selecciona un ROI 3D, el cual corresponde al volumen de la célula. Posteriormente, el canal verde que corresponde a la tinción de Colágeno IV (total) se le resta el volumen celular (ROI 3D), dejando solo la marca que corresponde al colágeno extracelular. Finalmente, se genera un nuevo ROI 3D del colágeno extracelular para poder cuantificarlo (Fig. 25 A). De esta manera podemos observar que la suplementación con AA o DHA potencian la secreción de colágeno IV en las células RAV27 de Glioblastoma (Fig. 25 B, C).

En resumen, en nuestros estudios tenemos dos tipos celulares, los que biosintetizan colágeno y aumentan este proceso en respuesta a vitamina C, pero no tienen capacidad para secretarlo extracelularmente in vitro. Además, las células RAV27 que aumentan la biosíntesis de colágeno en respuesta a vitamina C y que tienen la capacidad de secretarlo.

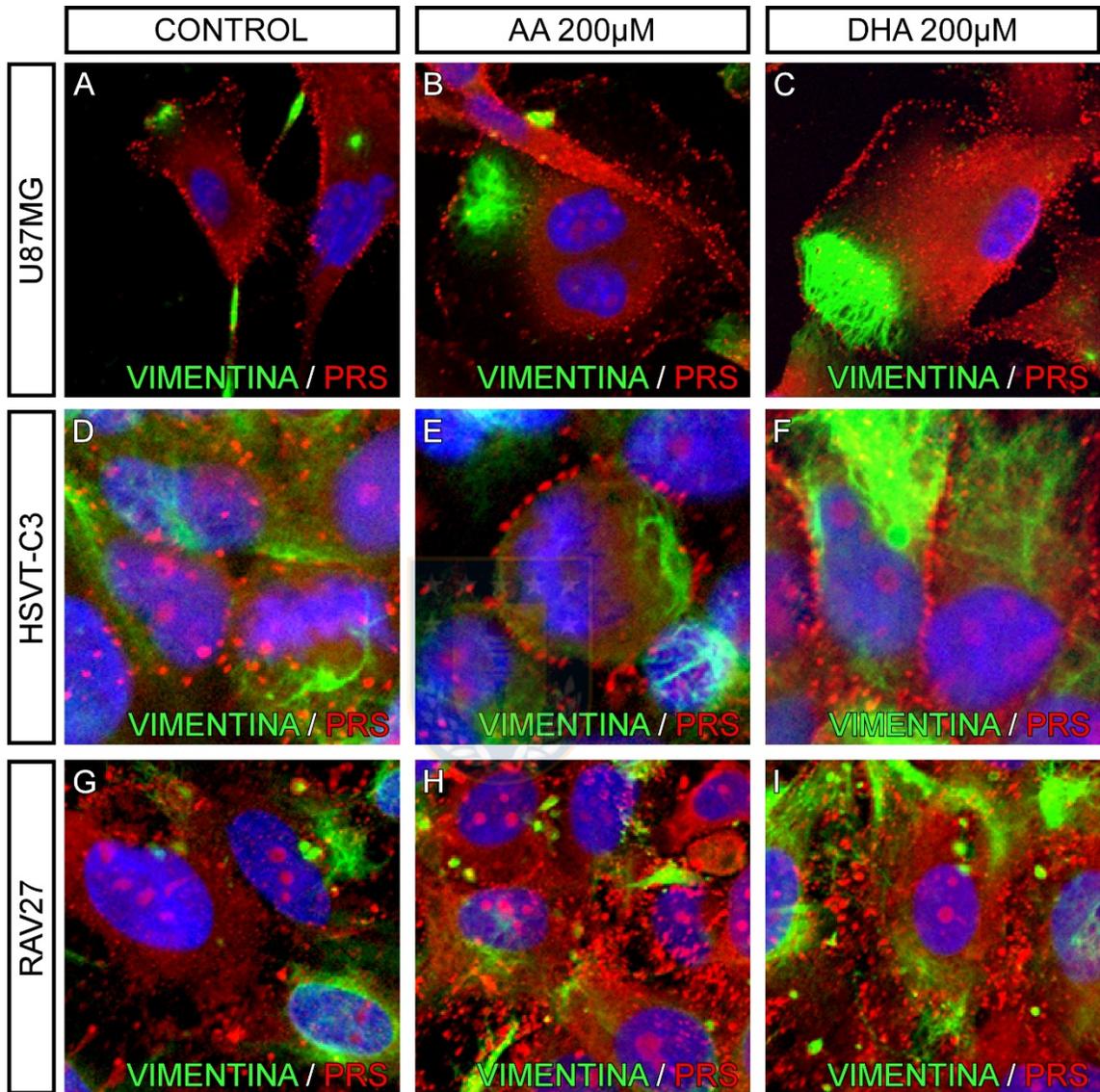


Figura 23. Efecto de la suplementación con vitamina C en la deposición de colágeno *in vitro*. Tinción con rojo Picosirius (PRS) acoplado a inmunocitoquímica para la detección de vimentina, en células U87MG (A-C), HSVT-C3 (D-F) y RAV27 (G-I). Anticuerpo: anti-vimentina (1/400). Microfotografías tomadas con aumento a 400X.

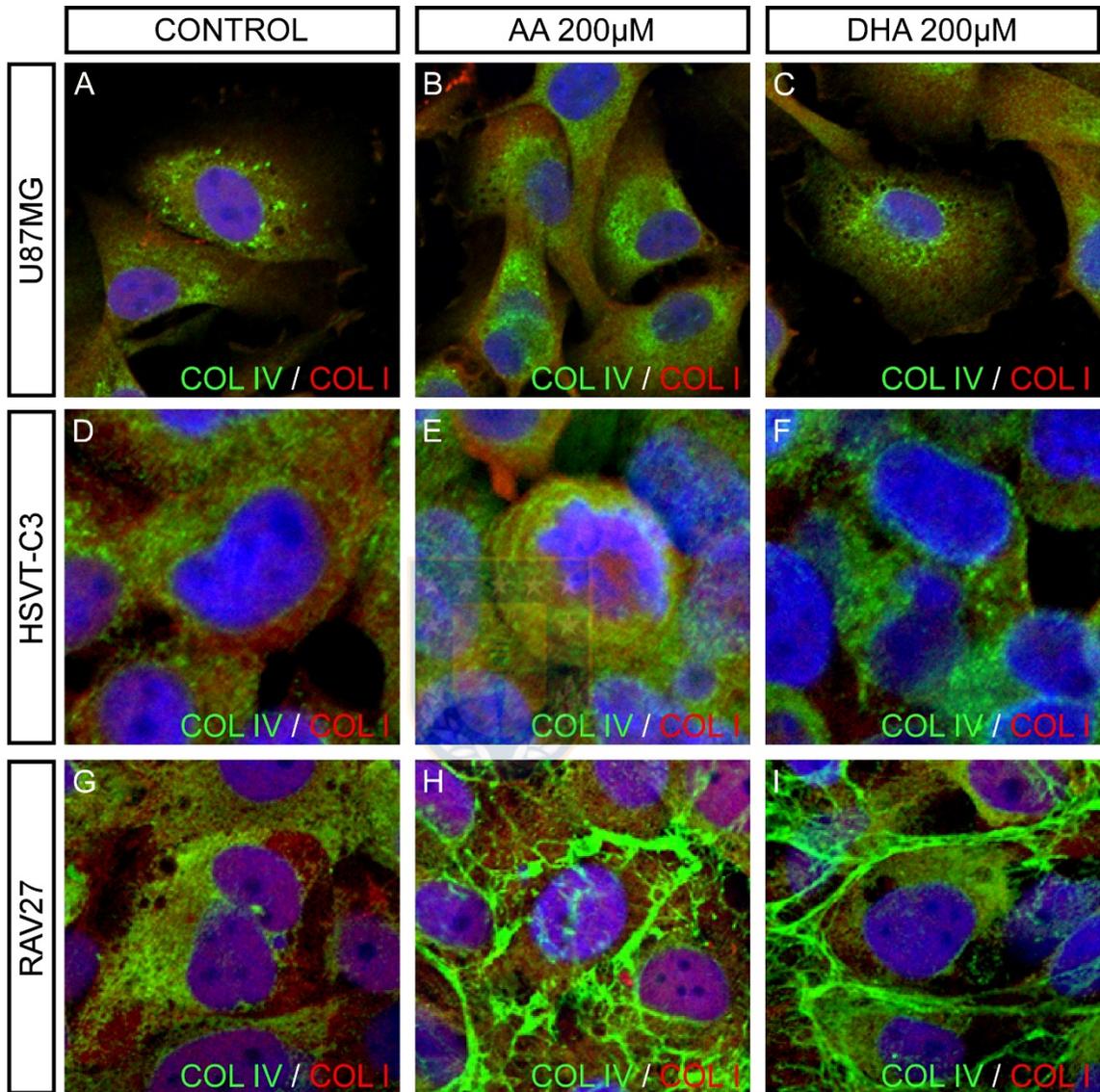


Figura 24. Efecto de la suplementación con vitamina C en la deposición *in vitro* de Colágeno I y IV. Inmunocitoquímica para la detección de colágeno I y IV en células U87MG (A-C), HSV-T-C3 (D-F) y RAV27 (G-I.). Anticuerpos: anti-colágeno I (1/50), colágeno IV (1/100). Microfotografías tomadas con aumento de 400X.

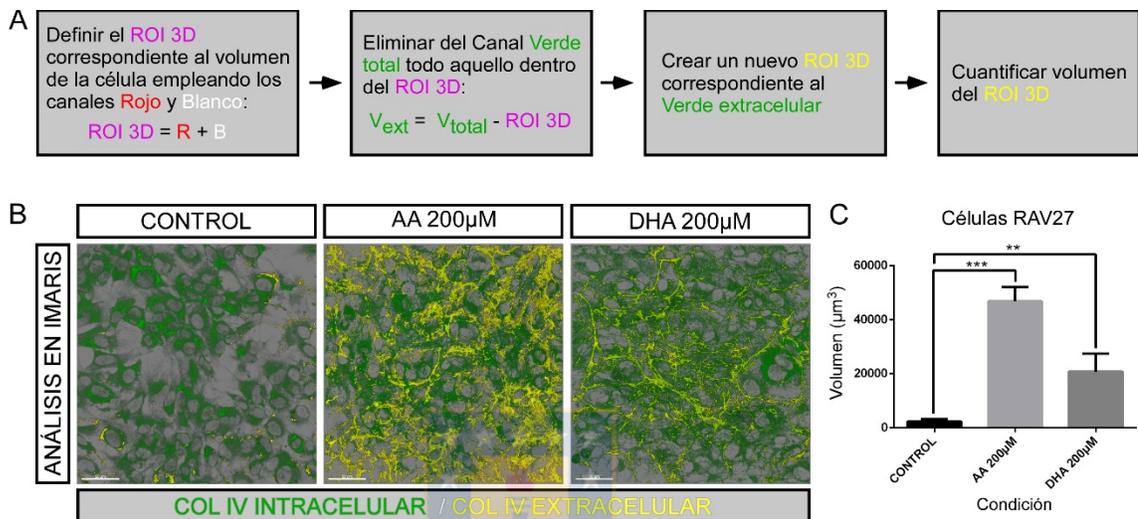


Figura 25. Análisis del volumen de colágeno IV secretado por células RAV27. Diagrama de la estrategia empleada para la cuantificación del volumen extracelular de colágeno IV (A). Inmunocitoquímica para la detección de colágeno IV intracelular (en color verde) y extracelular (color amarillo) (B). Cuantificación del volumen del colágeno IV extracelular en las células RAV27 (C). Los canales rojo y blanco (no mostrados) corresponden a las tinciones para colágeno I y VI. Anticuerpos: colágeno I (1/50), Colágeno IV (1/100) y Colágeno VI (1/50). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de t-student. Aumento de 400X.

Efecto de la Vitamina C sobre la migración de células de glioblastoma

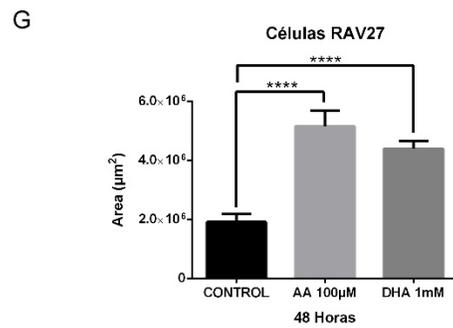
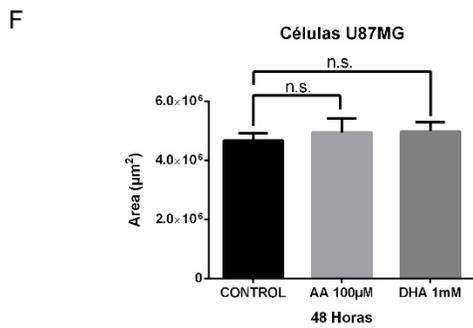
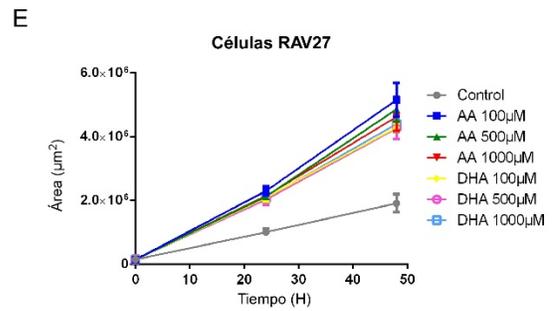
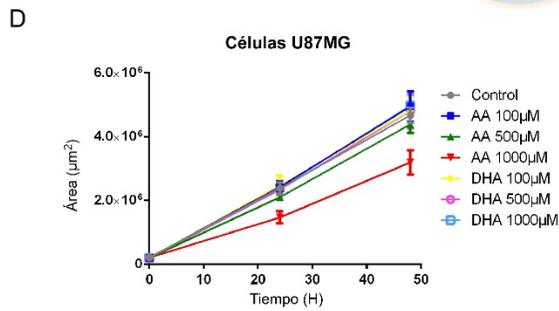
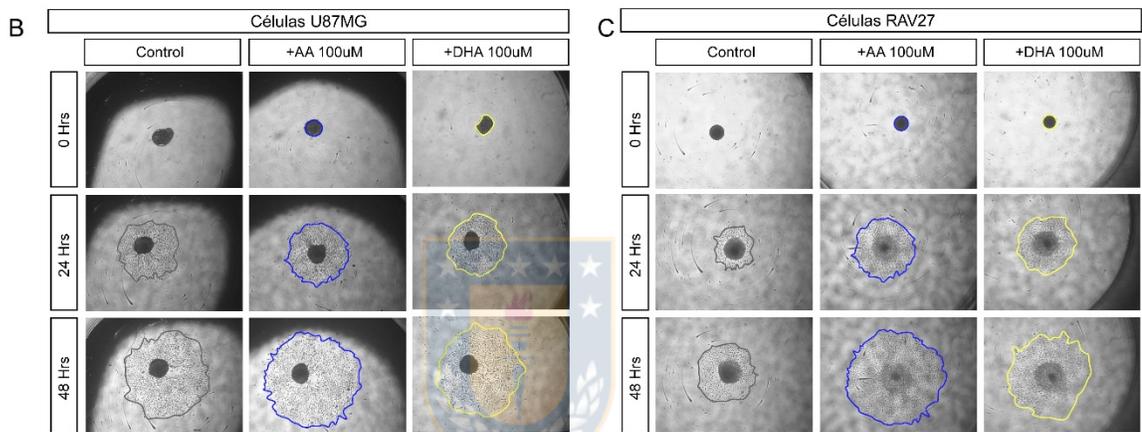
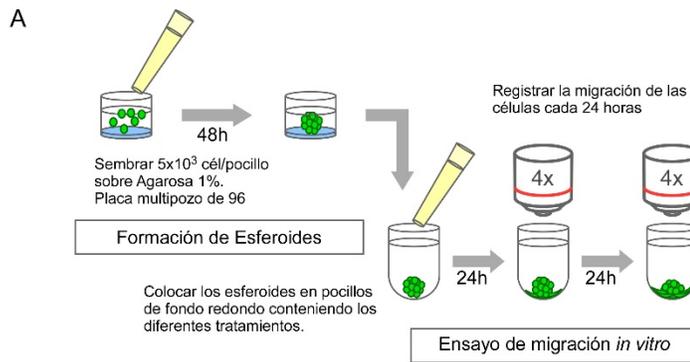
La matriz extracelular es necesaria para procesos celulares como la migración celular. Reportes anteriores han mostrado que el colágeno potencia la migración de los esferoides de glioblastoma, generados tanto de líneas celulares como de biopsias humanas. Considerando además que hemos observado que la vitamina C induce la secreción de colágeno IV, se evaluó el efecto de la suplementación de vitamina C (AA y DHA) sobre la capacidad para migrar de las células U87MG y RAV27 de glioblastoma humano. En este experimento comparamos una célula que secreta colágeno (RAV27) con una célula que no lo realiza (U87MG), bajo nuestras condiciones experimentales *in vitro*.

Para ello, se empleó el método de migración de esferoides frente a una curva de concentración de AA y DHA, que va desde los 100µM a 1mM. El ensayo consistió en sembrar células sobre agarosa con el objetivo de inducir la formación de los esferoides, 48 horas después se llevaron a una placa multipozo de 96, donde fueron sembradas con medio fresco y bajo los distintos tratamientos (Fig. 26 A). Se dio seguimiento del área que ocupan las células a las distintas concentraciones, mostrando la cobertura con una línea color azul para el AA y en amarillo para el DHA (Fig. 26 B, C). Se observó que las células U87MG no presentaron diferencias significativas en la migración con el control (Fig. 26 D, F). Mientras que la migración de las células RAV27 fue potenciada, tanto con AA como con DHA, en las distintas concentraciones evaluadas (Fig. 26 E, G). Interesantemente, cuando analizamos la concentración de vitamina C, los valores

máximos de la migración a las 48 horas, para ambos tipos celulares, fueron 100µM de AA y 1mM de DHA (Fig. 26 F, G). En las células U87MG la condición control ($4,67\pm 0,24\text{mm}^2$) no presentó diferencia con AA 100µM ($4,95\pm 0,47\text{mm}^2$) ni con DHA 1mM ($4,98\pm 0,3\text{mm}^2$); mientras que las células RAV27 en el tratamiento control ($1,91\pm 0,28\text{mm}^2$) respecto a las condiciones con AA 100µM ($5,16\pm 0,53\text{mm}^2$) y DHA 1mM ($4,4\pm 0,26\text{mm}^2$), son significativamente diferentes. De esta forma una célula que no secreta colágeno no incrementa su migración en presencia de vitamina C *in vitro*.



Figura 26. Efecto de la vitamina C en la migración *in vitro* de esferoides tumorales con células U87MG y RAV27. Esquema del ensayo de migración *in vitro* de esferoides (A). Análisis a las 0, 24 y 48 horas (B, C). Cuantificación del área que ocupan las células U87MG (D, F) y RAV27 (E, G) a los tiempos indicados. Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Aumento de 40X.



Para definir si los mecanismos de migración observados *in vitro*, se pueden reproducir en rebanadas de cerebro (experimentos *ex vivo*), se insertaron esferoides con células U87MG-GFP y RAV27-GFP en rebanadas de cerebro, tratadas con una concentración fisiológica de AA y DHA 200 μ M, adicionando cada 24 horas y renovando el medio cada 48 horas (Fig. 27 A). Nuestros resultados muestran que ambas líneas celulares incrementan significativamente su migración en presencia de AA (U87MG-GFP, 8,37 \pm 1,45mm²; RAV27-GFP 7,5 \pm 0,47mm²) y DHA (U87MG-GFP, 7,89 \pm 0,86mm²; RAV27-GFP 7,57 \pm 1,4mm²) respecto al control (U87MG-GFP, 3,97 \pm 0,57mm²; RAV27-GFP 4,59 \pm 0,35mm²) (Fig. 27 B, C). Debido a la complejidad del cultivo, se evaluó la viabilidad de los explantes a los 14 días con el método de MTT, observando que el medio control libre de vitamina C, no afecta la supervivencia de los cultivos organotípicos (Fig. Sup. 16). Se implementó un protocolo para la inmunotinción de los ensayos de migración sobre las rebanadas de cerebro de 350 μ m. Una vez establecido que la migración celular está asociada a las vainas vasculares, se evaluó la expresión de Colágeno IV y su secreción por las células tumorales. En el caso de los explantes, la expresión de Colágeno IV se observó ligeramente aumentada en el tratamiento con AA (Fig. 27 D), pero su cuantificación no fue posible. Estos datos junto a los resultados obtenidos por el ensayo de migración *in vitro*, sugieren que la vitamina C regula la migración de las células de Glioblastoma, la secreción de colágeno necesaria para la invasión. Si bien las células U87 parecen no secretar colágeno *in vitro*, si lo hacen en experimentos *ex vivo* sobre explantes de cerebro.

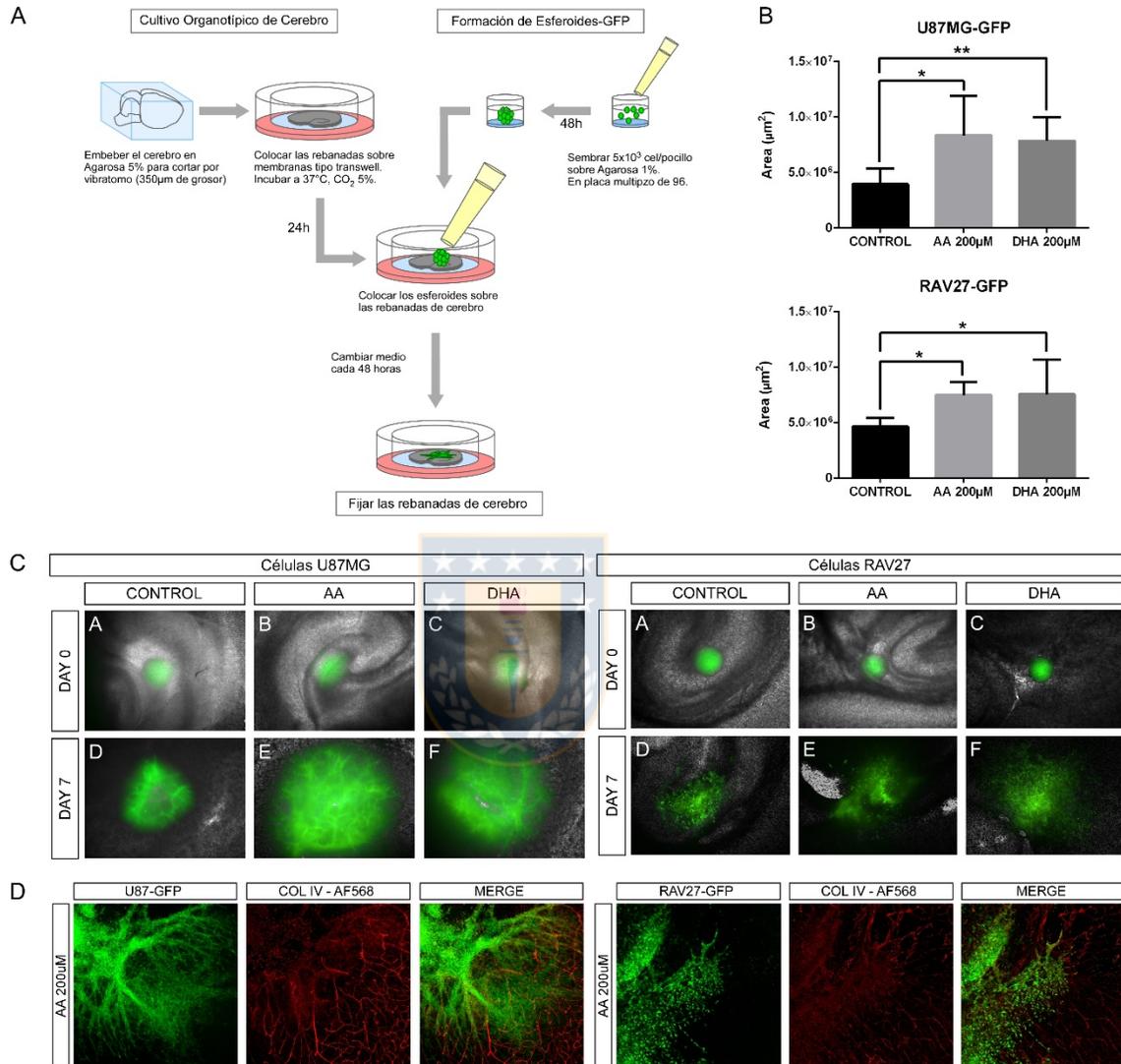


Figura 27. Efecto de la vitamina C sobre la migración de esferoides tumorales sobre cultivos organotípicos de rebanadas de cerebro. Esquema del ensayo de migración *in situ* de esferoides sobre cultivos organotípicos de rebanadas de cerebro (A). Cuantificación del área que ocupan las células U87MG y RAV27 a los 7 días (B). Las microfotografías tomadas con aumento de 40X en campo claro, en un microscopio invertido de epifluorescencia a los 0 y 7 días (C). Inmunofluorescencia para la detección de colágeno IV, a los 7 días *in vitro* en la condición de AA 200µM (D). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student.

Estudio in vivo del desarrollo y progresión del glioblastoma en cobayos

Como se observó en el capítulo anterior, la vitamina C en su forma oxidada es captada por las células de Glioblastoma. Esta molécula favorece la supervivencia de las células bajo estrés oxidativo y potencia la secreción de colágeno *in vitro*. Además, en ensayos funcionales *in vitro* y *ex vivo* observamos que incrementa la migración de las células tumorales. Es por ello que se desea conocer si la vitamina C tiene algún efecto sobre la invasión y la deposición de colágeno *in vivo*, mediante la inducción de tumores en el parénquima cerebral. Se propuso al cobayo como un animal de experimentación ideal, ya que éste es incapaz de sintetizar vitamina C, al igual que el humano.

Se estableció un modelo de xenotrasplante ortotópico en cobayo con células U87MG de Glioblastoma. Las células fueron implantadas por estereotaxia para inducir la formación tumoral a nivel del cuerpo estriado en el cerebro del cobayo. Después de 14 días, los cerebros fueron analizados por técnicas histológicas (Fig. 28 A). Los tumores inducidos en los cerebros de cobayos mostraron similitud a los glioblastomas humanos. Se pudo observar una alta celularidad respecto al parénquima cerebral y la infiltración de células mieloides con citoplasma eosinófilo (Fig. 28 C, D). Se aprecian zonas de necrosis intratumoral, similar al borde en pseudoempalizada de los glioblastomas humanos y en algunos casos con regiones necróticas extensas (Fig. 28 E, F), también la presencia de vasculatura glomeruloide, típica de tumores agresivos grado IV (Fig. 28 G). Al analizar los cortes seriados encontramos la invasión de células tumorales en el

cerebro hacia la superficie pial (Fig. 28 C) y a través de la co-optación de los vasos sanguíneos (Fig. 28 H). Estos resultados muestran que las células de Glioblastoma U87MG, son capaces de inducir tumores en el cerebro del cobayo. Además, presentan similitud al desarrollo de los tumores en humanos, al generar las estructuras secundarias características de la invasión de las células de Glioblastoma; así como la elevada progresión tumoral asociada a la necrosis y la formación de vasculatura glomeruloide.



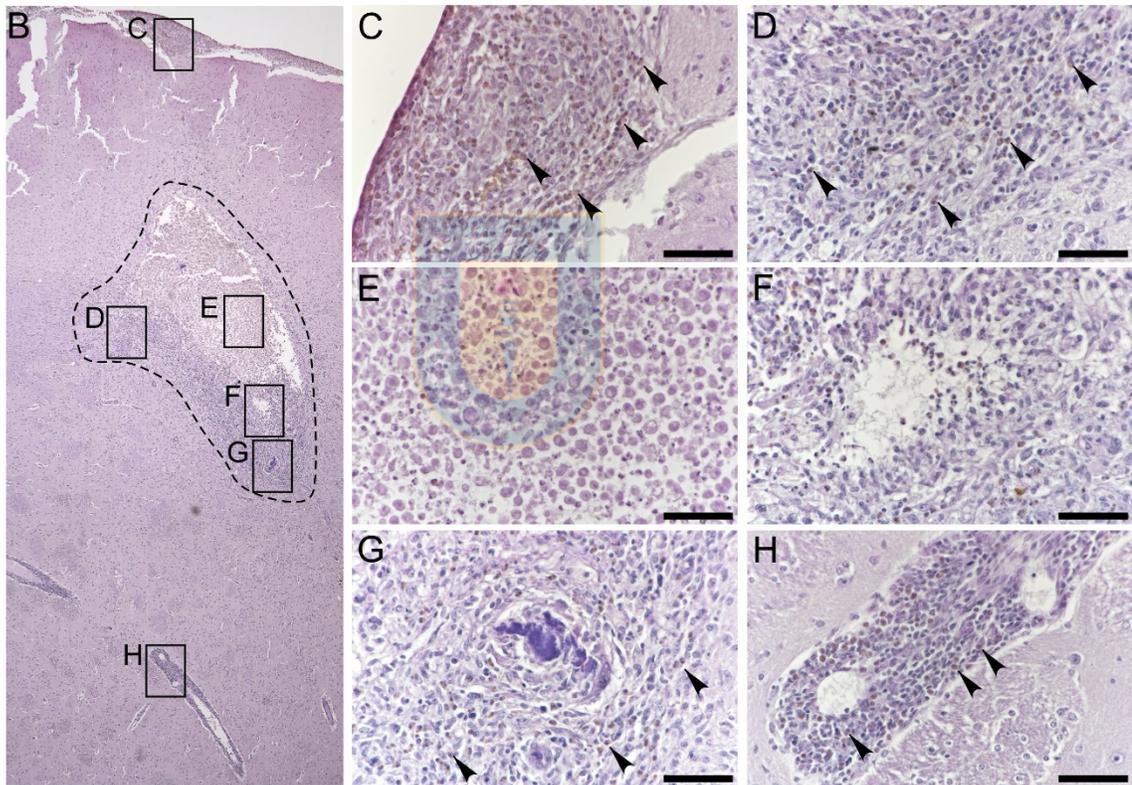
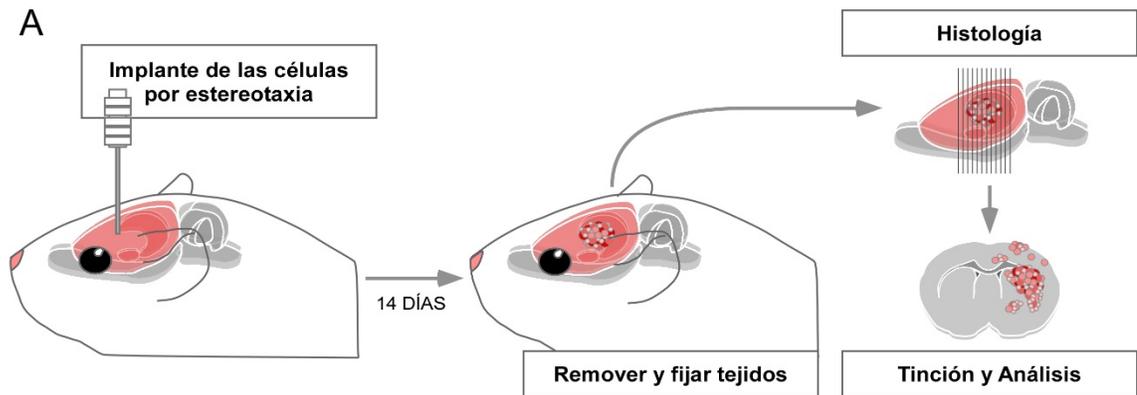


Figura 28. Modelo ortotópico de glioblastoma con células U87MG inducido en cobayo. Estrategia para el análisis *in vivo* del desarrollo del glioblastoma en cobayo (A). Hematoxilina y Eosina (H&E) de un tumor inducido en el parénquima cerebral de cobayo (B-H). El área tumoral se encuentra delimitada con línea puntada (B) y los recuadros representan las imágenes con su letra correspondiente. Se muestra la invasión en el espacio subaracnoideo (C), crecimiento tumoral (D), una zona extensa de necrosis (E), necrosis intratumoral, con células en pseudoempalizada (F), vasculatura glomeruloide (G) y co-optación de vasos sanguíneos (H). Cabezas de flecha señalan la presencia de células infiltrantes (C, D, G, H). Barras corresponden a 50 μ m (aumento 400X). Aumento menor, 40x.

Para corroborar que los tumores corresponden a glioblastomas, se analizaron algunos marcadores en las diferentes regiones del tumor; así como la invasión en el espacio pervalascular y en la región subpial. Observamos principalmente que la expresión de GFAP se localizó en el tumor, en la zona necrótica e incrementó en los bordes tanto del tumor, como de las zonas invadidas (Fig. 29 A-D). La expresión de Vimentina se encuentra disminuida en las células tumorales; sin embargo, incrementa en el borde del tumor, sugiriendo la presencia de una cicatriz glial (Fig. 29 E-H). Detectamos la presencia de células positivas a Nestina principalmente en los nichos vasculares y dentro de la masa tumoral (Fig. 29 I-L). También se encontraron células positivas a Tubulina β -III dentro del tumor, en la co-optimación de vasos y en la invasión subpial, aunque esta marca se nota reducida respecto al parénquima y la corteza cerebral (Fig. 29 M-P). Todas las regiones tumorales, excepto por la zona necrótica, mostraron un alto número de células proliferando, esto con el marcaje para PCNA (Fig. 29 Q-T). También se detectó microglía intratumoral, marcada con IBA-1 (Fig. 29 U-X). Los resultados de la histología junto a las tinciones auxiliares, permitieron confirmar que los tumores inducidos en el parénquima cerebral del cobayo corresponden a glioblastomas.

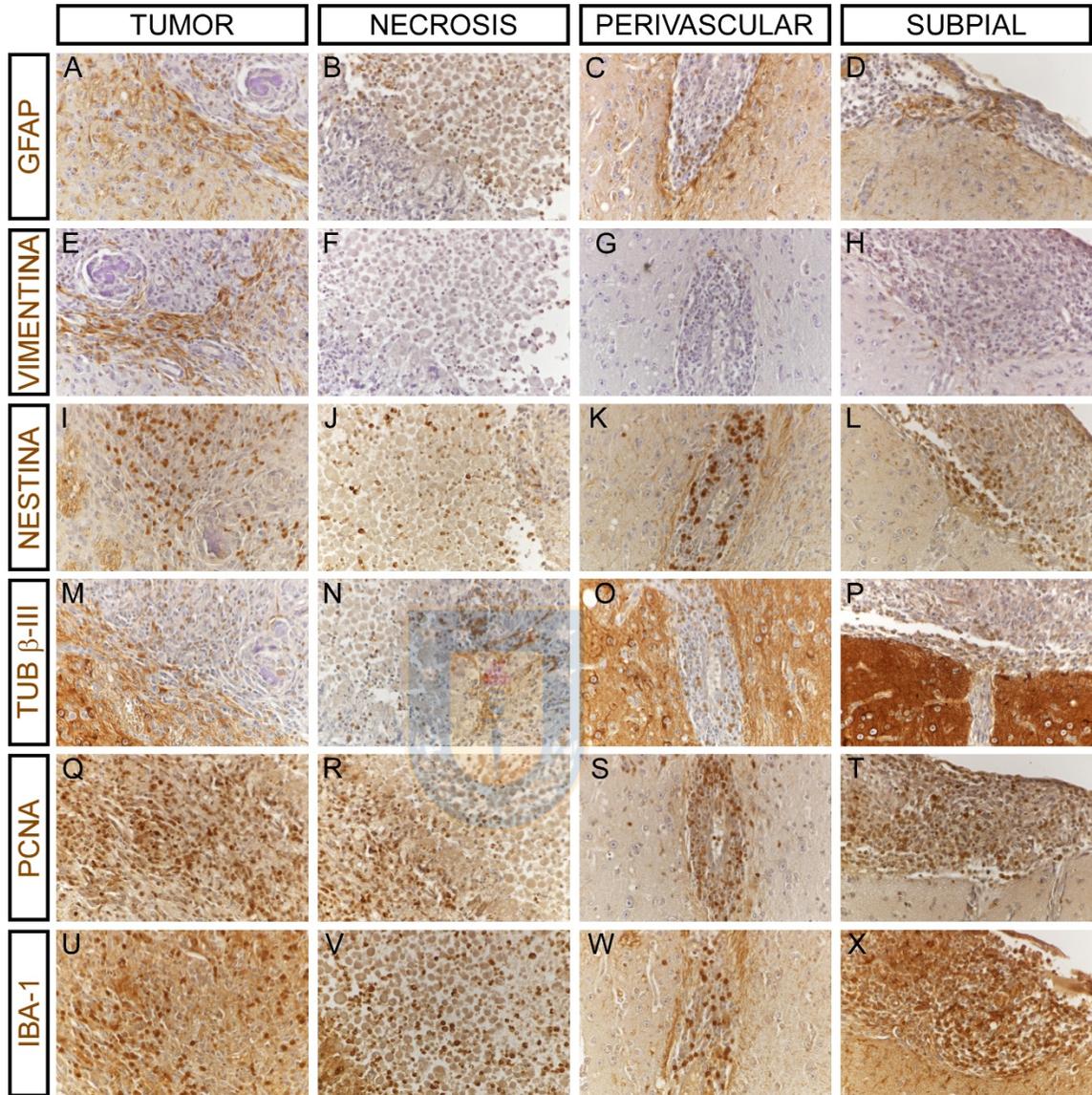


Figura 29. Marcadores asociados al glioblastoma en el modelo de xenotransplante de cobayo. Tinción por inmunohistoquímica para GFAP (A-D), Vimentina (E-H), Nestina (I-L), Tubulina β -III (M-P), PCNA (Q-T) e IBA-1 (U-X), en diferentes regiones asociadas al tumor (A, E, I, M, Q, U), zona necrótica (B, F, J, N, R, V) y en la invasión perivascular (C, G, K, O, S, W) y subpial (D, H, L, P, T, X). Anticuerpos: GFAP (1/200), Vimentina (1/20), Nestina (1/50), Tubulina β -III (1/1000), PCNA (1/200) e IBA-1 (1/100). Microfotografías tomadas con aumento 400X.

Expresión de los transportadores de vitamina C en los glioblastomas inducidos en Cobayos

El cultivo *in vitro* nos permitió definir que las células de Glioblastoma expresan GLUT1 en la membrana celular, GLUT3 y SVCT2 se localizaron intracelulares; Además presentaron un transporte funcional para la forma oxidada de la vitamina C. En las biopsias humanas observamos que GLUT1 se expresa en la membrana celular en regiones necróticas; sin embargo GLUT3 y SVCT2 permanecieron intracelulares. Por lo tanto, se deseaba determinar si el modelo *in vivo* de Glioblastoma mantiene la expresión de los transportadores para Vitamina C.

Se evaluó la expresión de GLUT1, GLUT3 y SVCT2 mediante inmunohistoquímica en diferentes zonas tumorales. Al igual que en las biopsias humanas, se evaluaron diferentes anticuerpos para la detección de SVCT2 en las distintas regiones analizadas del cerebro de cobayo; mostrando una mejor tinción el anticuerpo SC-A16 (Fig. Sup. 17). Detectamos la expresión de los tres transportadores para Vitamina C (Fig. 30). GLUT1 se localiza principalmente en la zona necrótica y en los vasos sanguíneos (Fig. 30 A, D, G, J). GLUT3 es el principal transportador de Vitamina C en el modelo *in vivo*, presentando una expresión heterogénea (Fig. 30 B, E, H, K); mientras que SVCT2 se expresa en algunas células en todas las regiones tumorales (Fig. 30 C, F, I, L). Interesantemente, SVCT2 es traslocado a la membrana celular en los nichos perinecróticos (Fig. 30 F; Fig. Sup. 18). Similar a lo que ocurre cuando las células de Glioblastoma son expuestas a H₂O₂. En conjunto, el modelo de glioblastoma

inducido en el parénquima cerebral de cobayo mantiene las características histopatológicas y más aún, la expresión de los transportadores para Vitamina C.

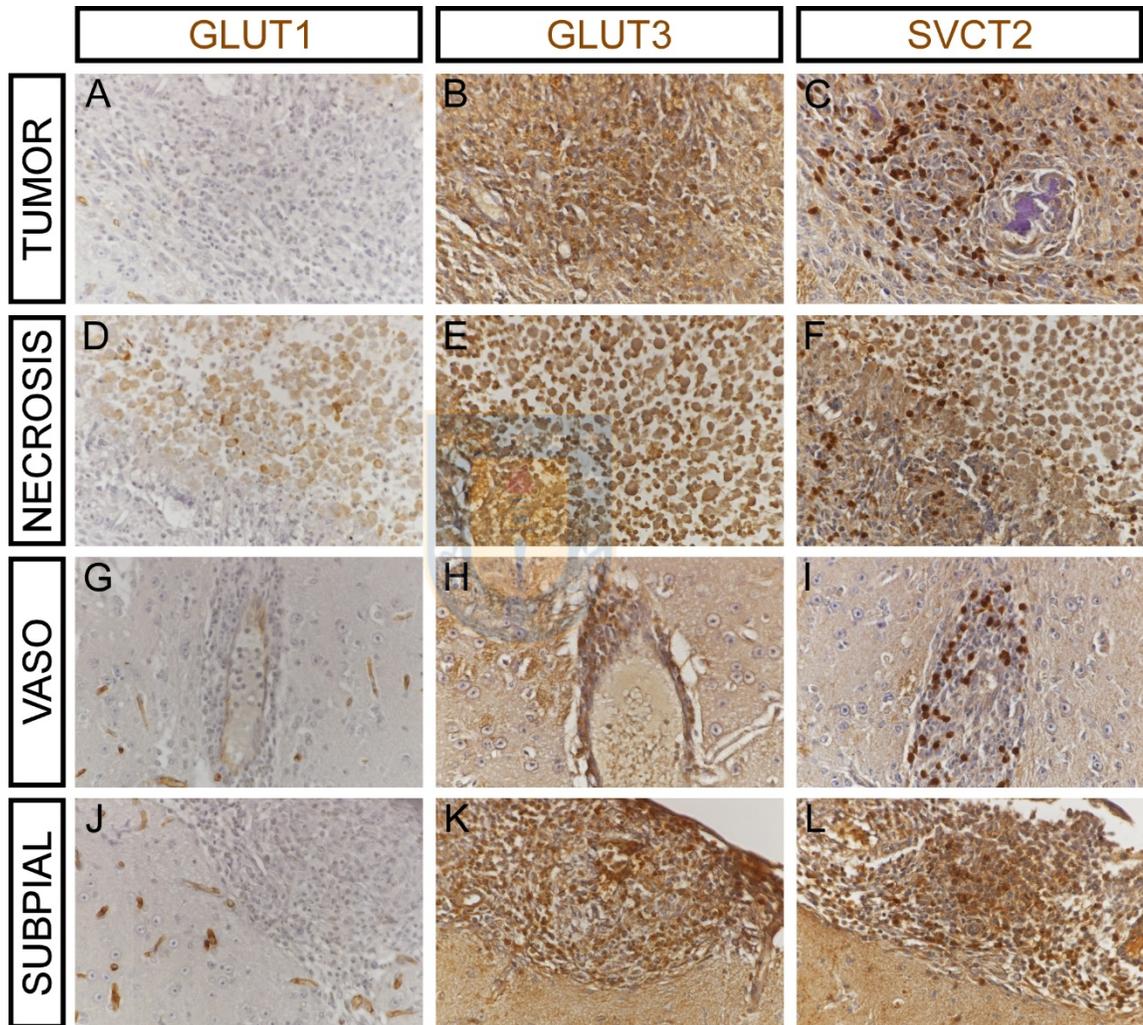


Figura 30. Expresión de transportadores de vitamina C en el modelo ortotópico de glioblastoma en cobayo. Tinción por inmunohistoquímica para GLUT1 (A, D, G, J), GLUT3 (B, E, H, K) y SVCT2 (C, F, I, L) en diferentes regiones asociadas al tumor (A-C), zona necrótica (D-F) y en la invasión perivascular (G-I) y subpial (J-L). Anticuerpos: GLUT1 (1/500), GLUT3 (1/100) y SVCT2 (1/25). Microfotografías tomadas con aumento de 400X.

Efecto del Escorbuto sobre el desarrollo y progresión de tumores inducidos en Cobayos

Al igual que los humanos, los cobayos requieren de la Vitamina C en su dieta, ya que la restricción de la misma, induce escorbuto en estos animales; llegando a ser letal después de 3 semanas. Es por ello que se desea evaluar el efecto del escorbuto sobre la inducción del Glioblastoma en el cerebro del cobayo. Para ello, se retiró la vitamina C de la dieta de los cobayos siete días antes de la implantación de las células por estereotaxia, permitiendo el desarrollo del tumor los 14 días subsiguientes.

Con el uso de la tinción de Hematoxilina y Eosina, se analizaron las características histopatológicas de los glioblastomas inducidos en 8 cobayos escorbúticos y 8 animales control. Fueron evaluadas la presencia de regiones necróticas en el tumor, la presencia de vasculatura glomeruloide y la invasión de las células tumorales en el parénquima sano, a través de la cooptación de vasos sanguíneos (Tabla 7). El análisis que se ha realizado en los tumores inducidos con células U87MG, nos permite observar que el escorbuto impacta en la progresión tumoral reduciendo la vasculatura glomeruloide; la frecuencia de necrosis intratumoral. Además se observa alterada la cooptación de vasos sanguíneos.

Tabla 7. Frecuencia de las características histopatológicas del glioblastoma en cobayos control y escorbóticos

Característica	Condición	Frecuencia	Indicador	Observaciones
Necrosis	Control	8/8	+	Se observa Necrosis de diferentes tamaños.
	Escorbótico	4/8	+	Áreas necróticas pequeñas.
Co-optación de vasos	Control	7/8	+++	Perisatelitosis vascular con muchas células.
	Escorbótico	6/8	+	Pocas células co-optando vasos.
Vasculatura Glomeruloide	Control	6/8	+	Se observa una ligera disminución de área en la v. glomeruloide durante el escorbuto.
	Escorbótico	6/8	+	

*Indicadores de tamaño: Ausente (-), Presente (+), Considerable (++), Importante (+++).



Análisis de la Progresión del Glioblastoma durante el escorbuto

Entendemos por progresión tumoral a la aparición de características histopatológicas asociadas a un grado elevado de malignidad. En el Glioblastoma, estas corresponden a la generación de zonas necróticas y la vasculatura glomeruloide, como un proceso de angiogénesis aberrante en estos tumores. En tumores periventriculares se ha observado que la deficiencia de vitamina C induce una reducción en el volumen de los vasos glomeruloides. Es por ello que nos interesamos en conocer si el escorbuto afectaba la formación de vasculatura glomeruloide en glioblastomas parenquimales.

Se analizaron las tinciones con Hematoxilina y Eosina de los tumores controles y escorbóticos mediante microscopía óptica de campo claro. La técnica histológica nos permite visualizar la vasculatura glomeruloide fácilmente, ya que se presenta

como una región hipercromática, generalmente en disposición globular (semejando a un glomérulo). Notamos que algunos de los tumores contenían más de un vaso glomeruloide; sin embargo cuando se midió el área que ocupa cada uno, observamos la condición control con $1389 \pm 153,2 \mu\text{m}^2$; mientras que el escorbuto induce una ligera reducción a $879,7 \pm 197,8 \mu\text{m}^2$ (Fig. 31). Sugiriendo la necesidad de vitamina C durante la formación microvascular glomeruloide, pensamos que esto pueda ocurrir a expensas de la deposición de colágeno.

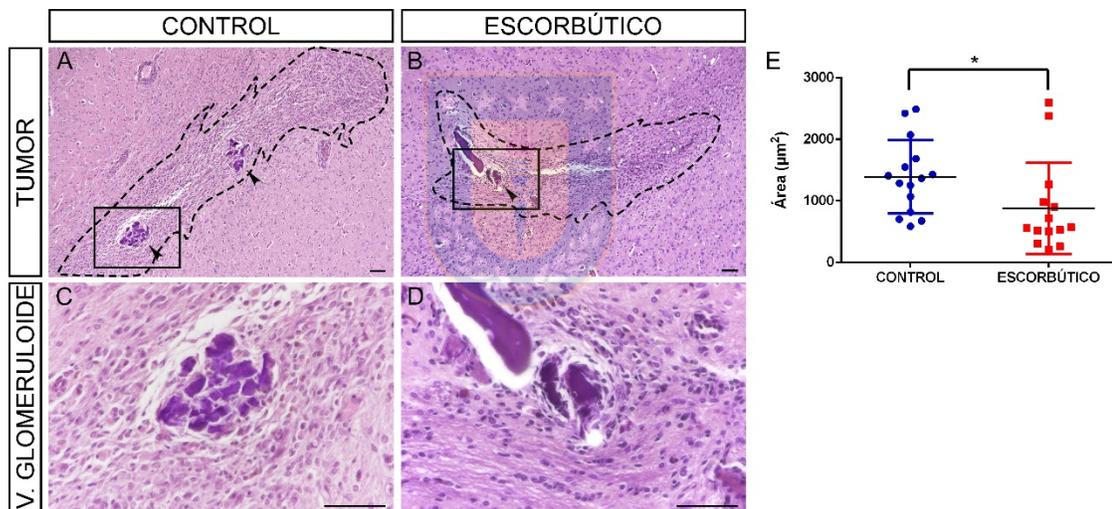


Figura 31. Efecto del escorbuto sobre la generación de vasculatura glomeruloide en tumores U87MG. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de dos tumores representativos: control (A, C) y escorbútico (B, D). Las cabezas de flecha indican la vasculatura glomeruloide que se ubica dentro del tumor marcado con línea punteada. Los recuadros en A y B corresponden a las imágenes en C y D, respectivamente. Cuantificación del área que ocupa la vasculatura glomeruloide, cada punto representa vasos individuales (E). Barras corresponden a $50 \mu\text{m}$. Menor aumento, $100\times$. Todos los datos representan la media \pm SD ($n=3$). $***p<0,001$, $**p<0,01$, $*p<0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student.

Efecto de la vitamina C sobre la co-optación de vasos sanguíneos

Previamente mostramos que la vitamina C favorece la migración *in vitro* de las células de glioblastoma. Además, en los ensayos sobre explantes se observó que la migración de las células de Glioblastoma ocurre principalmente a través de las vainas vasculares. Es por ello que se evaluó el efecto del escorbuto en este parámetro de invasión.

Se analizaron los cortes seriados de los tumores inducidos en los cerebros controles y escorbóticos. Con la ayuda de un objetivo de bajo aumento se establecieron zonas en el parénquima cerebral donde los vasos sanguíneos se encontraban co-optados. Se pudo observar que la satelitosis perivascular ocurre en ambas condiciones (Fig. 32 A-D); sin embargo, el escorbuto impacta en la morfología del vaso sanguíneo co-optado (Fig. 32C-D); reduciendo el área que ocupan las células tumorales (control $2852 \pm 433,8 \mu\text{m}^2$; escorbótico $886,2 \pm 175,4 \mu\text{m}^2$) (Fig. 32 E), el número de células (control $332,8 \pm 50,72$ células; escorbótico $109,2 \pm 21,15$ células) (Fig. 32 F) y el grosor del espacio perivascular (control $15,78 \pm 1,86 \mu\text{m}$; escorbótico $6,36 \pm 0,92 \mu\text{m}$) (Fig. 32 G).

Estos datos, junto a lo observado en los experimentos *ex vivo*, proponen que la vitamina C tiene un rol importante durante la invasión de las células de Glioblastoma en cerebro a través de la co-optación de los vasos sanguíneos, probablemente por la secreción de colágenos en el espacio perivascular.

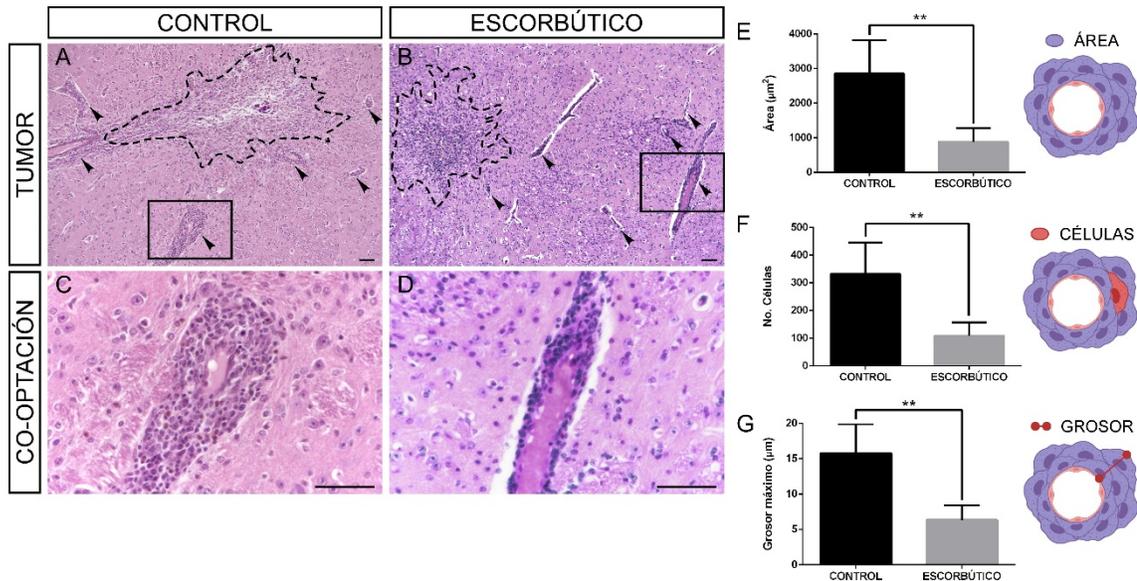


Figura 32. Efecto del escorbuto sobre la co-optación de vasos sanguíneos en tumores U87MG. Hematoxilina y Eosina (H&E) de dos tumores representativos: control (A, C) y escorbútico (B, D). Las cabezas de flecha indican la co-optimación de vasos sanguíneos en el parénquima cerebral. El tumor se marca con línea punteada. Los recuadros en A y B corresponden a las imágenes en C y D, respectivamente. Cuantificación del área que ocupan las células que invaden los vasos, sin considerar el área del lumen (E). Cuantificación del número de células por vaso co-optimado (F) y cuantificación del grosor de la invasión perivascular. Barras de aumento, corresponden a 50µm. Aumento menor, 100X. Todos los datos representan la media ± SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student.

Efecto de la Vitamina C sobre la deposición de colágeno en glioblastomas parenquimales

Los glioblastomas tienen una alta capacidad para remodelar la matriz extracelular. Depositán colágeno para la formación de nuevos vasos sanguíneos y aprovechan la matriz de colágeno IV presente en las membranas basales de los vasos sanguíneos para migrar a través de ellos. Como se ha analizado anteriormente, el escorbuto impacta en la formación de vasculatura glomeruloide y reduce la co-optación de vasos sanguíneos. Pensamos que ambos procesos están relacionados a la secreción de colágeno.

Para evaluar la deposición de colágeno, se utilizó la tinción con Rojo Picrosirius (PRS). Posteriormente se cuantificó el área que ocupa la tinción. Observamos que la tinción con PRS se asocia a la vasculatura glomeruloide y a las membranas basales de los vasos sanguíneos (Fig. 33 A-B). Al analizar tinción, notamos que durante el escorbuto hay una disminución en la densidad de fibras dentro de la masa tumoral; mientras que en la condición control se observa incrementado, lo cual correlaciona con porcentaje del área de la región de interés (control, $25,93 \pm 2,57\%$; escorbútico, $12,16 \pm 1,21\%$) (Fig. 33 C).

Estos datos muestran potentemente que la vitamina C participa en la secreción de colágeno en los glioblastomas.

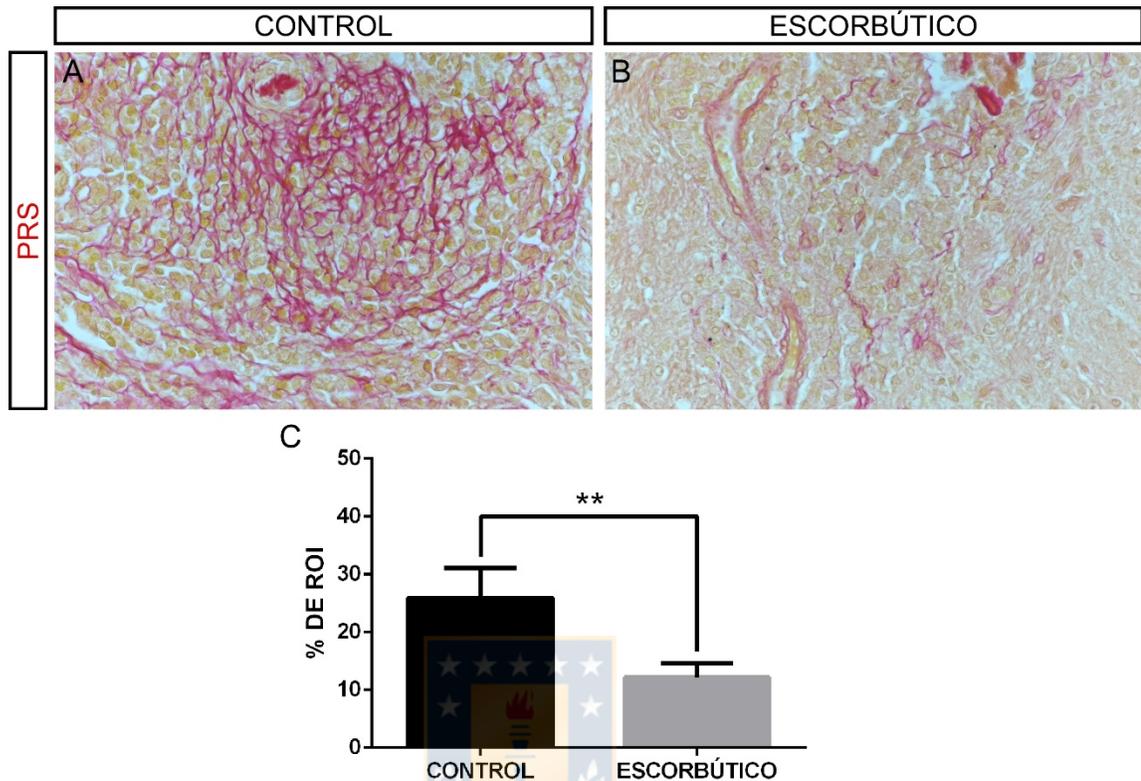


Figura 33. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágenos. Tinción con Rojo Picosirius (PRS) de dos tumores representativos: control (A) y escorbútico (B). Cuantificación del Porcentaje de la región de Interés (ROI) correspondiente a la tinción con PRS (C). Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas en campo claro con aumento de 400X.

Dado que la tinción con PRS tiñe las fibras de colágeno en la matriz extracelular y éste marcaje se ve disminuido durante el escorbuto; nos cuestionamos si es que las células de Glioblastoma tienen la capacidad de expresar y secretar colágeno *in situ*. Sabemos que los principales colágenos en los glioblastomas son el Colágeno I y IV. Por lo tanto, se decidió analizar la expresión de éstos mediante inmunofluorescencia. Se seleccionaron regiones similares en cuanto a

la expresión de otros marcadores como Nestina, SVCT2, PCNA y Vimentina en tumores controles y escurbúticos; así como en biopsias de Glioblastoma humano. Podemos notar en los tres tumores evaluados que las células de glioblastoma positivas para Nestina expresan SVCT2, al mostrar una coloración magenta (Fig. 34 D, H, L). Observamos que el patrón del colágeno I en el tumor control es similar al de la biopsia humana; sin embargo, en el tumor escurbútico la tinción para colágeno I es retenida intracelularmente (Fig. 34 A, E, I). Posteriormente, analizamos la deposición de colágeno IV y adicionalmente, evaluamos si la deposición de colágeno pudiera estar asociada al estado proliferativo del tumor; para ello empleamos PCNA y Vimentina como marcador tumoral (Fig. 35). Observamos que no existe diferencia en la proliferación de las células U87MG durante el escurbuto (Fig. 35 B, E), sin embargo, la expresión del Vimentina se ubica preferentemente en la astrogliosis que rodea al tumor en el escurbuto (Fig. 35 G). Notamos que el colágeno IV también es retenido intracelularmente durante el escurbuto; mientras que en el tumor control el patrón de la tinción es similar a la biopsia humana, marcando principalmente las membranas basales de los vasos sanguíneos (Fig. 35 A, E, I). Además, en el tumor control la deposición de colágeno IV está asociada principalmente a las células positivas para Vimentina, similar al Glioblastoma humano (Fig. 35).

En conjunto, estos resultados demuestran que la vitamina C regula la secreción de colágeno *in situ* en los glioblastomas.

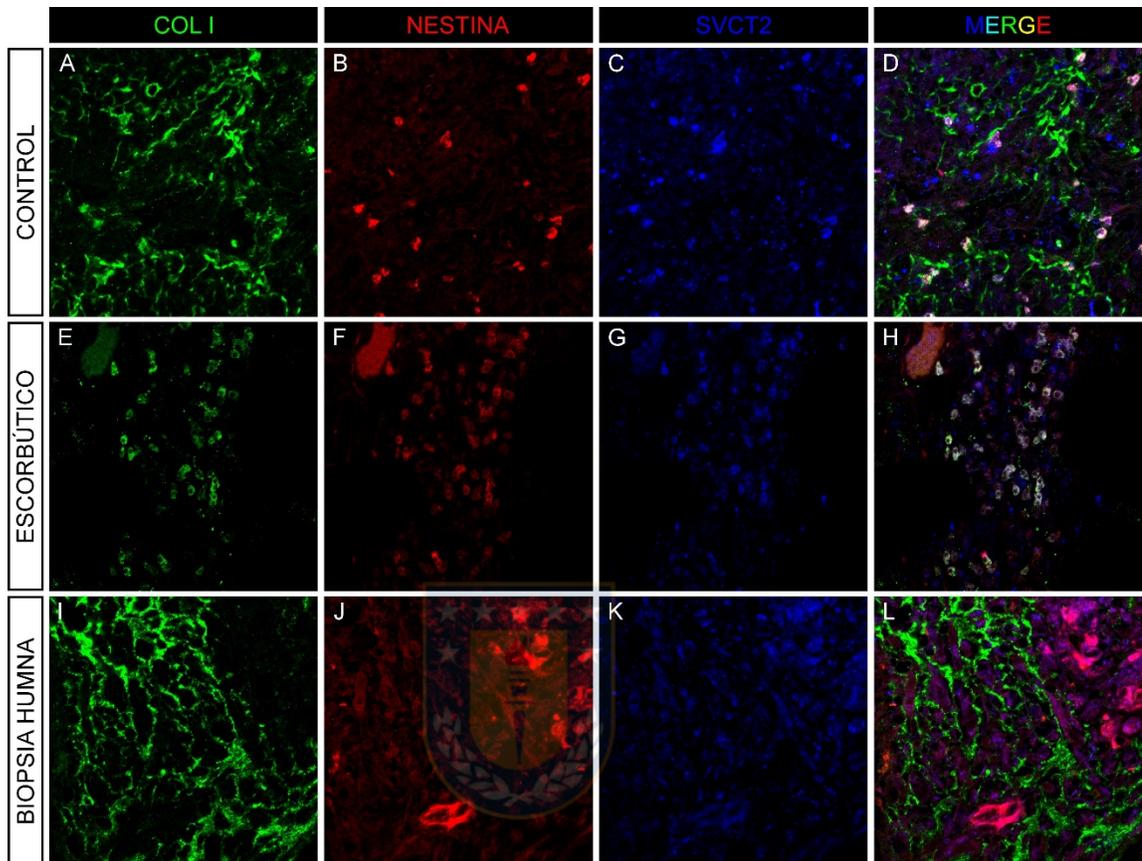


Figura 34. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágeno I en tumores inducidos en cobayo. Inmunofluorescencia para colágeno I (A, E, I), nestina (B, F, J) y SVCT2 (C, G, K) en tumores desarrollados en cobayos control (A-D), escorbúticos (E-H) y una biopsia humana de glioblastoma (I-L). Anticuerpos: COL I (1/100), Nestina (1/50) y SVCT2 (1/25). Microfotografías adquiridas con aumentos de 400X (zoom digital de 1,2).

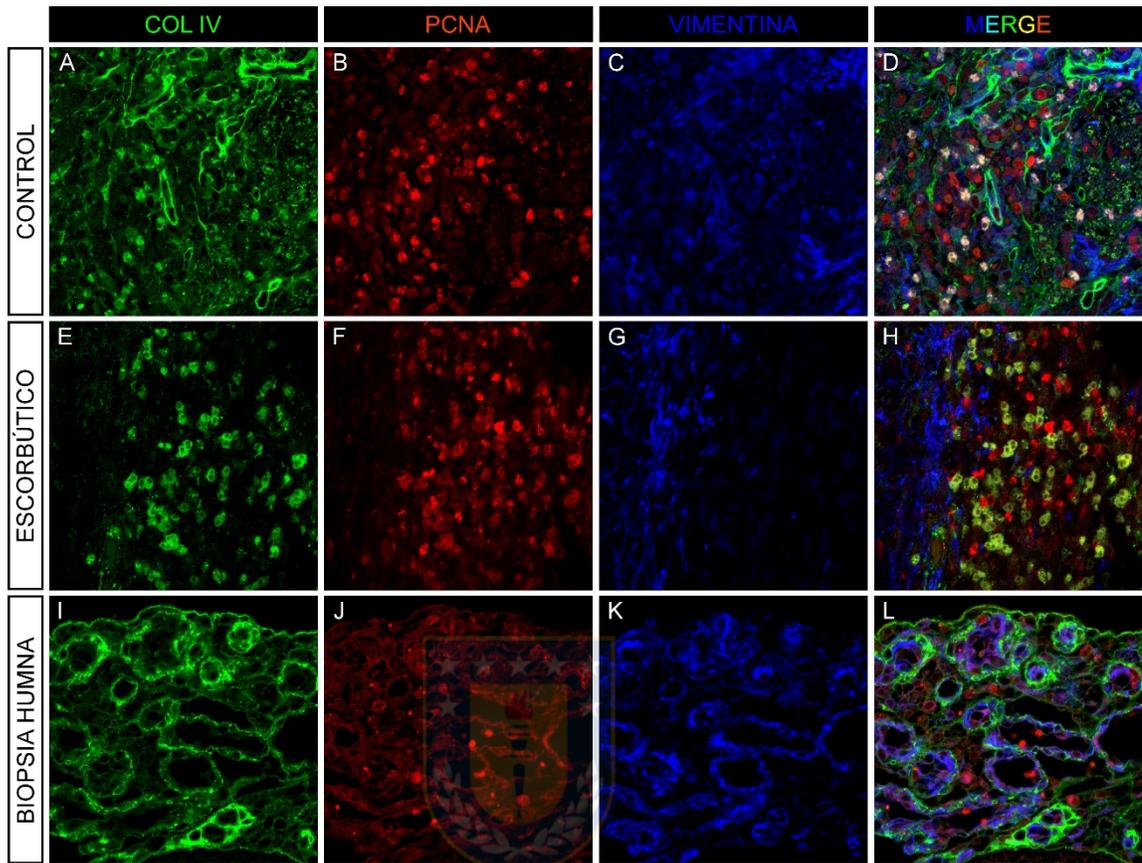


Figura 35. Efecto del escorbuto sobre la deposición de colágeno IV en tumores inducidos en cobayo. Inmunofluorescencia para Colágeno IV (A, E, I), PCNA (B, F, J) y Vimentina (C, G, K) en tumores desarrollado en cobayos control (A-D), escorbúticos (E-H) y una biopsia humana de glioblastoma (I-L). Anticuerpos: COL IV (1/100), PCNA (1/200) y Vimentina (1/400). Microfotografías adquiridas con aumento de 400X (zoom digital de 1,2).

Inducción de xenotransplante derivado de paciente en el cerebro de cobayos

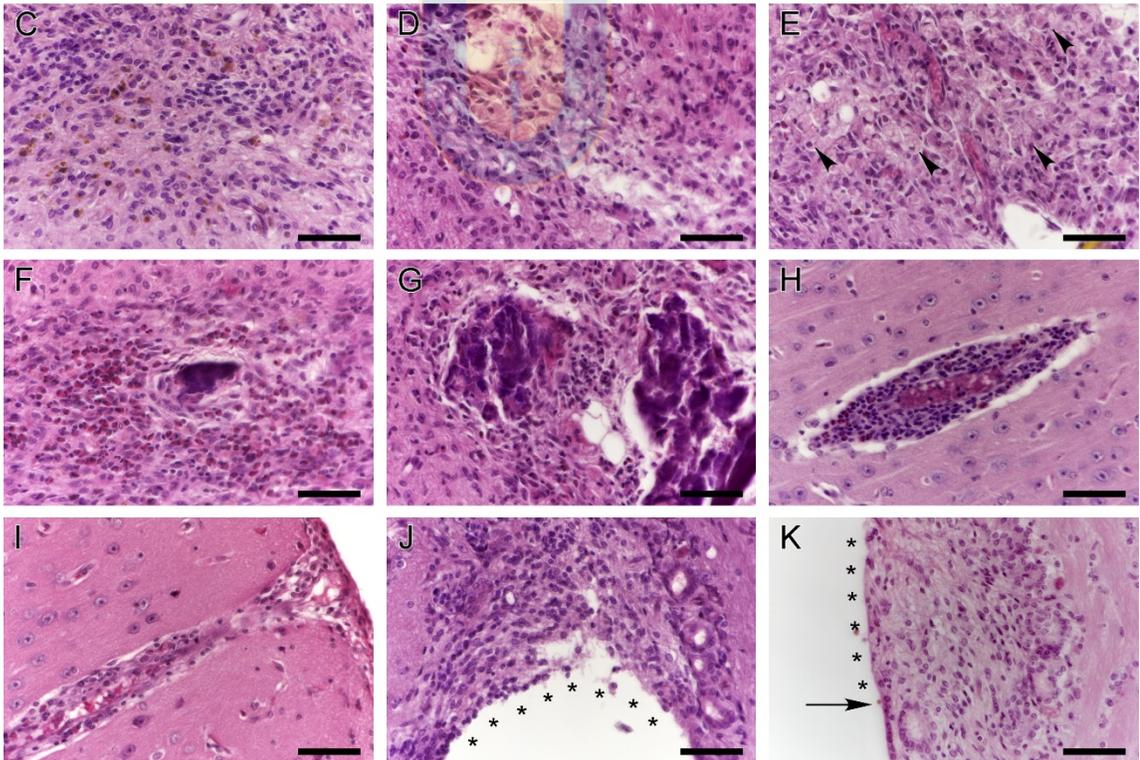
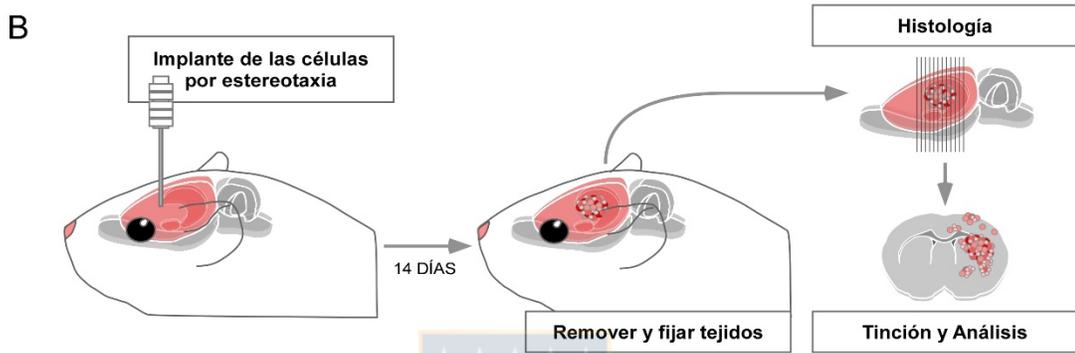
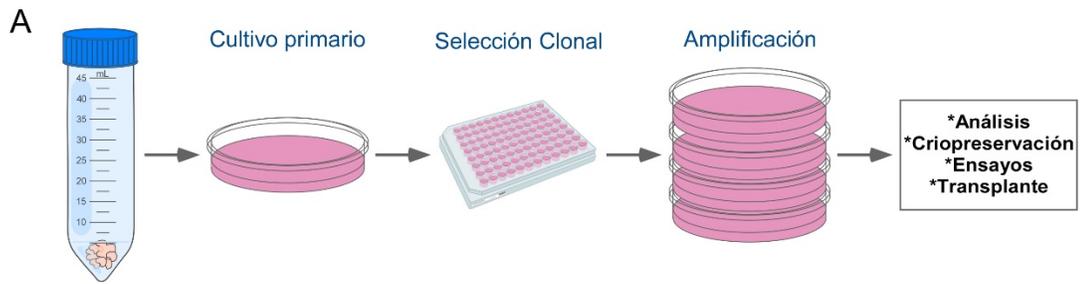
Se realizó el xenotransplante derivado de paciente (PDX) en cobayo con células HSVT-C3. Para ello, se empleó una muestra de un tumor de un paciente pediátrico diagnosticado con glioblastoma localizado en la región subventricular (Tabla 6), la pieza fue donada por el hospital regional de Concepción. Manteniéndola en PBS frío fue transportada al laboratorio donde se disgregó y se realizó el cultivo primario; posteriormente se realizó una dilución clonal con el objetivo de recuperar las células iniciadoras de tumores cerebrales (BTIC). De los 4 clones generados, el clon 3 y 4 fueron evaluados, sin embargo el clon 3 presentó mayor potencial proliferativo y una mayor expresión de Nestina (datos no mostrados). Las células fueron amplificadas y congeladas para su posterior uso (Fig. 36 A). Posteriormente, las células fueron implantadas por estereotaxia para inducir la formación tumoral a nivel del cuerpo estriado en el cerebro del cobayo. Después de 14 días, los cerebros fueron analizados por la técnica histológica (Fig. 36 B). Similar a los tumores inducidos con células U87MG, los tumores HSVCT-C3 presentaron similitud con las características histopatológicas de los glioblastomas humanos (Fig 36 C-K). Los tumores parenquimales inducidos con células HSVT-C3 mostraron una alta celularidad, núcleos hipercromáticos y atipia celular (Fig. 36 C), se aprecian zonas de necrosis intratumoral (Fig. 36 D), zonas gemistocíticas (Fig. 36 E), infiltración microglial, distinguida por marcada tinción eosinófila (Fig. 36 F); y también se observó la

presencia de vasculatura glomeruloide, (Fig. 36 F, G). Notamos la invasión a través de los vasos sanguíneos (Fig. 36 H) y mediante la co-optación vascular se invade la superficie pial (Fig. 36 I). Interesantemente, estos tumores mostraron una alta invasión hacia la región subventricular (SVZ), induciendo la formación de estructuras tipo roseta y la denudación del epéndimo (Fig. 36 J, K).

Estos resultados muestran que las células de Glioblastoma HSVT-C3, son capaces de inducir tumores en el cerebro del cobayo mostrando similitud al desarrollo de los tumores en humanos, y más aún, recapitulando la localización del tumor de origen.



Figura 36. Modelo de xenotransplante ortotópico derivado de paciente, inducido en cobayo. Las células del paciente fueron obtenidas por la disgregación y la selección clonal, para posteriormente amplificar la población y ser analizadas, congeladas o transplantadas (A). Estrategia para el análisis *in vivo* del desarrollo del glioblastoma en cobayo (B). Hematoxilina y Eosina (H&E) de un tumores inducidos en el parénquima cerebral del cobayo (C-K). Se muestra una zona del tumor (C) y necrosis intratumoral (D) zonas gemistocíticas (E). Infiltración microglial (F) y vasculatura glomeruloide (G). Co-optación de vasos sanguíneos (H) e invasión a la superficie pial (I) y a la zona subventricular (J, K). Cabezas de flecha señalan la presencia de gemistocitos (E); la flecha en (K) muestra el punto donde se pierde el epéndimo y los asteriscos (*) muestran la zona denudada (J, K). Barras corresponden a 50µm.



Efecto del escorbuto sobre el desarrollo y progresión de tumores con células HSVT-C3 inducidos en Cobayos

Con el uso de la tinción de Hematoxilina y Eosina, se analizaron las características histopatológicas de los glioblastomas inducidos en 5 cobayos control y 2 animales escorbúticos. Fueron evaluadas la presencia de regiones necróticas en el tumor, la presencia de vasculatura glomeruloide y la invasión de las células tumorales en el parénquima sano, a través de la co-optimación de vasos sanguíneos, así como la invasión hacia los ventrículos (Fig. 37, Tabla 8).

Las tinciones con Hematoxilina y Eosina no permitieron observar que durante el escorbuto se ve comprometida la vasculatura glomeruloide, puesto que en las muestra analizadas no se detectó (Fig. 36 G; 37 A, B), mientras que en la condición control, los tumores con células HSVT-C3 generaron vasculatura glomeruloide de gran tamaño (Fig. 37 A). Cuando analizamos la invasión del parénquima cerebral, notamos al igual que los tumores con células U87MG, que el escorbuto reduce la capacidad de las células de Glioblastoma para invadir el espacio perivascular (Fig. 37 C, D). Sin embargo, la mayoría de tumores con células HSVT-C3 invadieron el interior de los ventrículos, los plexos coroideos (Fig 37 E) o en la región subventricular (Fig. 37 F). Estos resultados junto a los obtenidos con tumores U87MG, sugieren que la vitamina C posee un rol funcional en el desarrollo y progresión del Glioblastoma.

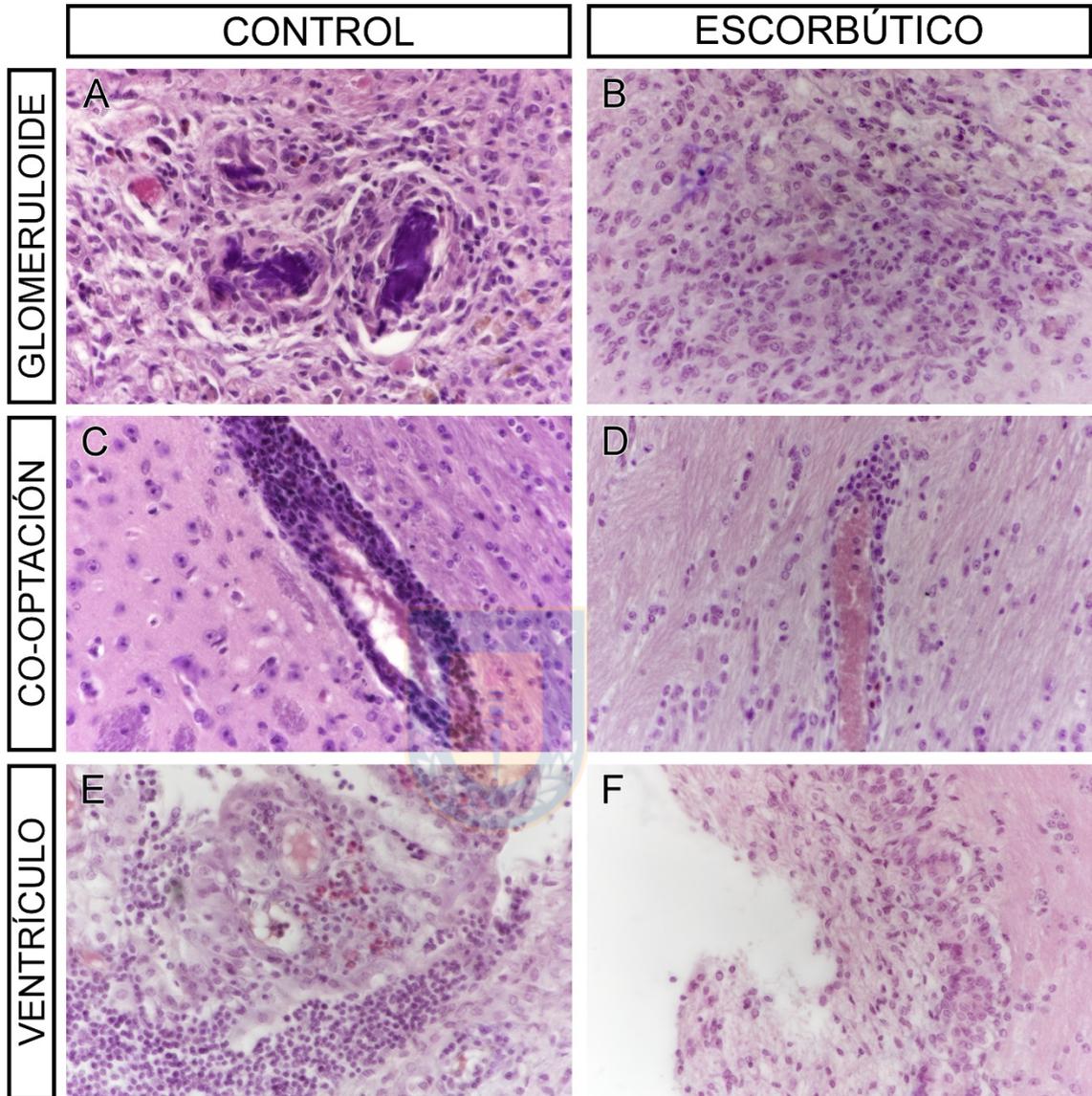


Figura 37. Efecto del escorbuto sobre la generación de vasculatura glomeruloide e invasión de tumores HSVT-C3. Tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de dos tumores representativos: control (A, C, E) y escorbútico (B, D, F), de la vasculatura glomeruloide (A, B), la co-optación vascular (C, D) y la invasión en los ventrículos (E, F). Microfotografías tomadas con aumento 400X.

Tabla 8. Frecuencia de las características histopatológicas de glioblastomas con células HSVT-C3 en cobayos control y escorbúticos

Característica	Condición	Frecuencia	Indicador	Observaciones
Necrosis	Control	3/5	+	Se observan zonas necróticas pequeñas.
	Escorbútico	0/2	-	No se observaron áreas necróticas
Co-optación de vasos	Control	4/5	+++	Perisatelitosis vascular con muchas células.
	Escorbútico	2/2	+	Pocas células co-optando vasos.
Vasculatura Glomeruloide	Control	4/5	+++	No se observó v. glomeruloide en los tumores escorbúticos.
	Escorbútico	0/2	-	
Invasión hacia el Ventrículo	Control	4/5	++	Invasión en la SVZ, hacia el ventrículo y en los plexos coroideos.
	Escorbútico	1/2	+	Invasión de la SVZ.

*Indicadores de tamaño: Ausente (-), Presente (+), Considerable (++), Importante (+++).



Análisis tridimensional de la Invasión de las células de glioblastoma

Para tener una mejor aproximación de la invasión de los tumores a través del parénquima cerebral, pensamos que es fundamental desarrollar estudios tridimensionales que abarque un amplio volumen del tejido. Se estandarizó la técnica de CLARITY, que permite transparentar los tejidos para definir su estructura tridimensional a nivel de milímetros de profundidad. De esta forma, se deseaba determinar si la técnica nos permite evaluar la invasión de las células de glioblastoma en un animal inmunocompetente. Para responder a esta pregunta, se estandarizó el procedimiento utilizando cerebros de rata y ratón. En una primera etapa establecimos el procedimiento en un corte de 3 mm de grosor

de cerebro de rata postnatal, en el cual se evaluó la tinción de un marcador glial (GFAP), de esta manera observamos diferencias en la estructura de las redes astrocíticas, y probamos la penetración de los objetivos con microscopía confocal (Fig. sup. 19, 20). Debido a que las células de glioblastoma emplean estructuras establecidas durante la invasión, como los vasos sanguíneos, evaluamos la tinción de los mismos con GLUT1 en un corte de cerebro de rata de 2mm de grosor (Fig. sup. 21). Pensamos que un buen modelo para el estudio de la interacción de los astrocitos con la vasculatura es en la barrera hematoencefálica (BBB), analizamos la capacidad de la técnica para definir la BBB con la tinción para GFAP, comparando un cerebro postnatal y uno envejecido en un modelo de ratón con deterioro cognitivo asociado al envejecimiento SAMP8 (Fig. sup. 22). En conjunto, mostramos en distintos contextos y especies, la factibilidad de la técnica para su estudio por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Adicionalmente, nos preguntamos si el procedimiento permite mantener la fluorescencia, ya que idealmente, para evaluar la invasión de las células de glioblastoma se emplearían células que expresen una proteína fluorescente. Para contestar esa pregunta, se inyectaron adenovirus para inducir la expresión de la EGFP en el cerebro postnatal de rata, donde confirmamos que las proteínas mantienen su fluorescencia (Fig. sup. 23).

Para estudiar la invasión de las células de glioblastoma, se emplearon cerebros de rata, en los que se implantaron por estereotaxia células U87MG-GFP. Después de 14 días, las ratas fueron anestesiadas y perfundidas con Hidrogel,

para posteriormente hacer CLARITY (Fig. 38 A). Los cortes de cerebro fueron analizados mediante un microscopio “Light-sheet” optimizado para CLARITY (COLM). Al analizar un plano focal, notamos la tinción para GFP en la masa tumoral en el cuerpo calloso y por encima del cuerpo estriado. También notamos algunos puntos distribuidos en la corteza y el cuerpo estriado y el borde en la superficie pial (Fig. 38 B); sin embargo cuando se realiza la reconstrucción tridimensional, notamos que el volumen del tumor es aún mayor y que las células U87MG-GFP llegan al ventrículo lateral, migran hacia la parte inferior co-optando los vasos sanguíneos mayores e invadiendo al superficie pial (Fig. 38 C).



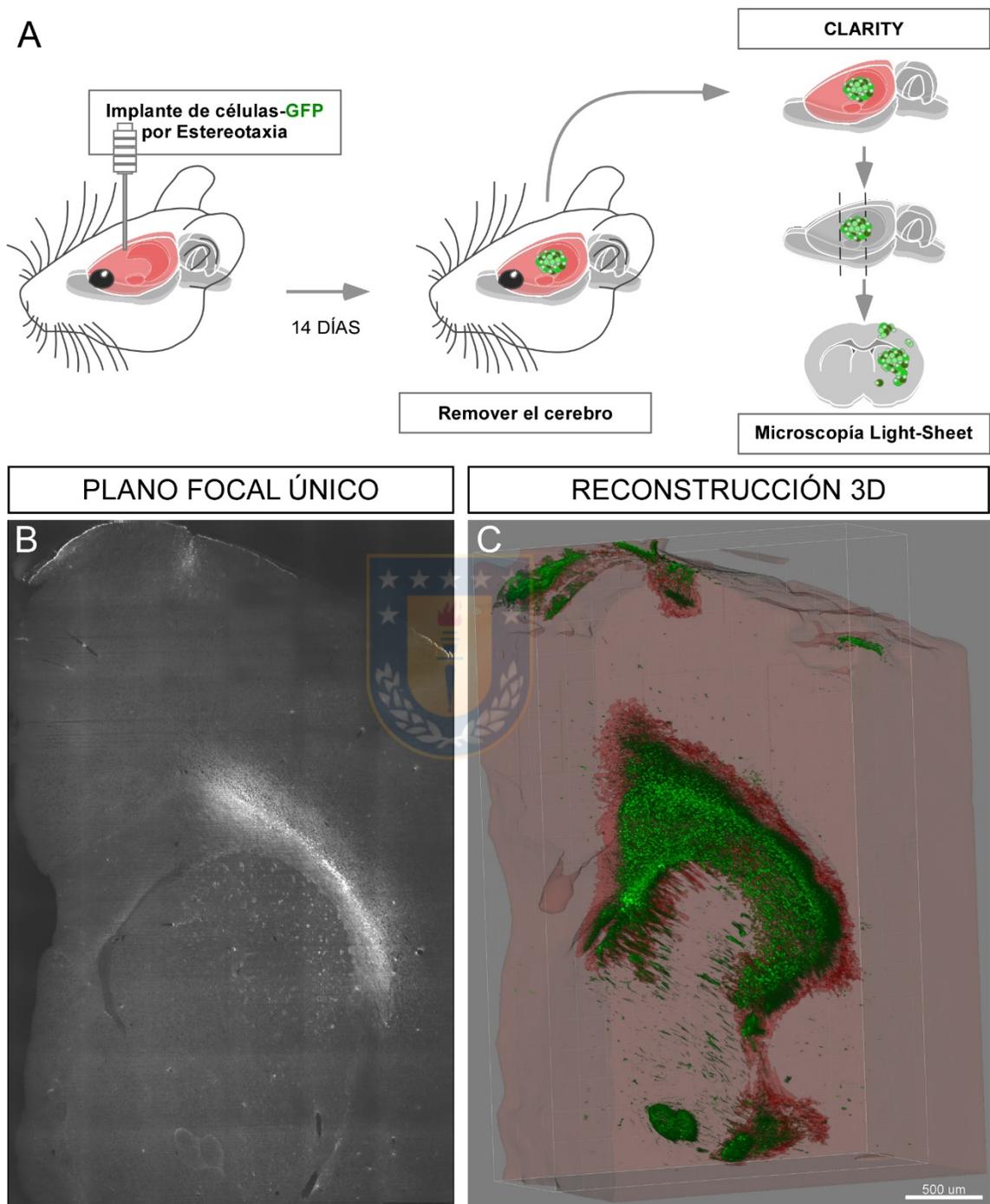


Figura 38. Análisis de la invasión de las células de glioblastoma mediante CLARITY. Esquema de la estrategia para el seguimiento de las células de Glioblastoma en el cerebro de rata (A). Microfotografía adquirida con aumento de 400X en *tile scan* mediante un micorscopio light-sheet, optimizado para CLARITY (B, C). Representación de un solo plano focal (B) y la reconstrucción tridimensional empleando el software IMARIS (C).

XIV. DISCUSIÓN

Glioblastomas Humanos expresan transportadores para Vitamina C

Muchos tipos de cáncer sobre-expresan transportadores de glucosa, así como un patrón anormal de la expresión de otras isoformas que no se encuentran en el tejido sano de origen (Barron et al., 2016, Godoy et al., 2006). Se ha considerado que esto está asociado al metabolismo de las células tumorales; tal como lo describió, Otto Warburg hace 100 años, con la observación de que las células cancerosas se vuelven menos dependientes de la fosforilación oxidativa y en su lugar, adoptan un metabolismo anaeróbico para generar ATP, así como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Por lo tanto, el requerimiento de glucosa en el tumor respecto al tejido sano, es mayor. Sin embargo, sabemos que los GLUTs, no solo transportan glucosa, sino otros sustratos, para los cuales tienen una mayor afinidad, como la forma oxidada de la Vitamina C, el DHA (Rumsey et al., 1997). Además, cada vez existe más evidencia y mayor aceptación de que las células tumorales captan DHA generado localmente a través del *efecto bystander* (Chen et al., 2008, Ferrada et al., 2019, Ngo et al., 2019, Nualart et al., 2003, Ulloa et al., 2013).

En el cerebro, un órgano metabólicamente demandante, se observa una alta expresión de GLUT3 en las neuronas; la expresión de GLUT1 se ubica en el endotelio vascular, en los plexos coroideos, el epéndimo y los astrocitos (Simpson et al., 2007). Interesantemente, los glioblastomas son tumores que

sobre-expresan ambos transportadores, GLUT1 y GLUT3 (Nishioka et al., 1992, Nagamatsu et al., 1993, Flavahan et al., 2013, Komaki et al., 2019).

En el presente trabajo mostramos que los tumores humanos, cuyas características histopatológicas corresponden a glioblastomas, expresan los transportadores para la Vitamina C oxidada (GLUT1, GLUT3) y reducida (SVCT2). Notamos que la expresión y localización de GLUT1 se encuentra preferencialmente en las regiones necróticas y se corrobora con estudios previos (Nishioka et al., 1992). Mediante hibridación *in situ*, GLUT1 presentó mayor expresión en glioblastomas que en astrocitomas. Fue ubicado principalmente en zonas necróticas (en las células en pseudoempalizada), perivascular y en el endotelio del tejido sano; mientras que en los vasos tumorales con proliferación endotelial (vasculatura glomeruloide) su expresión fue baja (Nishioka et al., 1992). Dos grupos más llegaron a las mismas conclusiones, empleando PCR e hibridación *in situ* (Nagamatsu et al., 1993, Boado et al., 1994). En inmunotinciones para evaluar la localización de GLUT1 en microarreglos de tejidos de diferentes tipos de cáncer, GLUT1 fue asociado a regiones necróticas y perinecroticas de tumores agresivos (glioblastomas, colon y pulmón). En glioblastomas fueron positivos solo el 38% de biopsias (14/37) (Airley et al., 2010). Sin embargo, mediante inmunohistoquímica e hibridación *in situ* (RNAScope), se observó la expresión de GLUT1 en las membranas plasmáticas de células en pseudoempalizada y en zonas perivasculares del 100% de glioblastomas analizados (52 muestras). El 30,8% de las muestras mostró tinción muy fuerte y

se asoció a una baja supervivencia del paciente, mientras que aquellas que mostraron una baja expresión de GLUT1, tuvieron mejor pronóstico. Además, se notó la co-localización de GLUT1 con el factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF1) en las células en pseudoempalizada (Komaki et al., 2019). En este sentido, es bien conocido que el gen de GLUT1 contiene elementos de respuesta para HIF1, induciendo su expresión en condiciones de hipoxia (Ebert et al., 1995). Además, se ha observado que en zonas perinecroticas con células en pseudoempalizada, HIF1 regula la expresión de GLUT1 y favorece la autorenovación de las GSCs positivas a CD133, Sox2 y CD44, en estos nichos (Inukai et al., 2015).

En las biopsias humanas, detectamos la expresión de GLUT3 principalmente intracelular, distribuido de manera heterogénea en el tumor. Se ha propuesto como el principal transportador de glucosa de los glioblastomas, ya que varios grupos han mostrado que el 100% de los gliomas lo expresan (Nishioka et al., 1992, Nagamatsu et al., 1992, Boado et al., 1994). Interesantemente, se observó una mayor expresión en los nichos perinecroticos y perivasculares, así como en regiones gemistocíticas (Nishioka et al., 1992, Nagamatsu et al., 1993). Además, la expresión de GLUT3 en los gliomas, incrementa con el grado de malignidad; es decir, oligodendrogliomas y astrocitomas, presentan una menor expresión de mRNAs de GLUT3, con respecto a los glioblastomas. Adicionalmente, en los glioblastomas, la expresión de GLUT3 se asocia con la reducción de la supervivencia del paciente, por lo que los autores sugieren a GLUT3 como un marcador de GSCs, al mostrar una captación funcional de glucosa en las células iniciadoras

del tumor (BTIC) y como un posible blanco terapéutico (Flavahan et al., 2013). En ese sentido, se ha propuesto que los subtipos de Glioblastoma proneurales y clásicos presentan una adicción a la señalización aberrante por la Integrina $\alpha\beta_3$, que activa el eje PAK4-YAP/TAZ, potenciando la expresión de GLUT3, misma vía que cuenta con algunos fármacos para regular la expresión de este transportador de glucosa (Cosset et al., 2017).

Por otro lado, demostramos la expresión intracelular de SVCT2 dentro de los glioblastomas, y principalmente en regiones gemistocíticas. No obstante, existe poca evidencia de la expresión *in situ* de SVCT2 en tumores humanos, incluyendo los glioblastomas. Aunque se ha sugerido que la expresión de SVCT2 disminuye con la agresividad de los tumores (McCarty, 2013), en 104 muestras humanas de hepatocarcinoma, se observó que la alta expresión de SVCT2 se asocia con una pobre supervivencia de los pacientes, así como un comportamiento tumoral más agresivo; adicionalmente, la expresión de SVCT2 correlacionaba con las células troncales de cáncer (CD133+, Sox2+, Oct4+) (Lv et al., 2018). Recientemente y, haciendo uso de las tinciones de los microarreglos de tejidos de “The human Protein Atlas”, se mostró en 20 tipos de cáncer, que la mayoría de tumores expresan SVCT2 intracelular; además, existe una baja expresión para SVCT2 en gliomas. Aunque los autores generalizan que SVCT2 intracelular corresponde a una isoforma mitocondrial, el anticuerpo empleado en los experimentos con células y muestras de cáncer de mama (Santa Cruz S19, SC-9926), no es el mismo que fue empleado en “The human Protein atlas” (Atlas

Antibodies, HPA052825) (Roa et al., 2019, Pena et al., 2019). En ese sentido, es conveniente precisar que los anticuerpos empleados en nuestra investigación, no co-localizaron con las mitocondrias de neuronas corticales, células N2a de neuroblastoma (Ferrada et al., 2020) y en las células de glioblastoma. Además, estos anticuerpos han sido validados por: 1) la sobreexpresión de la isoforma humana de SVCT2 (presente tesis); 2) por el knock out generado por CRISPR-CAS9 (Ferrada et al., 2020); y 3) ha sido detectado en la membrana basolateral de los plexos coroideos, lo que directamente es asociado a la fisiología del transportador (Ulloa et al., 2019). Nuestros resultados apuntan a que los glioblastomas humanos expresan SVCT2 intracelularmente, el cual está localizado principalmente en el RER.

En conjunto, dos transportadores de alta afinidad para DHA (GLUT1 y GLUT3), se expresan en los glioblastomas humanos; mientras que la expresión de SVCT2 se mantiene intracelular. Por su origen astrogliar, era de esperarse la presencia de GLUT1; sin embargo, se restringe a zonas necróticas donde su expresión es mediada por HIF1. Por otro lado, GLUT3, que no es expresado en astrocitos, se ubica como el principal transportador de glucosa en los glioblastomas y se ha propuesto como un marcador de las células troncales. Esto explicaría su expresión principalmente en regiones importantes durante la progresión tumoral: los nichos perinecroticos y perivasculares. La importancia de estas células radica en su capacidad para proliferar y resistir al tratamiento con radio y quimioterapia.

Pensamos que la vitamina C en estas células tendría un rol importante en la protección de las mismas, durante dichos tratamientos.

Células de glioblastoma tienen un transporte funcional para el DHA

Se caracterizó *in vitro* la expresión y distribución celular de los transportadores de vitamina C: SVCT2, GLUT1 y GLUT3, en tres líneas celulares de glioblastoma que representan tumores parenquimales (U87MG), subventriculares (HSVT-C3) y células iniciadoras de tumores (BTIC, RAV27). Mediante inmunofluorescencia en microscopía confocal y de súper resolución, mostramos que GLUT1 se localiza principalmente en la membrana celular, mientras que GLUT3 y SVCT2 intracelularmente. Cuando analizamos el transporte de vitamina C radiactiva, observamos que las células captan preferentemente DHA (células U87MG 1777 ± 45 pmoles/ 1×10^6 células; HSVT-C3 1158 ± 104 pmoles/ 1×10^6 células; RAV27 1913 ± 26 pmoles/ 1×10^6 células). Varias células tumorales han mostrado captaciones similares. Previamente, habíamos mostrado que las células U87MG captaban DHA, aproximadamente 1500 pmol/ 1×10^6 células (Garcia-Krauss et al., 2016). Células de papiloma de plexo coroideo presentaron una captación de DHA a los 5 min de 2000 - 2500 pmoles/ 1×10^6 células y fue cinco veces mayor a la captación de AA (Ulloa et al., 2013). Células SK-MEL-131 clon13.44 de melanoma, mostraron una razón de transporte de 220 ± 30 pmoles/min/ 1×10^6 células para DHA, y 9 ± 1 pmoles/min/ 1×10^6 células para AA. Incluso, se observó que las células de melanoma captan 15 veces más rápido DHA, en comparación

con melanocitos (Spielholz et al., 1997). Células RL, derivadas de un paciente con linfoma folicular de células B y células K562 de leucemia mieloide crónica, captaron DHA y no AA. Además, los autores muestran una cinética de dosis-dependencia, llegando a acumular 8,9 mM (RL) y 18 mM (K562) de AA intracelular (Heaney et al., 2008). En general, cada vez existe más evidencia de que las células tumorales captan preferentemente DHA (Nualart et al., 2003, Ngo et al., 2019).

Células de Glioblastoma captan preferentemente DHA; el cual es reducido intracelularmente a AA, esto ha sido demostrado para células con altos niveles de glutatión intracelular como los glioblastomas (Rice, 2000, Zhu et al., 2018). Sin embargo, se desconoce qué porcentaje de la vitamina C se queda en el citosol o se compartimentaliza. Al analizar nuestros resultados, la relación de la captación neta de vitamina C comparada al contenido de AA citosólico (Células U87MG, $46,2 \pm 7,2$ pmoles/ 1×10^6 células; HSVT-C3, $57,4 \pm 8,1$ pmoles/ 1×10^6 células; RAV27, $211,1 \pm 5,6$ pmoles/ 1×10^6 células) mostraron que aproximadamente el 97%, 95% y 89% respectivamente, de la vitamina C no se localiza en la fracción citosólica, sugiriendo que es compartimentalizada en las células de glioblastoma. Como se indicó previamente, todas las células tienen la habilidad de reducir el DHA captado, comprometiendo o no su viabilidad (Ferrada et al., 2019). Ejemplo de ello, son los eritrocitos humanos, que al ser incubados con DHA 0,5 mM a los 5 min, reducen y acumulan 1,8 mM de AA (May et al., 2001). Nuestros experimentos mostraron una baja concentración de vitamina C a nivel

citoplasmático, después de 30 min de incubación con DHA, sugiriendo que DHA fue reducida a AA para su compartimentalización. Uno de los organelos propuestos es el retículo endoplasmático; aunque no se conoce la concentración de AA en el RER, se sugiere que sea mayor en comparación con el citosol, esto principalmente por la alta demanda de vitamina C en este organelo (Mandl et al., 2009). Además, se ha observado que la deficiencia de vitamina C en el hígado del cobayo, induce un aumento de la expresión de proteínas de estrés del RER (GRP94, GRP78 y PDI), sugiriendo que el almacenamiento de AA en el RER participa en el mantenimiento de un ambiente favorable para el plegamiento de las proteínas (Margittai et al., 2005). También se ha postulado que la disminución de AA en el RER estaría asociada con algunas patologías; como el escorbuto, el síndrome de tortuosidad arterial, el síndrome de Ehler-Danos, entre otras (Pozzer et al., 2020). Enzimas residentes del RER encargadas del apropiado plegamiento de las fibras de colágeno, como la Hidroxilasa de Propina C-P4H, funcionan a concentraciones óptimas de 1-2 mM de AA (Kuiper and Vissers, 2014). Interesantemente, 1mM de AA es suficiente para tener el 100% de la actividad de la enzima; sin embargo, el DHA actúa como un inhibidor no competitivo para el α -cetoglutarato, el sustrato o el AA; y como un inhibidor competitivo del ion Fe^{2+} (Myllyla et al., 1978). De esta forma, AA activaría las enzimas dependientes de AA en el RER, y DHA realizaría su inhibición. (Figura 39). El DHA podría salir del RER a través de GLUTs, que han sido localizados a nivel reticular en muchos

tipos celulares. El DHA citosólico podría volver a reducirse, para cumplir un ciclo metabólico que ayudaría a la homeostasis de vitamina C dentro de la célula.

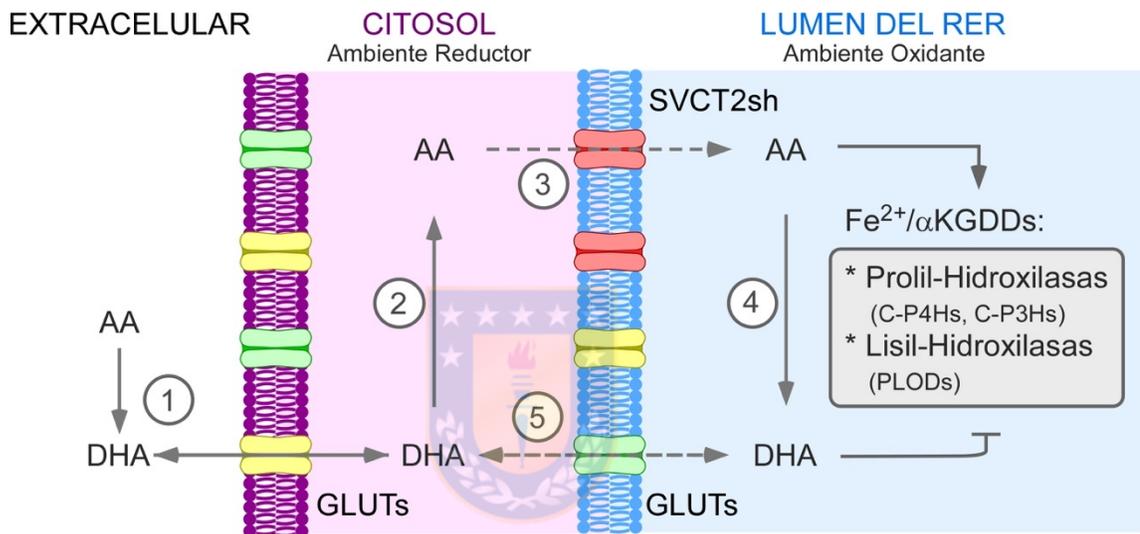


Figura 39. Compartimentalización de la vitamina C en el Retículo Endoplasmático Rugoso. En el espacio extracelular puede ocurrir la oxidación del Ácido Ascórbico (AA) a su forma de Ácido Dehidroascórbico (DHA) (1), permitiendo la incorporación de DHA a la célula, a través de GLUTs (2). En el citosol, el DHA es reducido a AA (2). Una vez reducido es compartimentalizado en el RER, a través de un transportador reticular, SVCT2 corto (3). En el RER, AA se emplea como cofactor de Hidroxilasas de Lisina y Prolina (4). El DHA generado por la reacción, podría ser liberado nuevamente al citosol para su reciclamiento (5). $Fe^{2+}/\alpha KGDDs$, Dioxigenasas dependientes de hierro y α -cetoglutarato; C-P4Hs, Prolil-4-hidroxilasas; C-P3Hs, Prolil-3-hidroxilasas; PLODs, Dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato-lisil hidroxilasa de procolágeno.

Células de glioblastoma expresan una isoforma pequeña de SVCT2 localizada en el Retículo Endoplasmático Rugoso

Nuestro resultados mostraron que las células de glioblastoma expresan SVCT2; sin embargo, presentan una baja captación de AA. En el cerebro, la expresión de SVCT2 se localiza mayormente en las neuronas y en los plexos coroideos (Tsukaguchi et al., 1999, Nualart et al., 2014) donde expresan un transporte funcional para el AA (Caprile et al., 2009, Angelow et al., 2003, Qiu et al., 2007). *In situ*, SVCT2 se localiza en las membranas apicales (epéndimo) y basolaterales (plexos coroideos) (Ulloa et al., 2019), sugiriendo que la expresión de SVT2 en estas células, es la responsable de la captación de AA en el cerebro. Sin embargo, a partir de cerebro fetal humano se clonó una isoforma corta de SVCT2, que resulta de un *splicing* alternativo (Lutsenko et al., 2004). Adicionalmente, esta isoforma fue localizada durante el desarrollo de la corteza cerebral postnatal (Salazar et al., 2014). Al analizar funcionalmente la expresión de esta isoforma en células N2a, se observó la hetero-oligomerización de SVCT2wt (largo) con SVCT2sh (corto) mediante ensayos de FRET (Salazar et al., 2014). Ambos reportes sugieren que la expresión de la isoforma corta funciona como una dominante negativa para el transporte de AA, regulando su captación bajo un contexto específico. Aunque se ha estimado que el 95-100% de los genes humanos producen 2 o más isoformas de mRNAs por *splicing* alternativo, aun es difícil explicar cómo las células expresan o no una isoforma específica (Lee and Rio, 2015). Al analizar la expresión de SVCT2 en células de glioblastoma, con un

par de oligonucleótidos que permiten amplificar ambas isoformas, encontramos predominantemente la isoforma corta, con una longitud aproximada de ~302 pb, la cual ha sido reportada en células leucémicas HL-60 (Lutsenko et al., 2004). Mediante WB, confirmamos la presencia de la proteína, detectándose una banda de ~45 kDa. De acuerdo a la secuencia de aminoácidos, la estimación del peso molecular es 70,34kDa para la isoforma larga y 32,89kDa para la forma corta (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UGH3>, <https://www.uniprot.org/uniprot/H0Y544>). Varias publicaciones han señalado una masa molecular de 75-80kDa (Lutsenko et al., 2004, Liang et al., 2002, Salazar et al., 2014) y de 60-65kDa (Savini et al., 2007b, Portugal et al., 2017) para la forma larga de SVCT2. Sin embargo, varios grupos de investigación reportaron también una masa molecular de 50-55kDa para células humanas que captan AA (Savini et al., 2007a, Godoy et al., 2007, Li et al., 2003). En nuestros experimentos, el anticuerpo reconoció una banda de 70kDa en las células N2a; sin embargo, en las tres líneas celulares analizadas de glioblastoma; se observó predominantemente una banda de ~45kDa. De esta forma, concluimos que las células de glioblastoma expresan una isoforma corta de SVCT2.

Mediante el sistema de expresión de proteínas de fusión con Baculovirus, analizamos la distribución intracelular de los transportadores. Observamos que GLUT1, GLUT3 y SVCT2 se localizan intracelularmente, principalmente asociados al RER. En particular, mostramos mediante microscopía confocal y súper-resolución, que SVCT2 se encuentra en el RER; además, confirmamos

que la isoforma de ~45kDa está presente en extractos de RER aislado, y no se localiza en las mitocondrias. Por lo que sugerimos que células de glioblastoma expresan una “isoforma reticular”, con un menor peso molecular.

Dada la ubicación subcelular de la isoforma reticular, postulamos que este transportador no sería activado por sodio (Godoy et al., 2007), de esta forma podría participar en el transporte de AA al interior del RER. Al alinear las secuencias peptídicas de SVCT2 corto y largo, observamos que la isoforma corta mantiene su motivo NAT, que esta asociado a la unión con el sustrato (AA); sin embargo, pierde parte del dominio de compuerta (TM5) (Lu et al., 2011); que permite una configuración endofacial abierta (Yu et al., 2017). Por lo tanto, pensamos que la ausencia del TM5 modificaría el mecanismo de traspaso del AA. Entonces, ¿cómo podría funcionar SVCT2 corto para incorporar AA dentro del RER?. Godoy et al., (2007) demostró que el ciclo de transporte de AA, involucra la unión de Na^{2+} , posteriormente AA y luego Na^{2+} , de esta forma estimó un coeficiente de Hill (N_H) de 2 (cooperatividad), para la activación del transporte AA por sodio. Si bien, esto había sido propuesto previamente por Tsukagushi et al., (1999), en su paper en Nature; interesantemente, Godoy et al., (2007) estableció además, que el coeficiente de Hill (N_H) cambia de 2 a 1, cuando el transportador SVCT2 se expone a altas concentraciones de AA. Esto quiere decir, que la cooperatividad por sodio se pierde al aumentar la concentración de AA por sobre 500 μM . Mirado de otra manera, la cooperatividad con sodio, está presente fundamentalmente a bajas concentraciones de AA (50-100 μM AA

plasmático) y con altas concentraciones de sodio extracelular (135 mM). De esta forma, es factible que un transportador de AA corto, que pierde el TM5, pueda transportar AA al RER, cuando este sustrato esté presente a altas concentraciones (intracelulares) y el sodio citosólico, se encuentre muy bajo (>20 mM).

En conjunto, postulamos que las células de glioblastoma captan preferentemente DHA del medio extracelular, lo reducen intracelularmente a AA (utilizando el glutatión intracelular). AA es incorporado al RER, a través del funcionamiento de una isoforma corta y reticular de SVCT2, cuyo funcionamiento no sería activado por sodio, pero si, por una alta concentración de AA citosólica. Paralelamente a este mecanismo, pensamos que el DHA podría ayudar a las células de glioblastoma a resistir el estrés oxidativo, incrementando la biosíntesis de glutatión, como ocurre en astrocitos normales en el cerebro adulto.

El Ácido dehidroascórbico protege a las células de glioblastoma frente al estrés oxidativo

Se ha postulado que la Vitamina C induce la muerte de células tumorales, principalmente por la generación de ROS (Ngo et al., 2019); sin embargo, hemos postulado que este efecto depende de múltiples factores, incluyendo el estado metabólico específico de cada célula (Ferrada et al., 2019). En algún tipo de cáncer, como el cáncer colorectal, el DHA puede matar a las células tumorales

que expresan mutaciones en BRAF y KRAS, principalmente por la alteración en la glicólisis y la reducción en la producción de ATP (Yun et al., 2015); mientras que en algunas células tumorales, incluyendo las U87MG de Glioblastoma, concentraciones farmacológicas de DHA (20mM), no tienen efecto sobre su viabilidad (Chen et al., 2008). Nuestros resultados en las células de glioblastoma, mostraron que el DHA protegió a las células del estrés oxidativo inducido por el H_2O_2 .

En células Jurkat de Leucemia Linfoide Aguda se observó que la preincubación con DHA inhibía la muerte celular inducida por H_2O_2 100 μ M. Principalmente porque el DHA incrementó tres veces la concentración de glutatión, a través de la estimulación de la vía de las pentosas fosfato (PPP) (Puskas et al., 2000). Resultados similares se han observado en los astrocitos, donde el DHA aumenta la síntesis de Glutatión, a través del incremento de la actividad de la Glutatión Peroxidasa y la Glutatión Reductasa (Kim et al., 2005). De esta forma, sugerimos que las células de glioblastoma, al ser fenotípicamente asociadas a los astrocitos, inducirían la misma respuesta frente al reciclamiento de DHA; un incremento en la biosíntesis de glutatión. Al disponer de más glutatión, existiría una mayor capacidad para reducir DHA a AA, por lo tanto este proceso sería muy favorecido en las células de glioblastoma. Tenemos que considerar que estos tumores son altamente resistentes al tratamientos de quimio y radioterapia, donde se induciría un ambiente altamente oxidativo, con una fuerte colonización de células productoras de oxidantes, como la microglía activada. La microglía activada

ayudaría en la generación extracelular de DHA, este sería transportado intracelularmente por GLUTs, y almacenado temporalmente en el citosol como AA. El AA sería transportado al RER, utilizando isoformas cortas de SVCT2, que no son activas para su transporte por sodio. De esta forma, el AA podría alcanzar el RER para que las células de glioblastoma puedan utilizar esta molécula, por ejemplo, en la biosíntesis de colágeno.

La vitamina C induce la secreción de colágeno IV in vitro

La vitamina C participa como cofactor de las Fe^{2+}/α KGDDs, entre ellas las hidroxilasas de prolina y lisina indispensables en la apropiada biosíntesis del colágeno (Murad et al., 1981). Se sabe que al alterar la estructura del colágeno, se inhibe la angiogénesis y por lo tanto, el crecimiento tumoral de los glioblastomas (Mammoto et al., 2013). Incluso se ha observado que las células U87MG de glioblastoma expresan y secretan colágeno VI, al ser incubadas con vitamina C a concentraciones fisiológicas (Han and Daniel, 1995). Nuestros resultados mostraron que la suplementación con vitamina C favorece un aumento en la expresión de colágeno I y IV que, al menos en las células RAV27, generan una matriz extracelular rica en Colágeno IV, cuando se adiciona AA y DHA *in vitro*. Además, mostramos por primera vez, que el DHA también puede inducir la secreción de colágeno, función que se atribuía solamente al transporte de AA.

Varios tipos celulares han mostrado la capacidad para expresar y secretar colágenos cuando son incubados con vitamina C (Jeon et al., 1996, Murad et al.,

1981, May and Qu, 2005). En pericitos de la microvasculatura, el AA (200 μ M por 24 horas) incrementa 10 veces la secreción de las cadenas α 1 y α 2 del colágeno IV (Jeon et al., 1996); lo mismo se observó en cultivos de pericitos de retina, los cuales eran mantenidos en AA 100 μ g/ml (Cohen et al., 1980). La suplementación con AA induce la secreción de Colágeno IV en fibroblastos (Geesin et al., 1988, Murad et al., 1981). Incluso después de 72 horas, 100 μ M de AA inducía la expresión de los genes de colágeno I, IV y SVCT2, así como la liberación de procolágeno aumentó hasta 8 veces (Kishimoto et al., 2013). Adicionalmente, en células endoteliales se observó que la maduración y secreción de colágeno IV es dependiente de la concentración de AA (May and Qu, 2005). En explantes de ganglios de la raíz dorsal de ratones SVCT2^{+/-}, el AA estimuló la expresión de colágenos I y IV, necesarios para la deposición de mielina durante el proceso de regeneración; y la expresión de colágeno fue regulada por la actividad de las enzimas TET, al demetilar la región promotora del gen de colágeno IV (Rohr et al., 2017). Recientemente, se describió que la incubación con AA 50 μ M de 3 a 6 horas en fibroblastos (embrionarios, MEF y humanos, HFF) induce la glicosilación (en la Asn 259) de la prolil-hidroxilasa HP4A1, favoreciendo un incremento en la secreción de Col1 α 1 y Col1 α 2 maduro y resistente al tratamiento con pepsina; aunque el mecanismo por el que el AA regula este proceso aun no está completamente descrito (Shi et al., 2019). Adicionalmente, el tratamiento con AA en fibroblastos 3T3 de ratón, incrementa la expresión y secreción de la PCPE-1, molécula que participa en el corte los extremos C-terminales del propetido,

liberando la triple hélice de pro-colágeno y permitiendo el ensamblado extracelular de las fibras de colágeno (Gohar et al., 2019). De esta manera, podemos referir que la vitamina C puede actuar en distintos niveles durante la biosíntesis del colágeno: i) favoreciendo la demetilación de las regiones promotoras de los genes de colágeno e ii) induciendo su expresión, así como en la maduración y secreción del pro-colágeno. Para tal efecto, la vitamina C debe entrar al RER y alcanzar al menos una concentración de 1mM, para activar a las enzimas respectivas.

La Vitamina C favorece la migración de células de glioblastoma

Reportes anteriores han mostrado que varios componentes de la matriz extracelular, incluidos los colágenos I y IV, potencian la migración de las células presentes en los esferoides de glioblastoma, tanto de líneas celulares como de biopsias humanas (Chintala et al., 1996a, Mahesparan et al., 1999). Evaluamos la habilidad para migrar que presentan las células de glioblastoma que son capaces de secretar o no colágeno *in vitro*, donde mostramos que a diferentes concentraciones de AA y DHA, las células que secretan colágeno estimulan su migración, mientras que las células U87MG que no secretan colágeno *in vitro*, no presentan este efecto. Sorprendente, observamos que al realizar experimentos de migración, en sistemas *ex vivo* (tejidos/explantos), ambas células (U87MG y RAV27) secretaron colágeno y aumentaron su migración en presencia de vitamina C (AA/DHA). Adicionalmente, se ha descrito que el colágeno VI participa

en la invasión de las células U87MG de glioblastoma, en ensayos sobre rebanadas de cerebro, donde las células tumorales expresaban colágeno VI en la masa tumoral y las células que estaban invadiendo (Han et al., 1995).

Se ha postulado que los mecanismos de migración de las células de glioblastoma se encuentran conservados y son similares a los observados en precursores neurales durante su migración (Canoll and Goldman, 2008). En ese sentido, fue interesante observar que la suplementación con AA por 72 horas induce la expresión de tubulina β -III, proteína central en este proceso, debido a que modifica la morfología celular, generando un proceso celular similar al “leading edge” (datos no mostrados). Recientemente, se observó que el AA promueve la migración de células precursoras neurales a través de un aumento en la expresión de CDC42 y un mejor ensamblado de la actina filamentosa (Yang et al., 2019). Proponemos que la vitamina C puede inducir la migración de las células de glioblastoma, ya sea por un aumento en la deposición de colágeno o al inducir la expresión de otras moléculas que participan en este proceso.

Glioblastomas inducidos en el parénquima cerebral de cobayo mantienen características histopatológicas de glioblastomas humanos

Se estableció un modelo de xenotrasplante en parénquima cerebral de cobayo con células U87MG y HSVT-C3 de Glioblastoma. Las células fueron implantadas por estereotaxia para inducir la formación tumoral a nivel del cuerpo estriado en

el cerebro del cobayo. Los tumores inducidos en los cerebros de cobayos presentaron similitud a los glioblastomas humanos. Mostraron una alta celularidad e infiltración microglial (IBA-1+), zonas de necrosis intratumoral y vasculatura glomeruloide. Estos tumores invadieron el cerebro hacia la superficie pial y a través de la co-optación de los vasos sanguíneos y hacia la SVZ a través del cuerpo caloso. Corroboramos la expresión de algunos marcadores de glioblastoma como GFAP, Vimentina, Nestina, Tubulina β -III y PCNA.

Se ha demostrado que los xenotransplantes de glioblastoma no solo recapitulan las características histopatológicas, sino que también mantienen las características genómicas del tumor parental (Joo et al., 2013). La ventaja del empleo de animales inmunocompetentes es principalmente que producen una gliosis reactiva y reclutan macrófagos y microglia asociados al glioma (GAMs) de manera similar a lo que ocurre en pacientes con glioblastoma (Garcia et al., 2014). Aunque poco se conoce sobre la función de los astrocitos reactivos en el glioblastoma, éstos son capaces de secretar grandes cantidades de citosinas anti-inflamatorias como TGF β , IL-10 y G-SCF (Henrik Heiland et al., 2019). Adicionalmente, varios estudios han mostrado que los GAMs favorecen el desarrollo tumoral, principalmente por la liberación de citosinas anti-inflamatorias y factores de crecimiento; y si se depleta la microglía, se compromete el tamaño del tumor (Platten et al., 2003, Zhai et al., 2011, Gutmann and Kettenmann, 2019, Hambardzumyan et al., 2016). Previamente mostramos que la microglía se encuentra presente en glioblastomas inducidos en la SVZ de cobayos y su

número no se ve afectado por el escorbuto (Jara et al., 2020). Además, pensamos que es esencial el rol de las células mieloides durante la captación de vitamina C mediante el efecto *bystander* (Nualart et al., 2014). Por lo tanto, consideramos que el modelo de xenotransplante ortotópico de glioblastoma en cobayo posee ventaja en el estudio del efecto de la vitamina C sobre el desarrollo y progresión del glioblastoma.

El escorbuto afecta el desarrollo y progresión de glioblastomas inducidos en Cobayos

El análisis que se ha realizado en los tumores inducidos con células U87MG y H5VT-C3, nos permitió observar que el escorbuto impacta en la progresión tumoral reduciendo la vasculatura glomeruloide, la frecuencia de necrosis y la co-optimación de vasos sanguíneos.

Tumores agresivos (grado IV) poseen una alta proliferación, lo que conlleva a un desbalance entre el crecimiento tumoral y el suministro de nutrientes y oxígeno induciendo necrosis en varios tipos de cáncer. Sin embargo, la formación de zonas necróticas con células en pseudoempalizada es una característica distintiva del glioblastoma (Ferris et al., 2017, Perry and Wesseling, 2016). Las pseudempalizadas son células que migran desde centros hipóxicos generados por eventos oclusivos, basado en la observación de que el 50% de las zonas necróticas presentan vasos trombosados en el centro. La inducción de la

migración de éstas células depende de la expresión de metaloproteasas (principalmente MMP-2) mediada por HIF-1 (Brat et al., 2004). Adicionalmente, la hipoxia promueve la expresión de genes asociados al mantenimiento de las GSCs, su auto-renovación, su dediferenciación, así como la protección frente quimio y radioterapia (Hambardzumyan and Bergers, 2015). Nuestros resultados mostraron que el escorbuto reduce la frecuencia de zonas necróticas de tumores parenquimales. Mientras que en tumores ventriculares con células HSVT-C3, la reducción de la necrosis se asoció a la disminución de la proliferación durante el escorbuto, mientras que no se observó diferencia con los tumores U87MG (Jara et al., 2020). Además, se sabe que la vitamina C a concentraciones fisiológicas promueve la proliferación de células tumorales aumentando la expresión de la Ciclina D1 y c-Myc (Cho et al., 2018). Otro gen blanco de HIF-1 es el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), mismo que se ha asociado a la proliferación microvascular glomeruloide o también conocido como vasculatura glomeruloide, donde VEGF permite su formación (Sundberg et al., 2001). Además, está conformado por células endoteliales, periticos, GSCs, GAMs y células tumorales; mientras que el principal componente de la MEC es el Colágeno IV (Ogawa et al., 1989, Chen et al., 2017, Sun et al., 2014). Al igual que la necrosis, la vasculatura glomeruloide es un indicador de la progresión tumoral. En cáncer de próstata, mama, endometrio y melanoma, la presencia de vasculatura glomeruloide se asocia con un mal pronóstico para el paciente (Straume et al., 2002). En glioblastomas el mal pronóstico está ligado a la

presencia de GSCs (CD133+, Nestina+) formando un nicho perivascular en la vasculatura glomeruloide, y siendo las responsables de la recurrencia y resistencia a fármacos (Chen et al., 2017). Nuestros resultados mostraron que el escorbuto reduce significativamente la vasculatura glomeruloide. Al igual que en tumores periventriculares, se ha observado que la deficiencia de vitamina C reduce en el volumen de los vasos glomeruloides (Jara et al., 2020). Previamente, se observó que la suplementación con AA 100µg/ml por 72 horas en células de glioblastoma, aumentaba la expresión de genes asociados al ciclo celular, al ensamblado y organización celular, replicación, recombinación y reparación del DNA, e interesantemente, genes asociados a la enfermedad, en los que destaca VEGFA (Sun et al., 2018). Por lo tanto, pensamos que el efecto de la vitamina C sobre la vasculatura glomeruloide, puede estar relacionado a la proliferación celular, a la deposición de colágeno y/o a la expresión de factores angiogénicos.

Adicionalmente, nuestros resultados mostraron que las células U87MG y HSVT-C3 invaden las vainas perivasculares; sin embargo el escorbuto impacta en la cantidad de células que migran a través de los vasos sanguíneos. Previamente, discutimos/establecimos el efecto de la vitamina C sobre la migración de las células *in vitro* y *ex vivo*. El patrón que observamos durante la co-optación de los vasos sanguíneos con gran cantidad de células se puede explicar, por qué las células de glioblastoma migran a través de los vasos sanguíneos de manera “saltatoria”; es decir, migran, frenan para realizar mitosis, y reactivan su migración (Farin et al., 2006). Mediante microscopia *intravital* se observó que la asociación

a los vasos sanguíneos acelera la migración de las células líderes, permitiendo direccionalidad a las células seguidoras (Alieva et al., 2019). Al analizar el perfil de expresión mediante microarreglos o RNAseq de célula única se han identificado múltiples genes relacionados a la invasión; notando principalmente la sobreexpresión de factores como STAT3 y C/EBP β (Vollmann-Zwerenz et al., 2020). Éstos factores forman un núcleo de regulación e inducen la reprogramación de las células de glioblastoma hacia un fenotipo mesenquimal. Además, mostraron ser suficientes para gatillar la migración e invasión de las células de glioblastoma al inducir la transcripción de colágenos y fibronectina (Carro et al., 2010). Interesantemente, los genes con mayor expresión inducida por la vitamina C en células de glioblastoma son NRF1, NRF2 y STAT3 (Sun et al., 2018). Pensamos que el efecto que tiene la vitamina C sobre la invasión de las células de glioblastoma durante la co-optación de vasos sanguíneos, pudiera estar asociada no solo a la expresión de colágenos, sino también a la expresión de núcleos regulares como STAT3 - C/EBP β , induciendo la reprogramación de las células de glioblastoma a un fenotipo más invasivo. Será conveniente validar dicho concepto a futuro.

La Vitamina C es necesaria para la deposición de colágeno intratumoral

Los glioblastomas tienen una alta capacidad para remodelar la matriz extracelular. *In vitro* mostramos que las células de glioblastoma incrementan la

expresión y secreción de colágeno IV al ser suplementadas con Vitamina C. *In vivo*, mostramos que el escorbuto reduce la vasculatura glomerulode, la deposición de colágeno y notamos que la expresión de Colágeno I y IV se retenía intracelularmente. Mientras que en los animales control y en las muestras de humano, la deposición de colágeno fue evidente mediante PRS, SHG e IF para Colágeno I y IV. Recientemente, se ha postulado que la deposición de colágeno y la disposición espacial de sus fibras están relacionadas con el potencial invasivo y por lo tanto, inciden con el pronóstico del paciente (Pointer et al., 2017).

Como se ha tratado anteriormente, la vitamina C participa en la biosíntesis del colágeno a distintos niveles de regulación. *In vivo* se han empleado algunos modelos experimentales como el cobayo y ratones knock-out para reproducir la deficiencia de vitamina C.

En el carcinoma pulmonar de Lewis, se mostró que el colágeno IV es necesario para la angiogenesis, ya que al inhibirlo con el uso del péptido recombinante del dominio no colagenoso C-terminal 1 de la cadena $\alpha 6$ del colágeno IV ($\alpha 6$ NC1), se reduce la angiogénesis y el tamaño tumoral (Mundel et al., 2008). Y en ratones *Gulo*^{-/-} con carcinoma de pulmón de Lewis, se observó que el AA es necesario para la síntesis de colágeno IV y la migración de las células endoteliales para la formación de vasos sanguíneos durante la angiogénesis (Telang et al., 2007). Sugiriendo que la vitamina C en un tumor altamente angiogénico participa en la secreción de colágeno IV favoreciendo el crecimiento tumoral. En un modelo de

cáncer cervico uterino con células HeLa en ratones “nude”, se observó en los animales controles que la expresión de colágeno I fue escasa y el colágeno IV permanecía intracelular; mientras que el tratamiento con una mezcla de AA, lisina, prolina y extracto de té verde, se evidenció un incremento significativo en la secreción de ambos colágenos (Roomi et al., 2015).

Recientemente, en un modelo de cáncer de mama triple negativo (TNBC) inducido en ratones NOD/SCID con células SUM-159 se demostró que la hidroxilación de las prolinas del colágeno es necesaria para favorecer la transición mesenquimal. Adicionalmente, los autores encontraron que la Budesonida, que inhibe este proceso, reduce la deposición de colágeno, impactando en el tamaño tumoral y la metastasis hacia los pulmones (D'Aniello et al., 2019). Es conveniente señalar que en este reporte se muestra el rol de la vitamina C en la reprogramación de las células tumorales, favoreciendo un fenotipo mesenquimal con mayor potencial migratorio e invasivo, esencial en tumores metastásicos.

Los glioblastomas son tumores que también secretan grandes cantidades de colágenos. La inhibición de la Lisil Oxisada (encargada del cross-link extracelular de las fibras de colágeno) con β -Aminopropionitrilo y D-Penicilamina, reducen el tamaño tumoral, la deposición de colágeno VI y la angiogénesis en tumores inducidos con células de glioblastoma U87MG, en ratones desnudos (Mammoto et al., 2013). Adicionalmente, el xenotransplante en ratones desnudos con células

U251 de glioblastoma, con *knock-down* para la hidroxilasa de lisina (PLOD2), reduce la cantidad de colágeno secretado y reduce la invasión al tejido sano (Xu et al., 2017). Nuestros resultados mostraron que el escorbuto en los cobayos, reduce la secreción de colágeno I y IV intratumoral, impactando en la progresión e invasión del glioblastoma.

Pensamos que la vitamina C favorece la síntesis y secreción de colágeno, el cual es esencial en el fenotipo agresivo, potenciando la formación de vasculatura glomeruloide así como la migración de las células tumorales para invadir los espacios perivasculares (resumen gráfico, figura 40).



Figura 40. Rol de la vitamina C en el desarrollo y progresión del glioblastoma. En el espacio extracelular el AA es oxidado a DHA, mediado por la producción de superóxidos por la microglia (1), “*efecto bystander*”. Este proceso permite la incorporación de DHA a la célula, a través de GLUTs (1). En el citosol, el DHA es reducido a AA (2), utilizando las altas concentraciones de glutatión presentes en los glioblastomas. Una vez reducido, el AA es compartimentalizado en el RER, a través de un transportador “*reticular*” corto de SVCT2 (3). Este transportador funcionaría con altas concentraciones de AA y bajas concentraciones de sodio citosólico (alto potasio?). El AA incorporado al RER, sería utilizado como un cofactor de las Hidroxilasas de lisina y prolina (4), para estimular la correcta formación de colágeno. Debido a que el interior del RER posee un ambiente oxidativo, el DHA generado por la oxidación, podría ser liberado nuevamente al citosol para su reciclamiento (5). Todo este movimiento intracelular de vitamina C sería un “*ciclo fútil*” que ayudaría a la homeostasis intracelular de vitamina C en glioblastoma. Considerando la literatura, el AA podría también ingresar al núcleo de la célula, donde funcionaría como un cofactor de las demetilinasas de histonas (JHDM) y del DNA (TETs) (6), induciendo la expresión de genes asociados a una reprogramación mesenquimal como STAT3, factores angiogénicos como VEGFA y colágenos (7). La expresión de colágenos, y la subsecuente traducción (8) llevaría a un aumento en la cantidad de cadenas α en el RER, moléculas que son hidroxiladas para su plegamiento (9), formando la triple cadena de procolágeno, que es exportado hacia el aparato de Golgi y liberado al espacio extracelular (10). Finalmente las fibrillas de colágeno se ensamblan, mediante enlaces covalente generados por la Lisil Oxidasa (LOX), para formar el colágeno fibrilar (11). La deposición de colágeno aumentaría la migración e invasión y la co-optación vascular. Condiciones escorbúticas o de deficiencia de vitamina C, afectarían la co-optación vascular y otros parámetros asociados a la malignidad de este tipo de tumores. AA, ácido ascórbico; DHA, ácido dehidroascórbico; $Fe^{2+}/\alpha KGDDs$, Dioxigenasas Dependientes de Hierro y α -Cetoglutarato; C-P4Hs, Prolil-4-Hidroxilasas; C-P3Hs, Prolil-3-Hidroxilasas; PLODs, Dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato Lisil hidroxilasa de Procolágeno.

XV. CONCLUSIONES

1. Las células de glioblastoma captan vitamina C oxidada (DHA) mediante GLUT1 en la membrana plasmática; además, expresan una isoforma corta de SVCT2 en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Sugerimos que esta isoforma de SVCT2 es responsable de la compartimentalización de vitamina C en el RER.
2. La vitamina C en el RER, es necesaria para la biosíntesis de colágeno en glioblastoma. El colágeno secretado por las células tumorales favorece la formación de la vasculatura glomeruloide y potencia la invasión perivascular.



XVI. ANEXO 1. FIGURAS SUPLEMENTARIAS

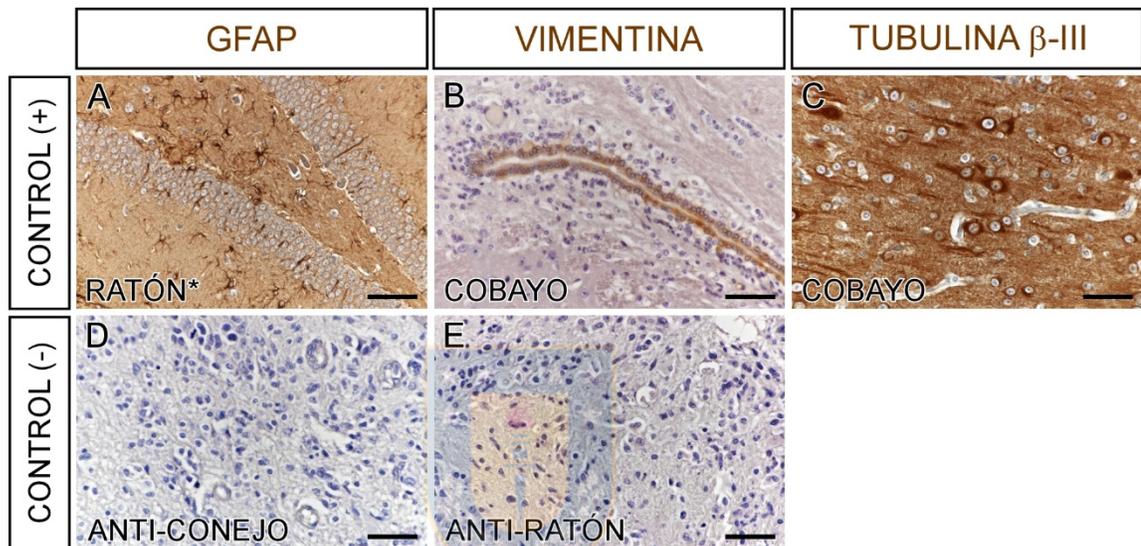


Figura Suplementaria 1. Controles de la Inmunohistoquímica para la detección de GFAP, Vimentina y Tubulina β -III. Como controles positivos (+) se emplearon: un corte de cerebro de ratón adulto con ALZ, que muestra astrocitos hipocampales GFAP+ (A); un corte de cerebro de cobayo para observar las células ependimales de los ventrículos laterales positivos a Vimentina (B) y un corte de cerebro de cobayo que muestra la corteza con neuronas tubulina β -III+ (C). Como controles negativos (-) se emplearon cortes del tumor B233 que no fueron incubados con anticuerpo primario, solo con anticuerpos secundarios anti-conejo (D) y anti-ratón (E). Anticuerpos: GFAP (1/200), Vimentina (1/20) y tubulina β III (1/1.000). Las barras corresponden a 50 μ m de longitud.

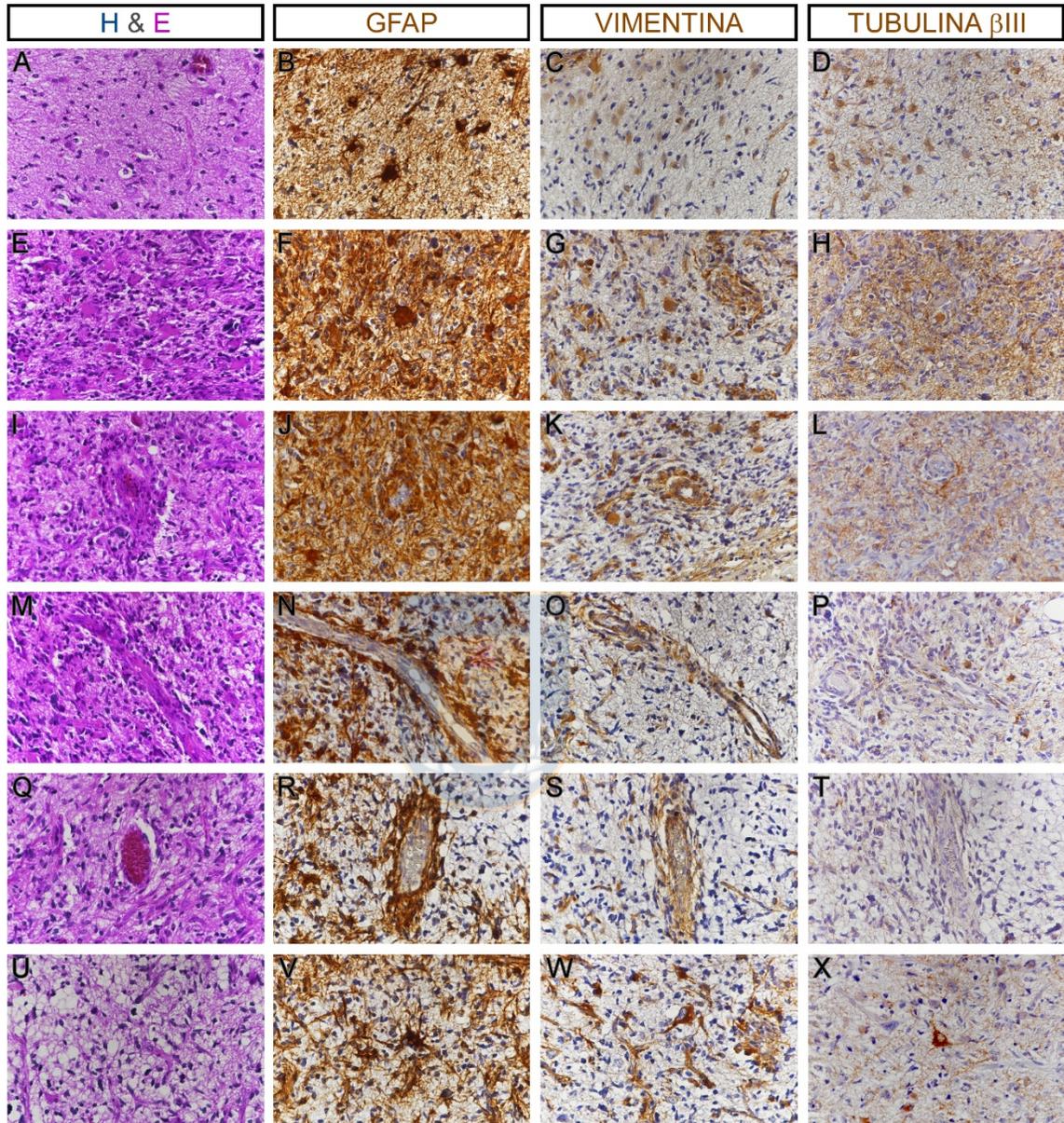


Figura Suplementaria 2. Expresión de marcadores de glioblastoma en distintas regiones tumorales. Microfotografías tomadas con aumento de 400X de cortes consecutivos para la localización de diferentes estructuras en una muestra de tumor humano (B450). Las regiones fueron ubicadas con la tinción de Hematoxilina y Eosina (A, E, I, M, Q, U). Inmunohistoquímica para GFAP (B, F, J, N, R, V), Vimentina (C, G, K, O, S, W) y Tubulina β -III (D, H, L, P, T, X). Las regiones corresponden al borde del tumor con gliosis reactiva (A-D); Zona intratumoral con presencia de gemistocitos (E-H); Vascularuta glomeruloide (I-L); Cooptación de Vasos sanguíneos (vista lateral, M-P y vista frontal, Q-T); Tejido adyacente al tumor (U-X). Anticuerpos: GFAP (1/200), Vimentina (1/20) y tubulina β III (1/1.000). Las barras corresponden a 50 μ m de longitud.

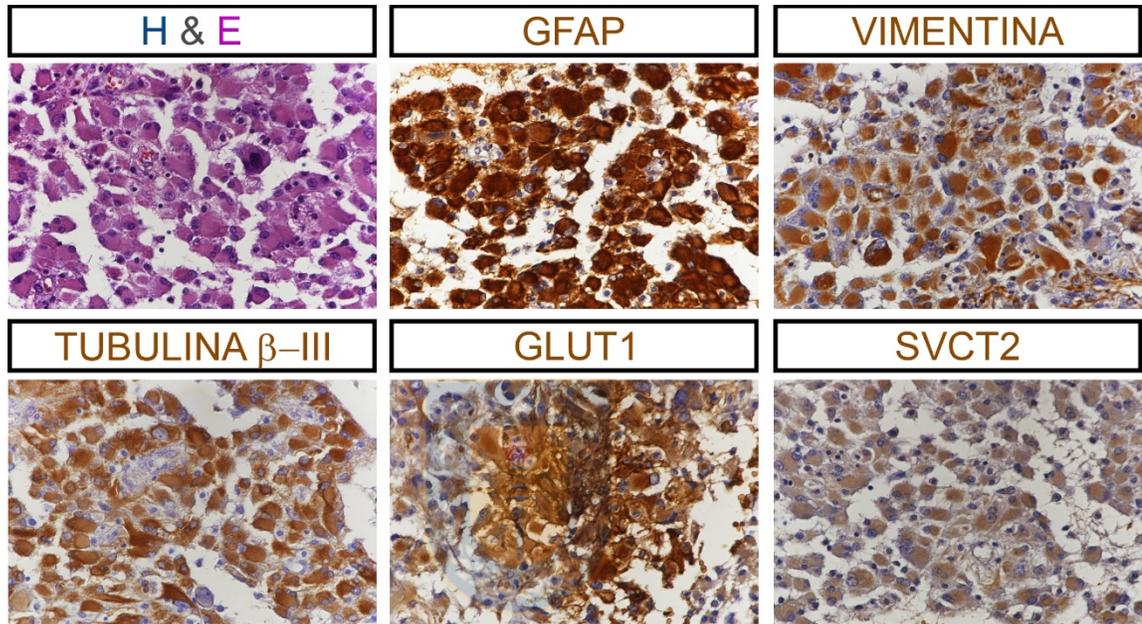


Figura Suplementaria 3. Gemistocitos expresan SVCT2 intracelular. Inmunohistoquímica para GFAP (DAKO, 1/200), Vimentina (DAKO 1/20), Tubulina β -III (1/1.000), GLUT1 (1/500) y SVCT2 (1/25). Aumento 400x.

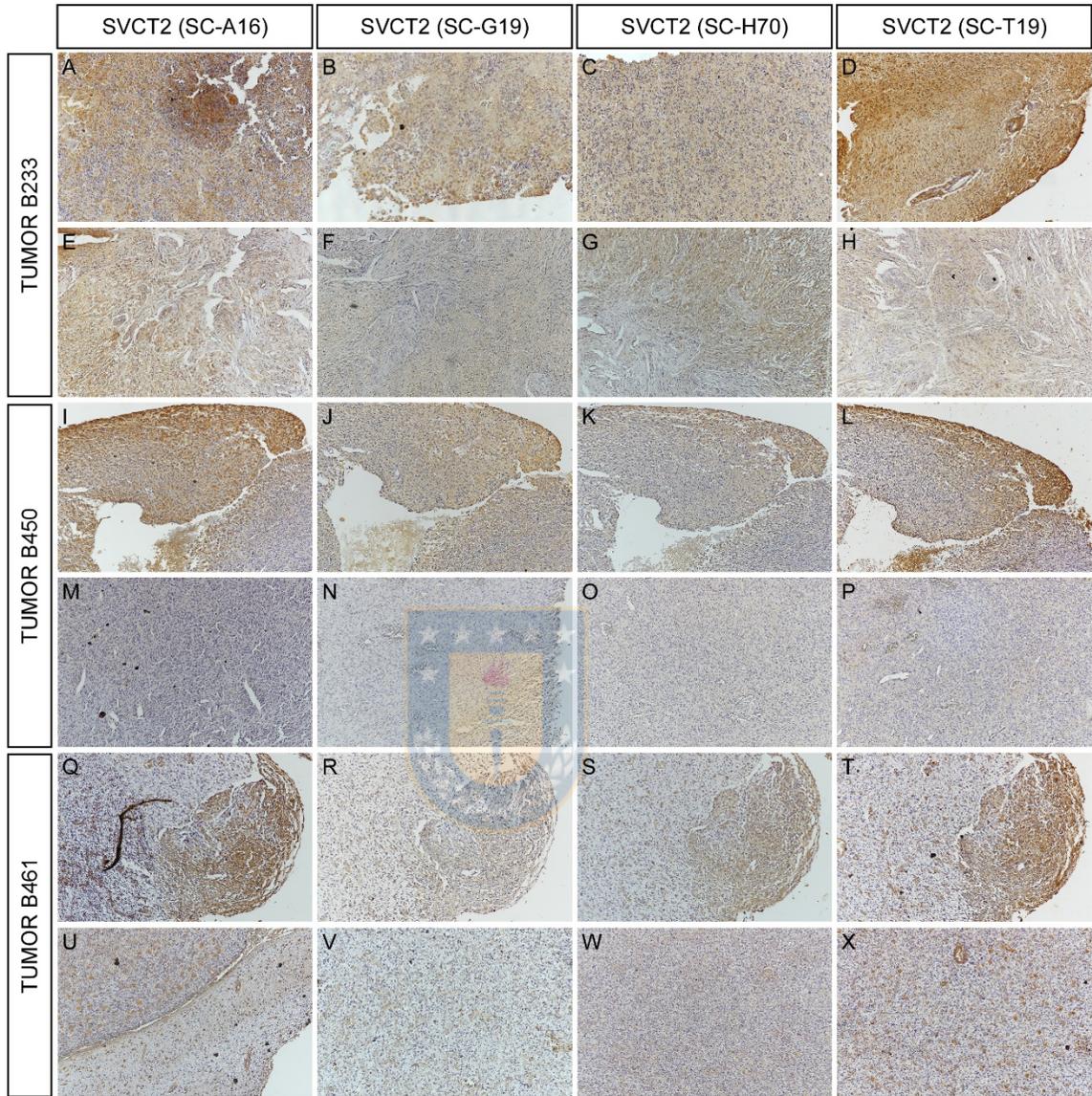


Figura Suplementaria 4. Evaluación de distintos anticuerpos para la detección de SVCT2 en cortes adyacentes de muestras humanas. Inmunohistoquímica para SVCT2 en tres tumores humanos B233 (A-H), B450 (I-P) y B461 (Q-X). Se muestran dos regiones diferentes para cada tumor. Anticuerpos evaluados Santa Cruz Biotechnology SC-A16 (A, E, I, M, Q, U); SC-G19 (B, F, J, N, R, V); SC-H70 (C, G, K, O, S, W) y SC-T19 (D, H, L, P, T, X). Todos los anticuerpos fueron empleados a dilución 1/25. Aumento 100X.

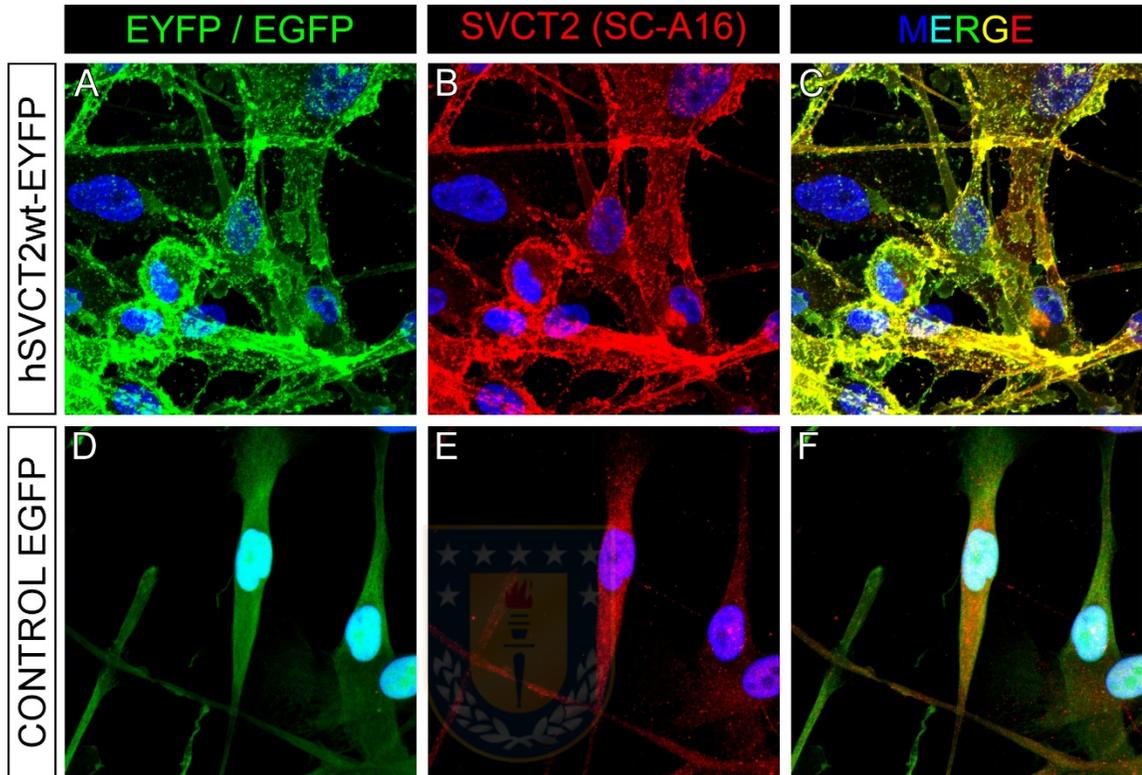
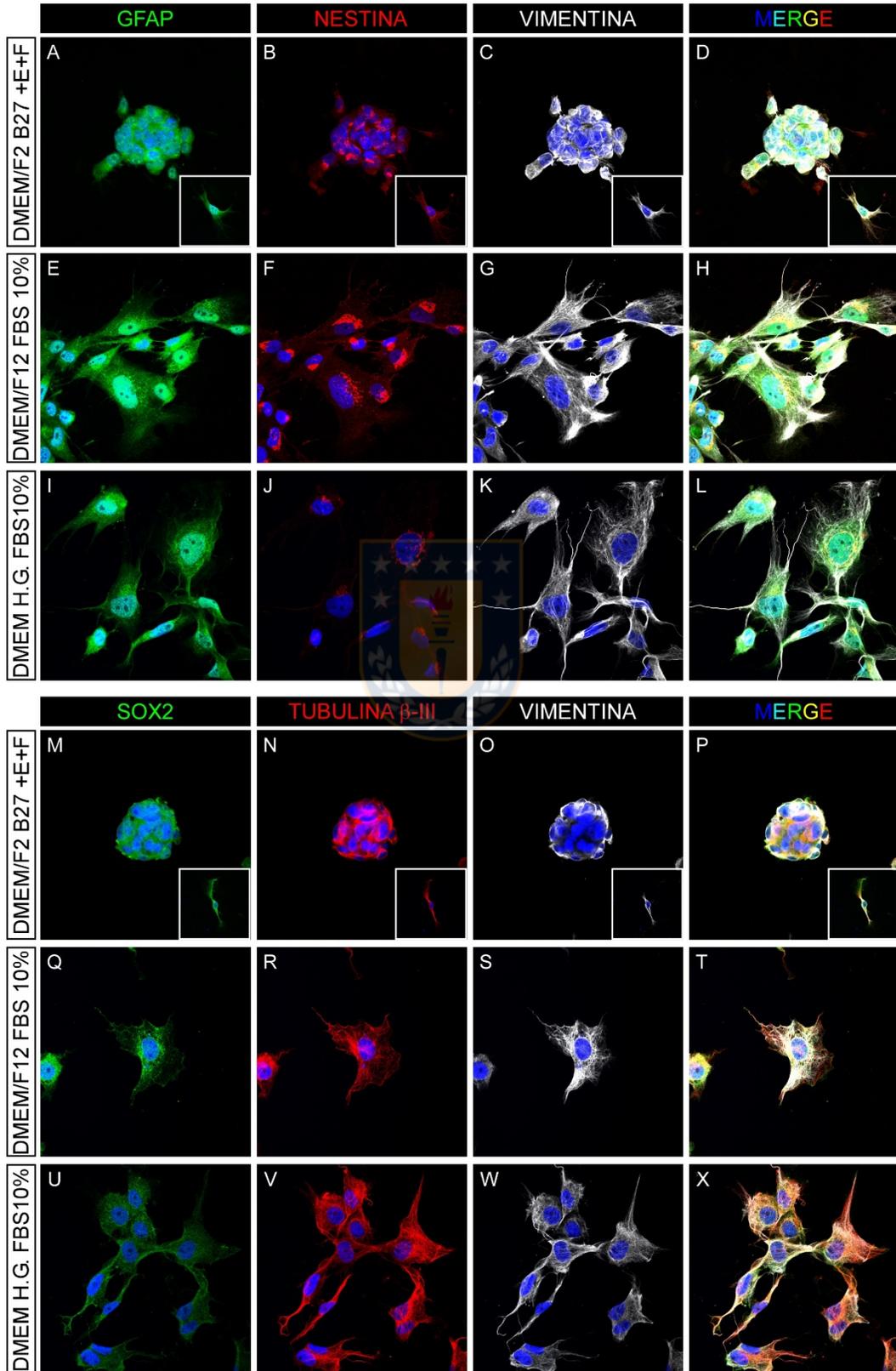


Figura Suplementaria 5. Validación del anticuerpo SC-A16 por la sobreexpresión de SVCT2 en células U87MG de glioblastoma. Las células U87MG fueron transducidas con lentivirus hSVCT2wt-EYFP (A-C) o un lentivirus control EGFP (D-F). Después de 48 horas fueron fijadas con PFA 4% y se realizó inmunofluorescencia. Se observa la expresión de las proteínas fluorescentes en verde (A, D); y SVCT2 en rojo (B, E). Anticuerpo SVCT2 (SC-A16) (dilución 1/25). Microfotografías adquiridas con aumento óptico de 650X (con zoom digital 1,2).



Figura Suplementaria 6. Efecto del medio de cultivo sobre la expresión de marcadores de glioblastoma en células RAV27. Las células RAV27 fueron sembradas en medio DMEM/F12 suplementado con B27 y EGF (20ng/ml) y bFGF (20ng/ml) (A-D, M-P); Medio DMEM/F12 con FBS 10% (E-H, Q-T) y DMEM H.G. con FBS 10% (I-J, U-X). Se evaluaron GFAP (A, E, I), Nestina (B, F, J), Vimentina (C, G, K, O, S, W); Sox2 (M, Q, U) y Tubulina β -III (N, R, V). Los recuadros en A-D, M-P son microfotografías de células en adhesión en la condición de DMEM/F12 B27 +EGF +bFGF. Anticuerpos GFAP (DAKO, 1/200), Nestina (Millipore, 1/50), Vimentina (Millipore, 1/400), Sox2 (1/200) y β III tubulina (Promega, 1/1.000). Microfotografías adquiridas con aumento óptico a 400X.



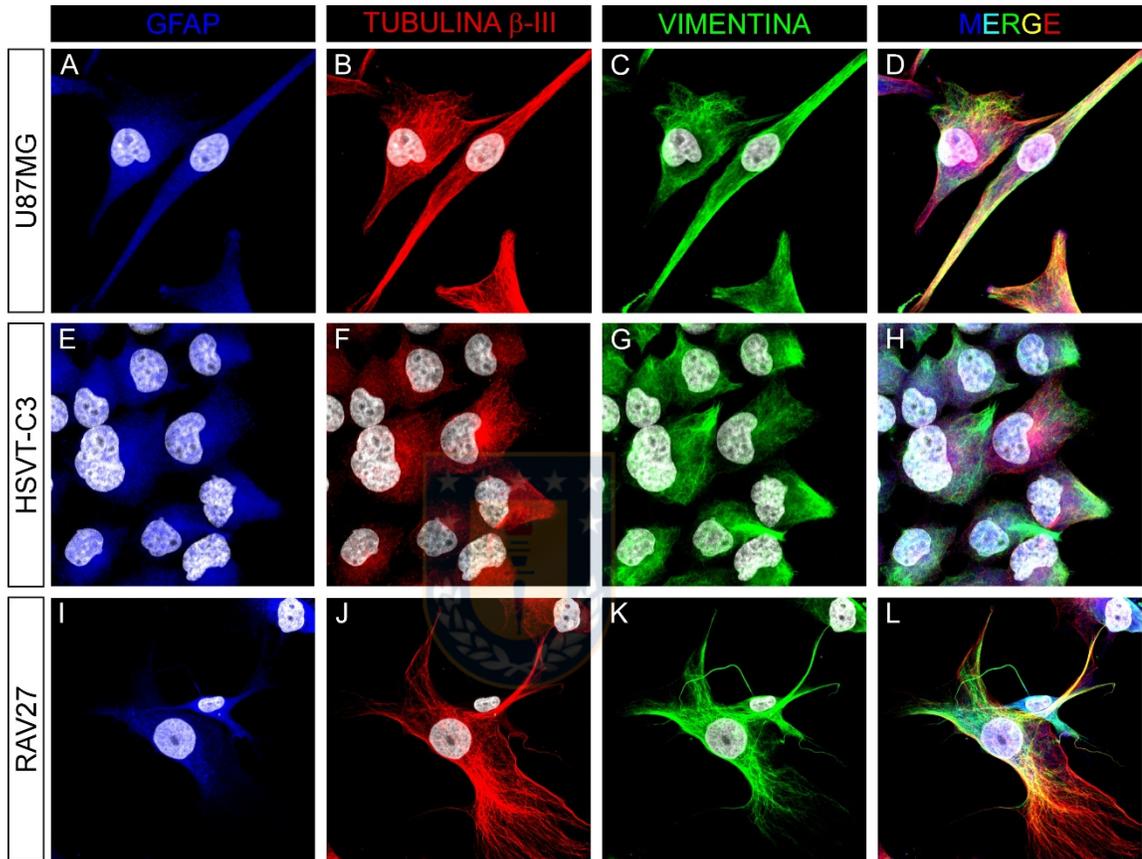


Figura Suplementaria 7. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores neurales en células de glioblastoma. Microscopía confocal espectral. Anticuerpos GFAP (DAKO, 1/200), Vimentina (Millipore, 1/400) y β III-tubulina (Promega, 1/1.000). Microfotografías adquiridas con aumento de 400X.

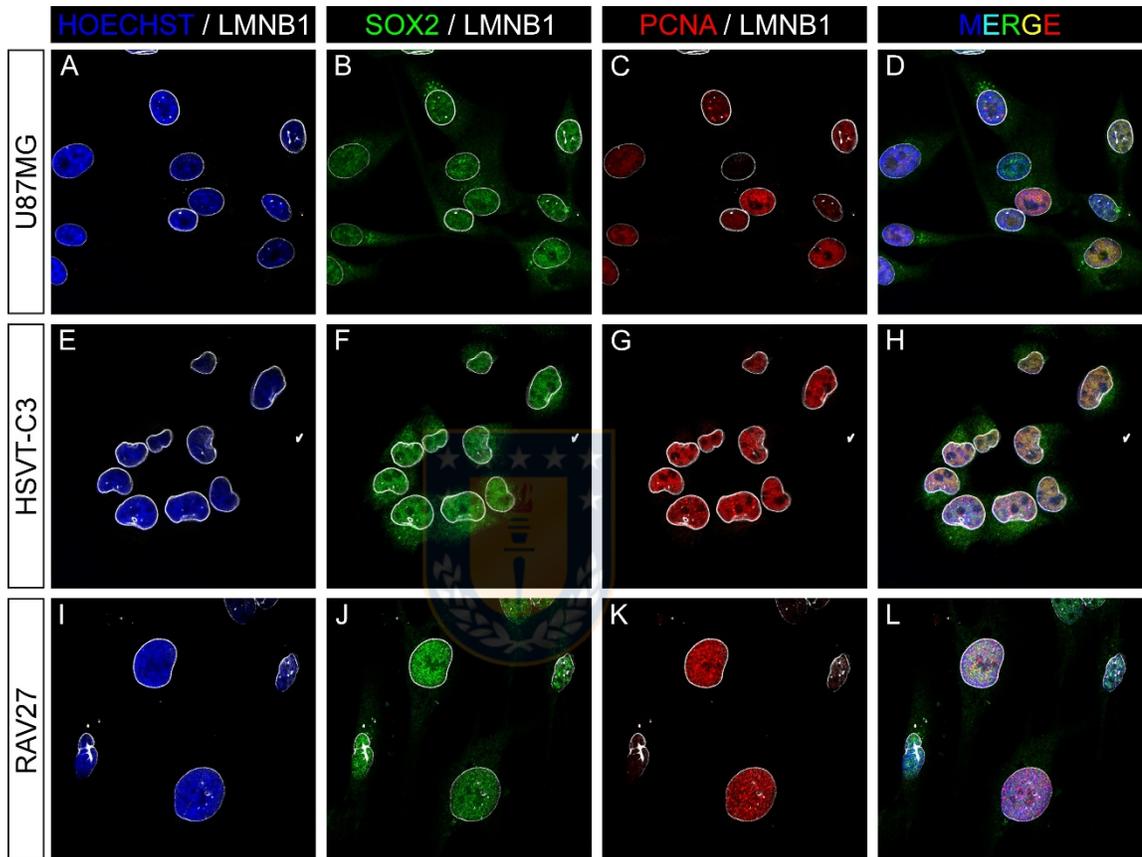


Figura Suplementaria 8. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores nucleares en células de glioblastoma. Microscopía confocal espectral. Anticuerpos LMNB1 (SC, 1/50), Sox2 (1/200) y PCNA (DAKO, 1/200). Microfotografías adquiridas con aumento a 400X

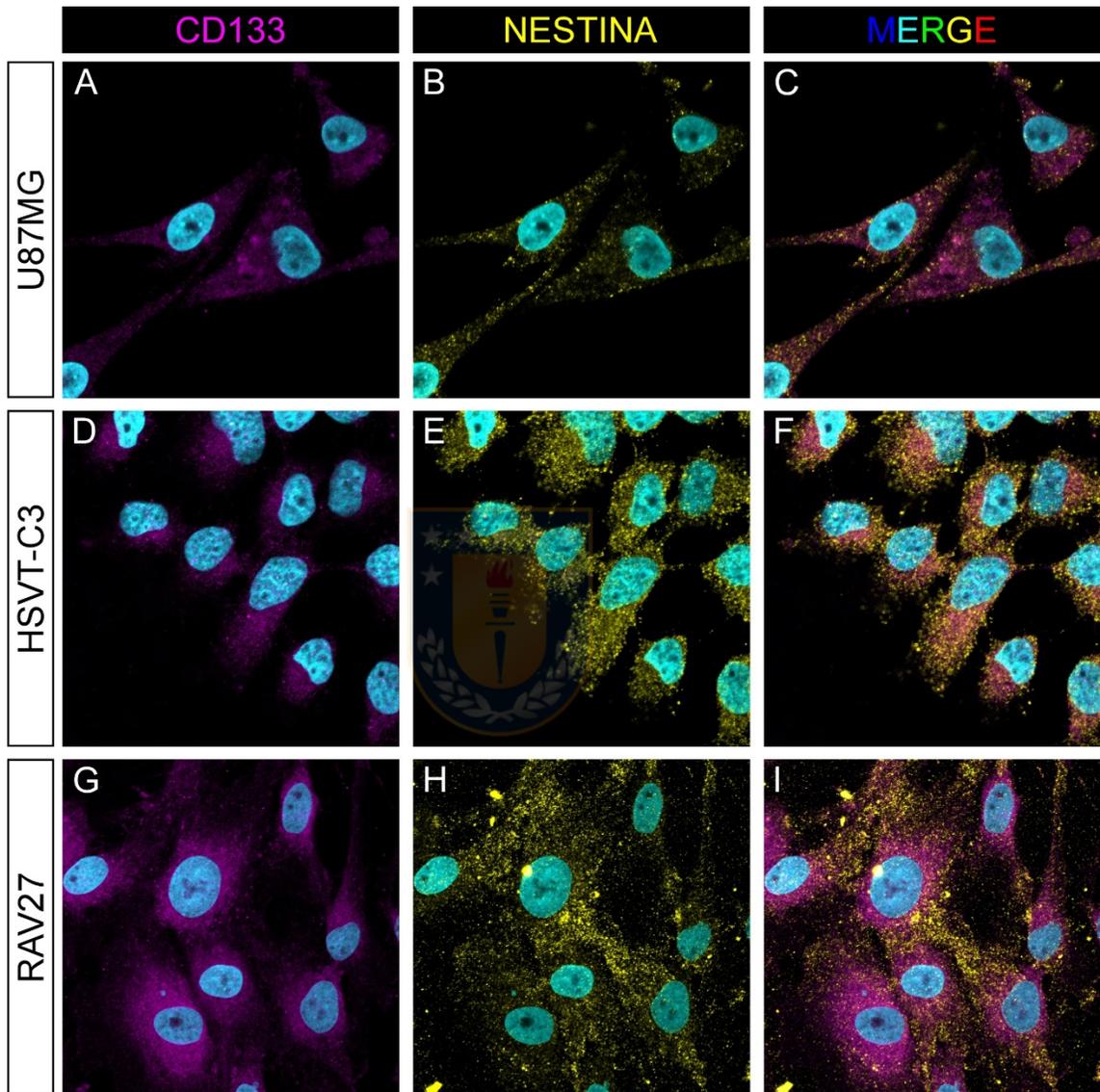


Figura Suplementaria 9. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores de Célula Troncal Neural en células de glioblastoma. Microscopía confocal espectral. Anticuerpos CD133 (Sigma, 1/100) y Nestina (Millipore, 1/50). Microfotografías adquiridas con aumento a 400X.

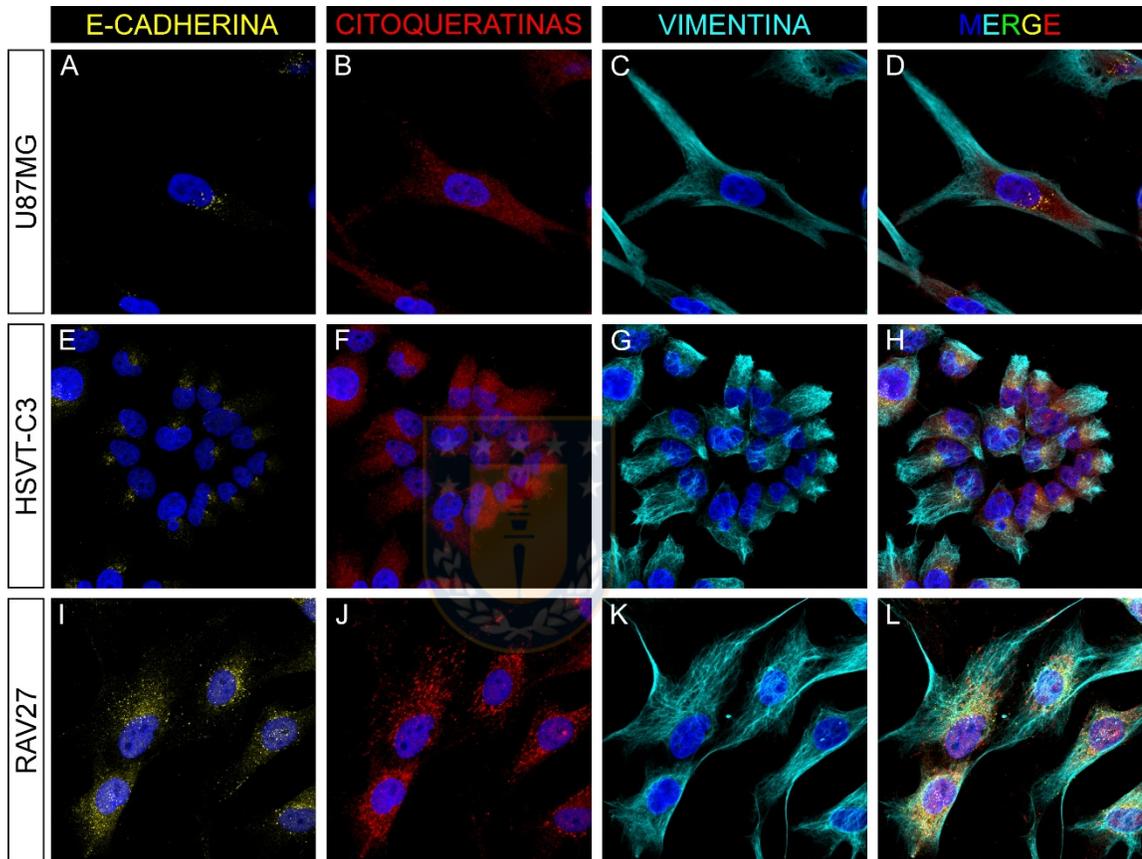


Figura Suplementaria 10. Inmunocitoquímica para la detección de marcadores epitelio/mesenquima en células de glioblastoma. Microscopía confocal espectral. Anticuerpos E-Cadherina (1/200), citoqueratinas (Millipore 1/200) y vimentina (Millipore, 1/400). Microfotografías adquiridas con aumento a 400X.

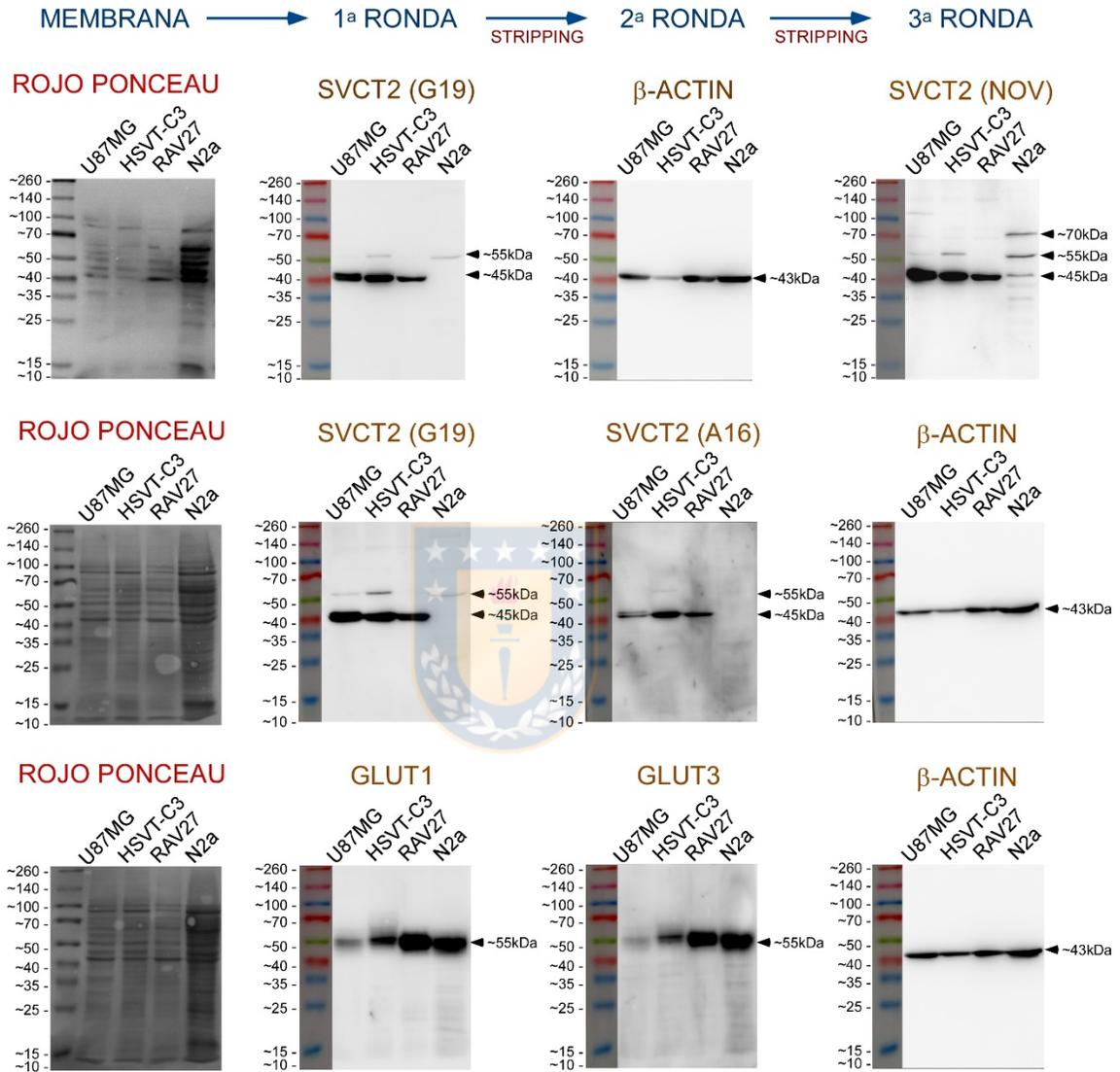


Figura Suplementaria 11. Western Blot para la detección de SVCT2, GLUT1 y GLUT3. Se muestran tres membranas que se emplearon en tres rondas de incubación con anticuerpos primarios y se reutilizaron realizando “stripping”. Anticuerpos: SVCT2 (SC-G19, 1/500; SC-A16, 1/500; Novus 1/2.000), GLUT1 (Millipore 1/5.000), GLUT3 (SC, 1/500) y β-Actina-HRP (SC, 1/50.000).

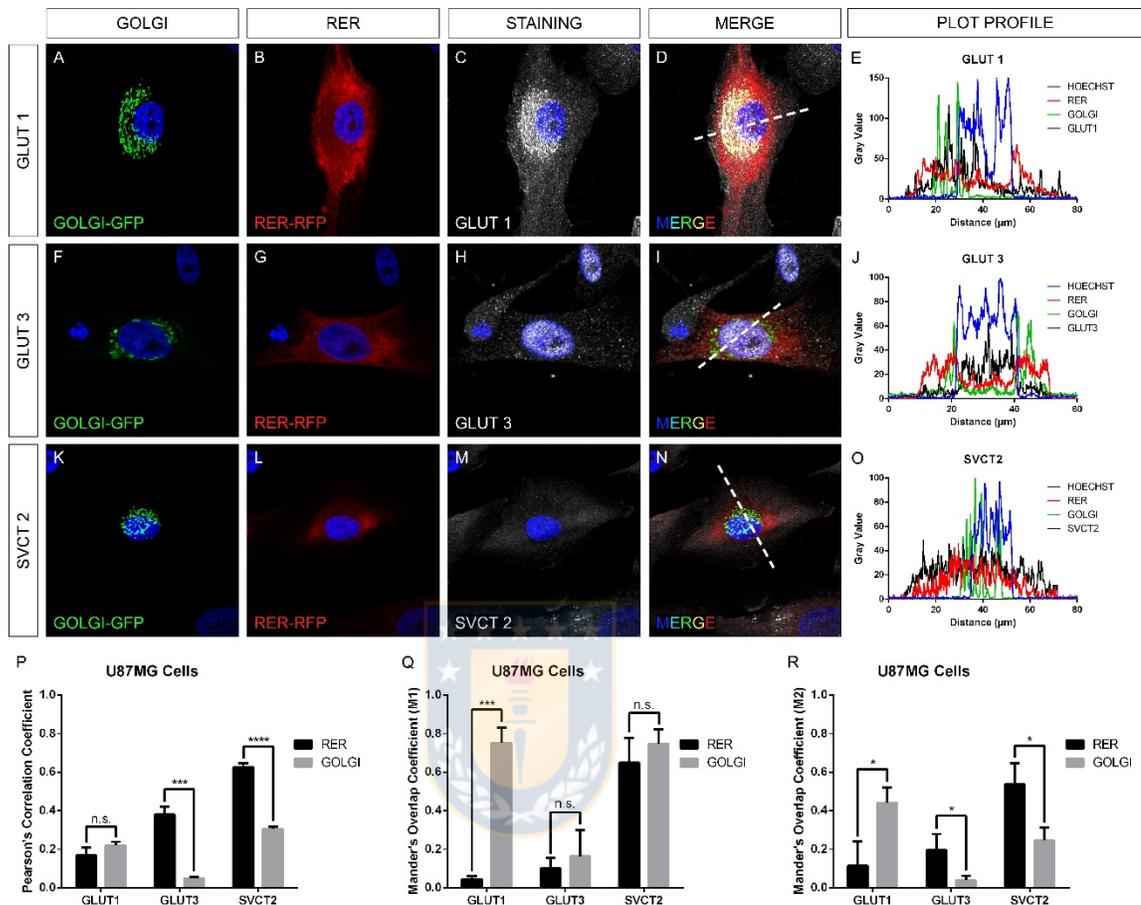


Figura Suplementaria 12. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante Sistema BacMam en células U87MG. Co-distribución de GLUT1 (C), GLUT3 (H) y SVCT2 (M) en color blanco con RER (B, G, L) o Golgi (A, F, K). Se muestra el “plot profile” para cada marcador (E, J, O) de la línea punteada en (D, I, N) respectivamente. Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson (P) y de superposiciones de Mander M1 (Q) y M2 (R). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas con aumento a 400X (con zoom digital).

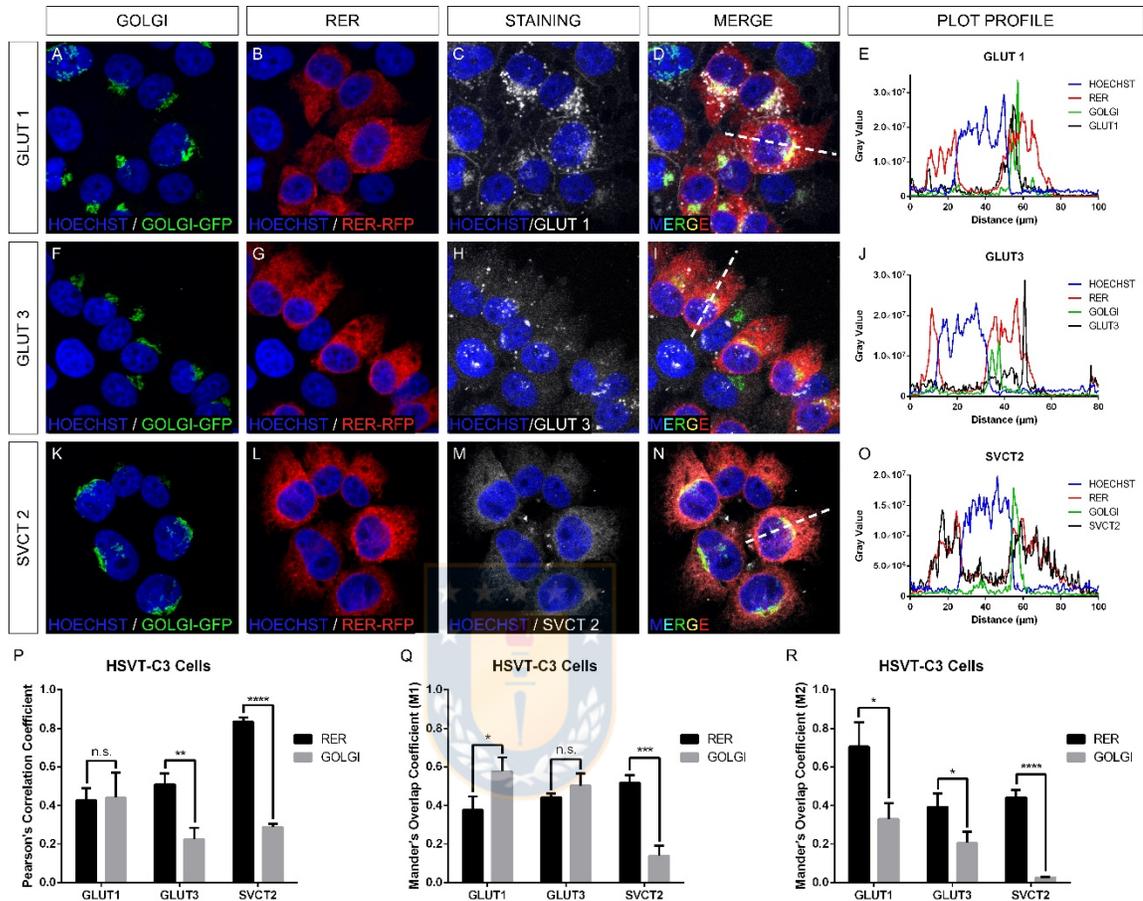


Figura Suplementaria 13. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante Sistema BacMam en células HSVT-C3. Co-distribución de GLUT1 (C), GLUT3 (H) y SVCT2 (M) en color blanco con RER (B, G, L) o Golgi (A, F, K). Se muestra el “plot profile” para cada marcador (E, J, O) de la línea punteada en D, I, N, respectivamente. Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson (P) y de superposiciones de Mander M1 (Q) y M2 (R). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). * p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas con aumento a 400X (con zoom digital).**

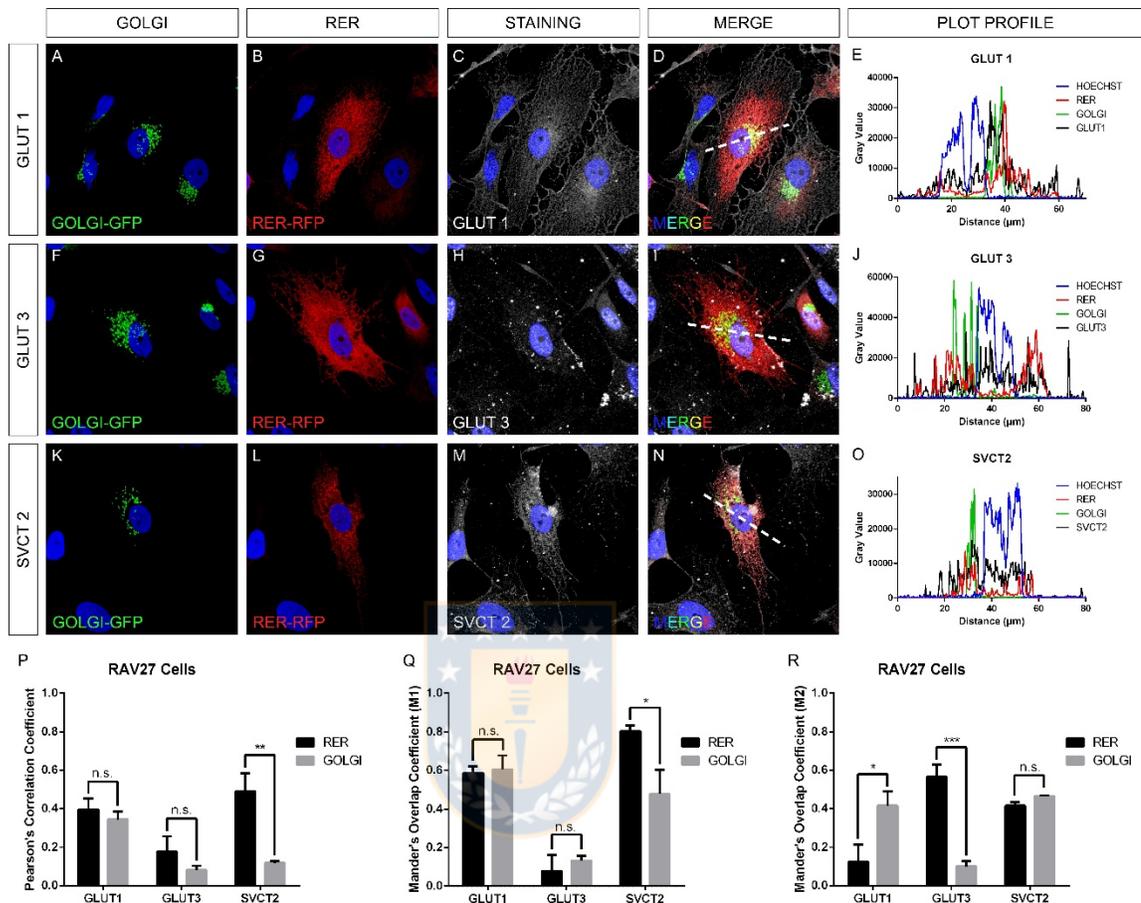


Figura Suplementaria 14. Análisis de la localización subcelular de los transportadores de vitamina C mediante sistema BacMam en células RAV27. Co-distribución de GLUT1 (C), GLUT3 (H) y SVCT2 (M) en color blanco con RER (B, G, L) o Golgi (A, F, K). Se muestra el “plot profile” para cada marcador (E, J, O) de la línea punteada en D, I, N, respectivamente. Análisis de los coeficientes de correlación de Pearson (P) y de superposiciones de Mander M1 (Q) y M2 (R). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; n.s. no significativo. Análisis estadístico de *t*-student. Microfotografías tomadas con aumento a 400X (con zoom digital).

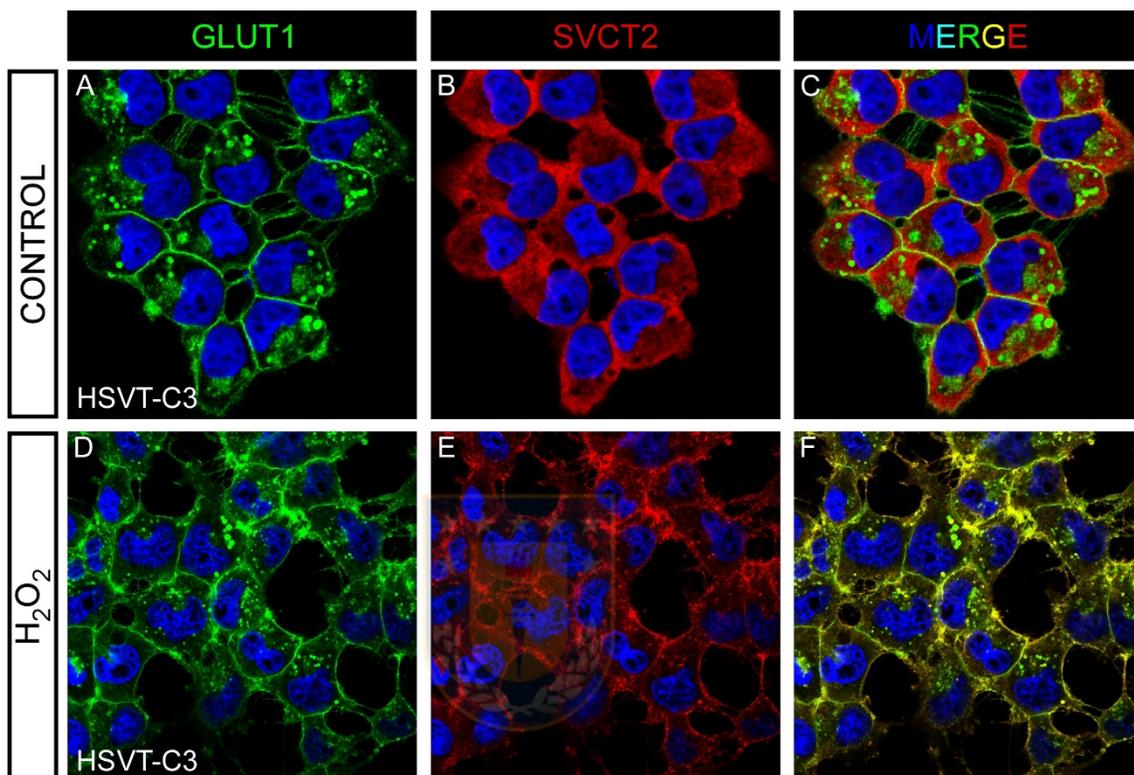


Figura Suplementaria 15. Efecto del Peróxido de Hidrógeno en la translocación de SVCT2 hacia la membrana de células HSVT-C3. Tinciones para GLUT1 (A, D) y SVCT2 (B, E). Las células fueron expuestas a H₂O₂ 1mM por 2 horas, posteriormente fueron fijadas. Anticuerpos: GLUT1 (Millipore, 1/500) y SVCT2 (SC-A16, 1/25). Microfotografías adquiridas con aumento a 400X (con zoom digital).

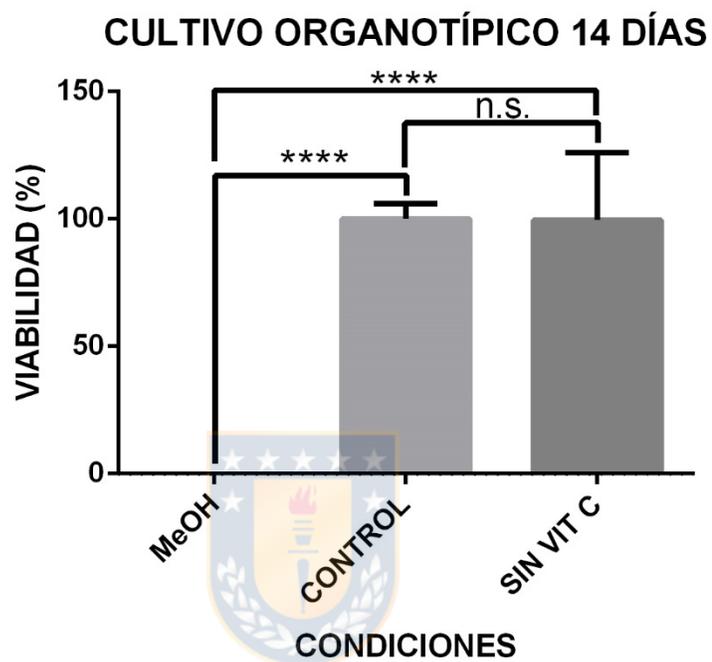


Figura Suplementaria 16. Viabilidad de las rebanadas de cerebro en cultivo hasta 14 DIV. La viabilidad de las rebanadas de cerebro en los cultivos organotípicos fue evaluada con el uso del MTT. Como control de la técnica, las rebanadas de cerebro son incubadas en Metanol (MeOH). Los experimentos fueron realizados al menos en triplicado, por cada condición. Todos los datos representan la media \pm SD (n=3). **** p <0,001, *** p <0,01, * p <0,05; n.s. no significativo. Análisis estadístico de t-student.

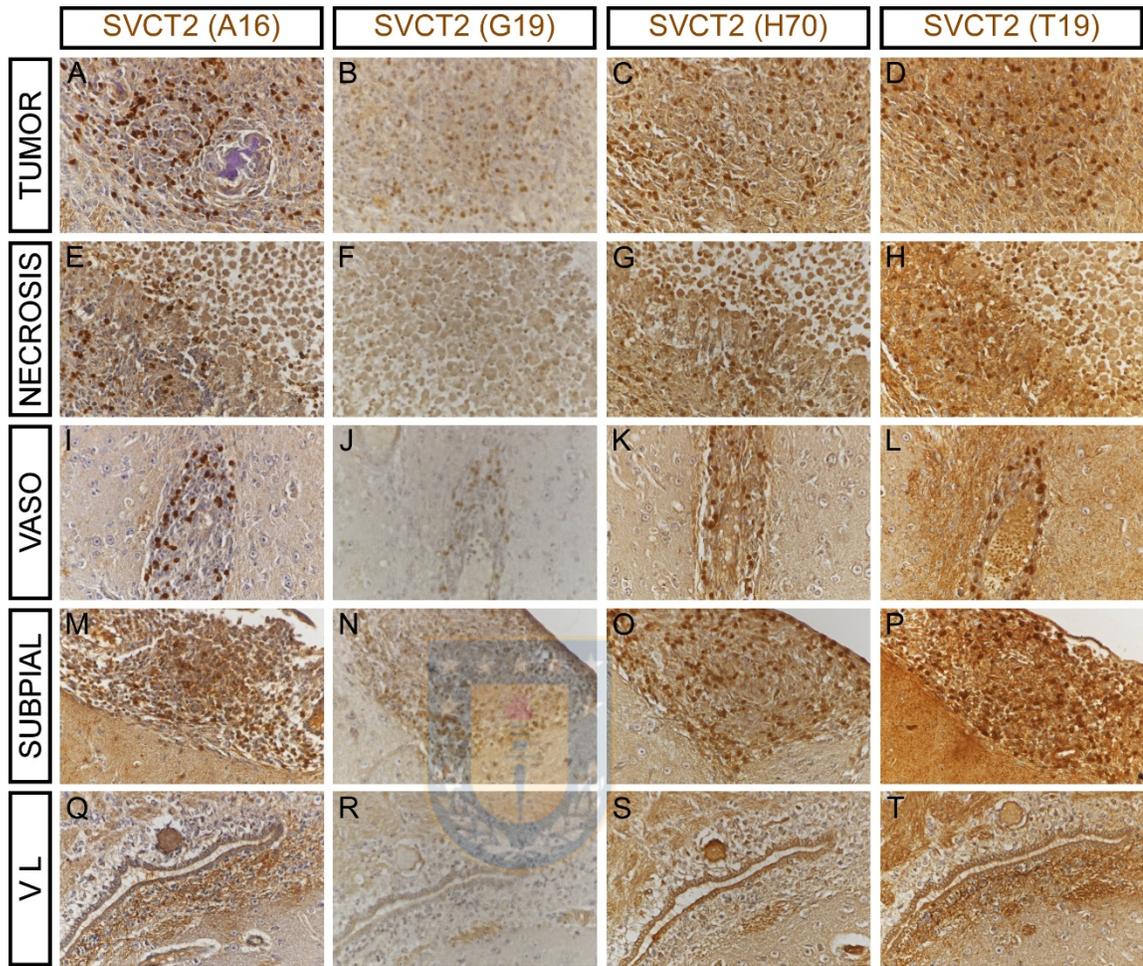


Figura Suplementaria 17. Evaluación de distintos anticuerpos para la detección de SVCT2 en cortes seriados de un tumor inducido con células U87MG en el parénquima de un cobayo. Tinción por inmunohistoquímica para SVCT2. Se muestran 5 regiones del cerebro del cobayo correspondientes a la masa tumoral (A-D), área necrótica (E-H), la co-optación de un vaso sanguíneo (I-L), la invasión subpial (M-P) y el ventrículo lateral (Q-T). Anticuerpos evaluados: Santa Cruz Biotechnology SC-A16 (A, E, I, M, Q); SC-G19 (B, F, J, N, R); SC-H70 (C, G, K, O, S) y SC-T19 (D, H, L, P, T). Todos los anticuerpos fueron empleados a dilución 1/25. Microfotografías tomadas con aumento a 400X.

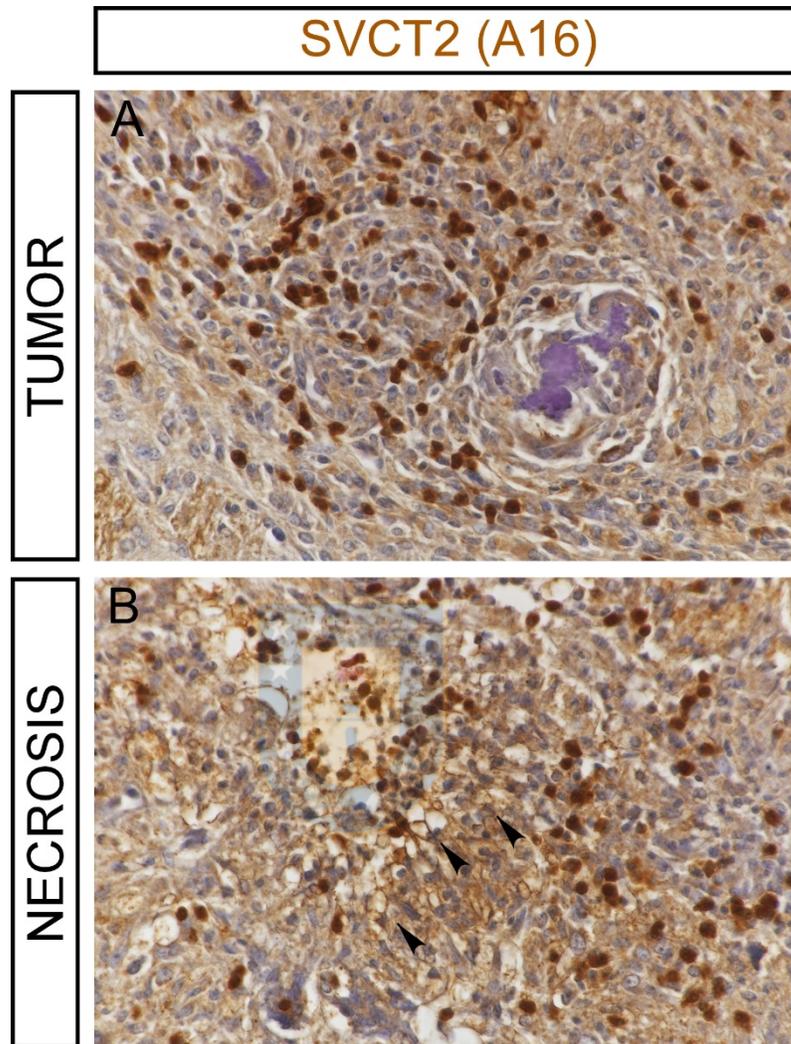


Figura Suplementaria 18. SVCT2 se localiza en la membrana plasmática de las células perinecroticas. Tinción por inmunohistoquímica para SVCT2. Se muestran la región tumoral (A) y la zona necrótica (B). Las cabezas de flecha señalan algunas células con SVCT2 en la membrana celular. Anticuerpo para SVCT2 (SC-A16, 1/25). Microfotografías tomadas con aumento a 400X.

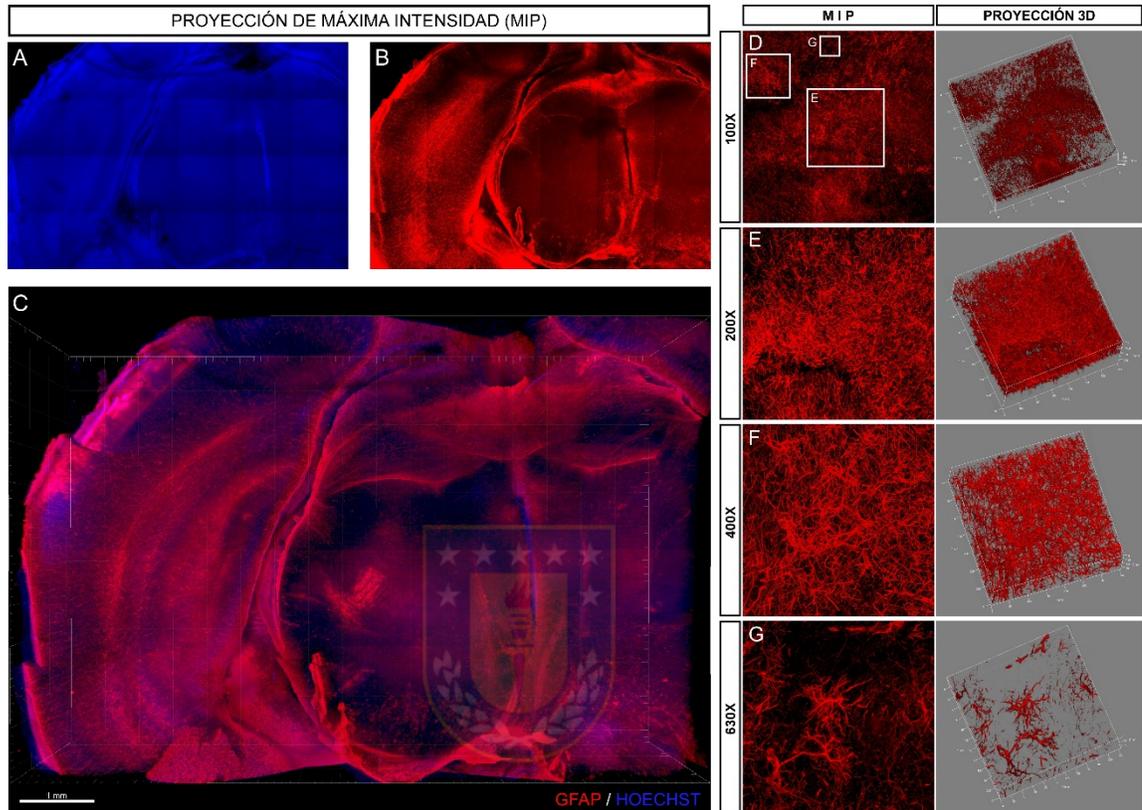


Figura Suplementaria 19. CLARITY para la detección de la red astrocítica en el cerebro de rata. Microscopía confocal espectral de un corte de 2mm de grosor. Reconstrucción en mosaico (tile Scan) de la proyección de máxima intensidad de los núcleos (A), GFAP (B) y su empalme (C). Se evaluó la distancia de trabajo para los objetivos con aumentos a 100X (D), 200X (E), 400X (F) y 630X (G). Anticuerpo GFAP (DAKO, 1/200). Microfotografías adquiridas con aumento de 100 a 630X.

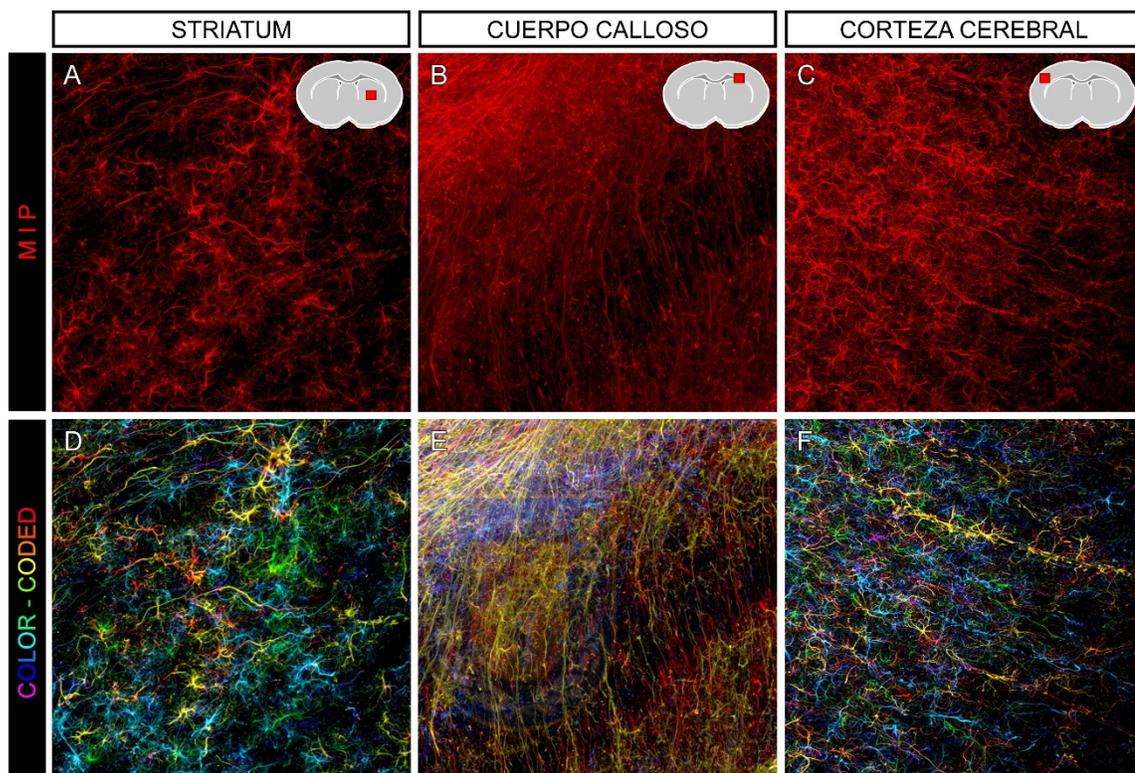


Figura Suplementaria 20. Diferencias de la red actrocítica en diferentes regiones del cerebro. Microscopía confocal espectral de un corte de 2mm de grosor. Proyección de máxima intensidad (A, B, C) y aplicando un código de color de acuerdo a la profundidad (D, E, F) del cuerpo estriado (A, D), del cuerpo calloso (B, E) y la corteza cerebral (C, F). Anticuerpo GFAP (DAKO, 1/200). Microfotografías adquiridas con aumento de 250X.

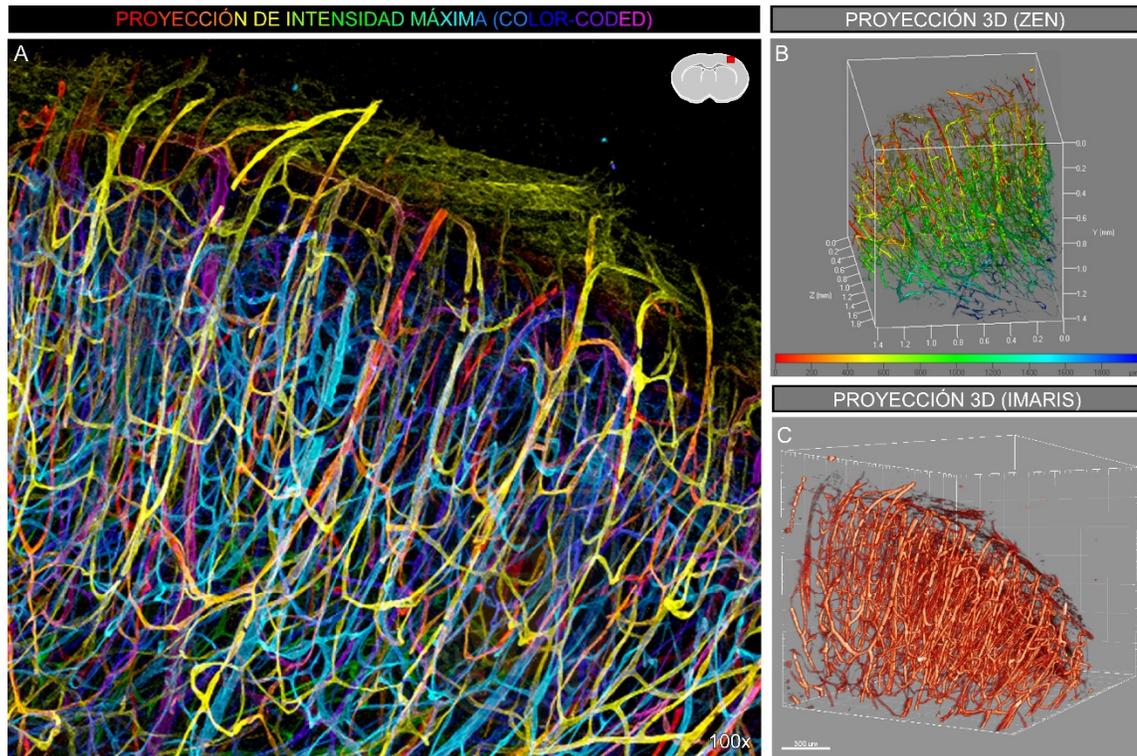


Figura Suplementaria 21. Red Vascular de la corteza cerebral externa. Microfotografías adquiridas con aumento de 100X mediante microscopía confocal espectral de un corte de 2mm de grosor. Proyección de máxima intensidad aplicando un código de color de acuerdo a la profundidad de 2000 planos focales (A). Reconstrucción tridimensional empleando el software ZEN (B) e IMARIS (C). Anticuerpo GLUT1 (Millipore, 1/500).

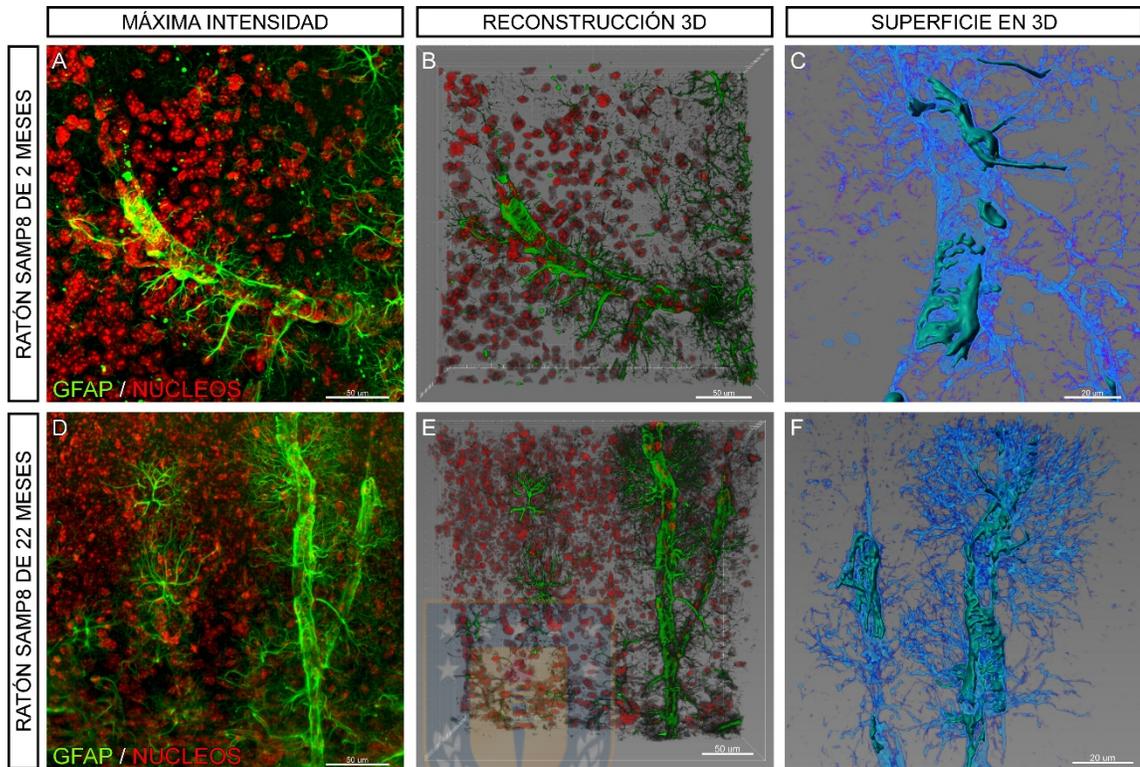


Figura Suplementaria 22. Diferencias estructurales de la barrera hematoencefálica en un modelo de deterioro cognitivo asociado al envejecimiento. Microscopía confocal espectral de cerebros de ratón SAMP8 de 2 (A-C) y 22 meses de edad (D-F). Proyección de máxima intensidad (A, D) para GFAP (verde) y núcleos (rojo). Reconstrucción 3D (B, C, E, F) y reconstrucción de superficie de la intensidad de GFAP (C, F). Reconstrucción tridimensional empleando el software ZEN (B) e IMARIS (C). Anticuerpo GFAP (DAKO, 1/200). Microfotografías adquiridas con aumento de 250X.

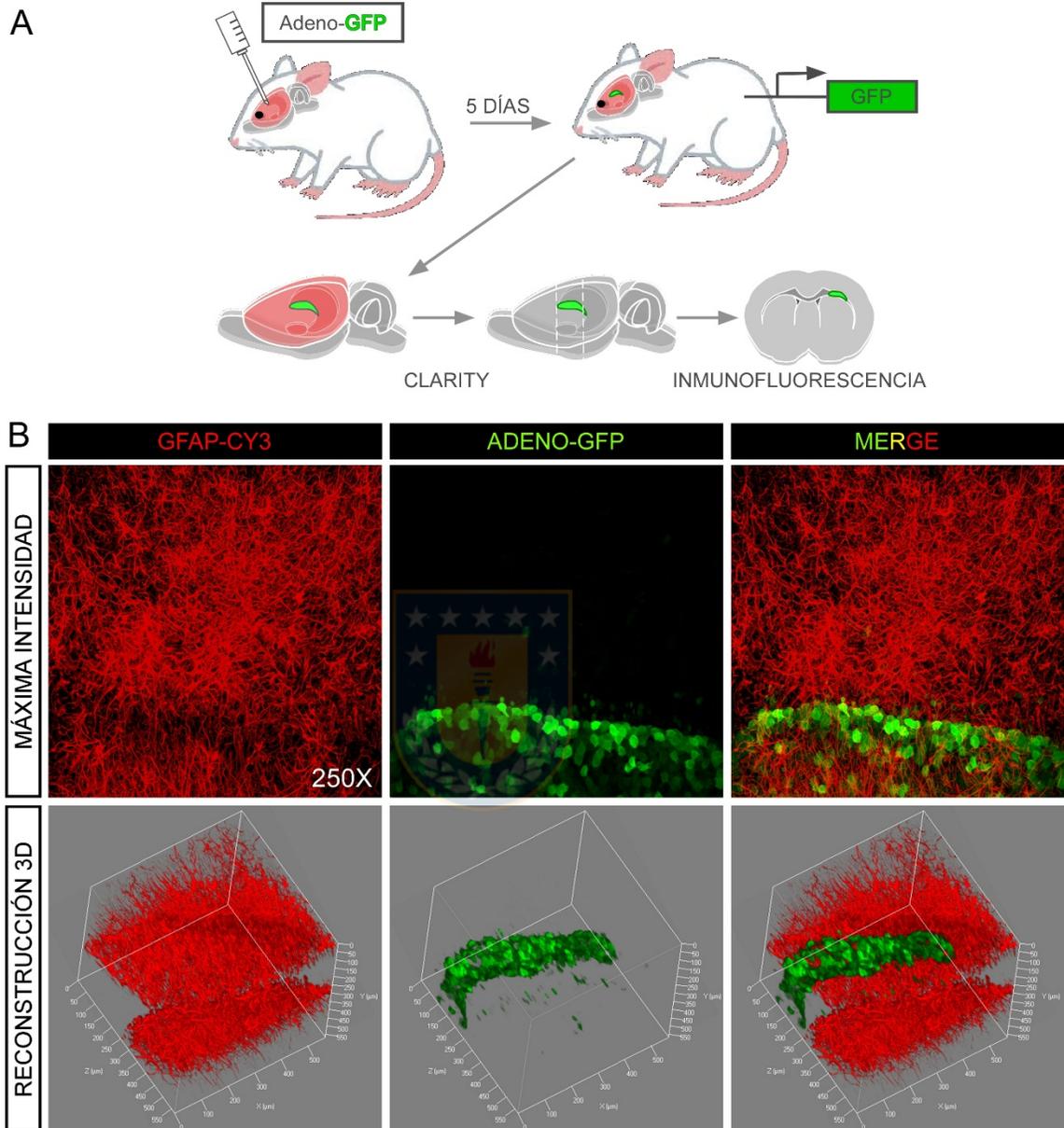


Figura Suplementaria 23. Análisis de la transducción adenoviral mediante CLARITY. Esquema de la inyección cerebro ventricular en ratas postnatales para la transducción de la GFP mediante un vector adenoviral (A). Microscopía confocal espectral (B). Inmunofluorescencia para GFAP (rojo) y la expresión de la GFP (verde). Se muestran las proyecciones de intensidad máxima y las reconstrucciones tridimensionales de las mismas. Anticuerpo para GFAP (DAKO, 1/200). Microfotografías adquiridas con aumento de 250X.

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATHOCLEOUS, M., MEACHAM, C. E., BURGESS, R. J., PISKOUNOVA, E., ZHAO, Z., CRANE, G. M., COWIN, B. L., BRUNER, E., MURPHY, M. M., CHEN, W., SPANGRUDE, G. J., HU, Z., DEBERARDINIS, R. J. & MORRISON, S. J. 2017. Ascorbate regulates haematopoietic stem cell function and leukaemogenesis. *Nature*, 549, 476-481.
- AGUS, D. B., GAMBHIR, S. S., PARDRIDGE, W. M., SPIELHOLZ, C., BASELGA, J., VERA, J. C. & GOLDE, D. W. 1997. Vitamin C crosses the blood-brain barrier in the oxidized form through the glucose transporters. *J Clin Invest*, 100, 2842-8.
- AIRLEY, R., EVANS, A., MOBASHERI, A. & HEWITT, S. M. 2010. Glucose transporter Glut-1 is detectable in peri-necrotic regions in many human tumor types but not normal tissues: Study using tissue microarrays. *Ann Anat*, 192, 133-8.
- ALGUEL, Y., AMILLIS, S., LEUNG, J., LAMBRINIDIS, G., CAPALDI, S., SCULL, N. J., CRAVEN, G., IWATA, S., ARMSTRONG, A., MIKROS, E., DIALLINAS, G., CAMERON, A. D. & BYRNE, B. 2016. Structure of eukaryotic purine/H(+) symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity. *Nat Commun*, 7, 11336.
- ALIEVA, M., LEIDGENS, V., RIEMENSCHNEIDER, M. J., KLEIN, C. A., HAU, P. & VAN RHEENEN, J. 2019. Intravital imaging of glioma border morphology reveals distinctive cellular dynamics and contribution to tumor cell invasion. *Sci Rep*, 9, 2054.
- ANGELOW, S., HASELBACH, M. & GALLA, H. J. 2003. Functional characterisation of the active ascorbic acid transport into cerebrospinal fluid using primary cultured choroid plexus cells. *Brain Res*, 988, 105-13.
- ASTUYA, A., CAPRILE, T., CASTRO, M., SALAZAR, K., GARCIA MDE, L., REINICKE, K., RODRIGUEZ, F., VERA, J. C., MILLAN, C., ULLOA, V., LOW, M., MARTINEZ, F. & NUALART, F. 2005. Vitamin C uptake and recycling among normal and tumor cells from the central nervous system. *J Neurosci Res*, 79, 146-56.
- AUBRY, M., DE TAYRAC, M., ETCHEVERRY, A., CLAVREUL, A., SAIKALI, S., MENEI, P. & MOSSER, J. 2015. From the core to beyond the margin: a genomic picture of glioblastoma intratumor heterogeneity. *Oncotarget*, 6, 12094-109.
- BANIC, S. 1981. Vitamin C acts as a cocarcinogen to methylcholanthrene in guinea-pigs. *Cancer Lett*, 11, 239-42.

- BAO, S., WU, Q., MCLENDON, R. E., HAO, Y., SHI, Q., HJELMELAND, A. B., DEWHIRST, M. W., BIGNER, D. D. & RICH, J. N. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-60.
- BARONE, A., SENGUPTA, R., WARRINGTON, N. M., SMITH, E., WEN, P. Y., BREKKEN, R. A., ROMAGNOLI, B., DOUGLAS, G., CHEVALIER, E., BAUER, M. P., DEMBOWSKY, K., PIWNICA-WORMS, D. & RUBIN, J. B. 2014. Combined VEGF and CXCR4 antagonism targets the GBM stem cell population and synergistically improves survival in an intracranial mouse model of glioblastoma. *Oncotarget*, 5, 9811-22.
- BARRON, C. C., BILAN, P. J., TSAKIRIDIS, T. & TSIANI, E. 2016. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. *Metabolism*, 65, 124-39.
- BIAN, X. W., YANG, S. X., CHEN, J. H., PING, Y. F., ZHOU, X. D., WANG, Q. L., JIANG, X. F., GONG, W., XIAO, H. L., DU, L. L., CHEN, Z. Q., ZHAO, W., SHI, J. Q. & WANG, J. M. 2007. Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. *Neurosurgery*, 61, 570-8; discussion 578-9.
- 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. & RAMALHO-SANTOS, M. 2013. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature*, 500, 222-6.
- BOADO, R. J., BLACK, K. L. & PARDRIDGE, W. M. 1994. Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Brain Res Mol Brain Res*, 27, 51-7.
- BRAT, D. J., CASTELLANO-SANCHEZ, A. A., HUNTER, S. B., PECOT, M., COHEN, C., HAMMOND, E. H., DEVI, S. N., KAUR, B. & 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, 920-7.
- BURZLE, M., SUZUKI, Y., ACKERMANN, D., MIYAZAKI, H., MAEDA, N., CLEMENCON, B., BURRIER, R. & HEDIGER, M. A. 2013. The sodium-dependent ascorbic acid transporter family SLC23. *Mol Aspects Med*, 34, 436-54.
- CAMERON, E. & 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, 3685-9.

- CAMERON, E. & PAULING, L. 1978. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 4538-42.
- CANOLL, P. & GOLDMAN, J. E. 2008. The interface between glial progenitors and gliomas. *Acta Neuropathol*, 116, 465-77.
- CAPRILE, T., SALAZAR, K., ASTUYA, A., CISTERNAS, P., SILVA-ALVAREZ, C., MONTECINOS, H., MILLAN, C., DE LOS ANGELES GARCIA, M. & NUALART, F. 2009. The Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporter SVCT2 expressed in brainstem cells, neurons, and neuroblastoma cells is inhibited by flavonoids. *J Neurochem*, 108, 563-77.
- CARRO, M. S., LIM, W. K., ALVAREZ, M. J., BOLLO, R. J., ZHAO, X., SNYDER, E. Y., SULMAN, E. P., ANNE, S. L., DOETSCH, F., COLMAN, H., LASORELLA, A., ALDAPE, K., CALIFANO, A. & IAVARONE, A. 2010. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature*, 463, 318-25.
- CASCIARI, J. J., RIORDAN, H. D., MIRANDA-MASSARI, J. R. & GONZALEZ, M. J. 2005. Effects of high dose ascorbate administration on L-10 tumor growth in guinea pigs. *P R Health Sci J*, 24, 145-50.
- CHA, J., ROOMI, M. W., IVANOV, V., KALINOVSKY, T., NIEDZWIECKI, A. & RATH, M. 2011. Ascorbate depletion increases growth and metastasis of melanoma cells in vitamin C deficient mice. *Exp Oncol*, 33, 226-30.
- CHA, J. H., YANG, W. H., XIA, W., WEI, Y., CHAN, L. C., LIM, S. O., LI, C. W., KIM, T., CHANG, S. S., LEE, H. H., HSU, J. L., WANG, H. L., KUO, C. W., CHANG, W. C., HADAD, S., PURDIE, C. A., MCCOY, A. M., CAI, S., TU, Y., LITTON, J. K., MITTENDORF, E. A., MOULDER, S. L., SYMMANS, W. F., THOMPSON, A. M., PIWNICA-WORMS, H., CHEN, C. H., KHOO, K. H. & HUNG, M. C. 2018. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*, 71, 606-620 e7.
- CHEN, J., LI, Y., YU, T. S., MCKAY, R. M., BURNS, D. K., KERNIE, S. G. & PARADA, L. F. 2012. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature*, 488, 522-6.
- CHEN, J., MAO, S., LI, H., ZHENG, M., YI, L., LIN, J. M. & LIN, Z. X. 2017. The pathological structure of the perivascular niche in different microvascular patterns of glioblastoma. *PLoS One*, 12, e0182183.
- CHEN, Q., ESPEY, M. G., SUN, A. Y., POOPUT, C., KIRK, K. L., KRISHNA, M. C., KHOSH, D. B., DRISKO, J. & LEVINE, M. 2008. Pharmacologic doses of

ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11105-9.

CHENG, L., HUANG, Z., ZHOU, W., WU, Q., DONNOLA, S., LIU, J. K., FANG, X., SLOAN, A. E., MAO, Y., LATHIA, J. D., MIN, W., MCLENDON, R. E., RICH, J. N. & BAO, S. 2013. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, 153, 139-52.

CHINTALA, S. K., GOKASLAN, Z. L., GO, Y., SAWAYA, R., NICOLSON, G. L. & RAO, J. S. 1996a. Role of extracellular matrix proteins in regulation of human glioma cell invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis*, 14, 358-66.

CHINTALA, S. K., SAWAYA, R., GOKASLAN, Z. L., FULLER, G. & RAO, J. S. 1996b. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in human glioma, both in vivo and in vitro. *Cancer Lett*, 101, 107-14.

CHINTALA, S. K., SAWAYA, R., GOKASLAN, Z. L. & RAO, J. S. 1996c. The effect of type III collagen on migration and invasion of human glioblastoma cell lines in vitro. *Cancer Lett*, 102, 57-63.

CHO, S., CHAE, J. S., SHIN, H., SHIN, Y., SONG, H., KIM, Y., YOO, B. C., ROH, K., CHO, S., KIL, E. J., BYUN, H. S., CHO, S. H., PARK, S., LEE, S. & YEOM, C. H. 2018. Hormetic dose response to L-ascorbic acid as an anti-cancer drug in colorectal cancer cell lines according to SVCT-2 expression. *Sci Rep*, 8, 11372.

CIMMINO, L., DOLGALEV, I., WANG, Y., YOSHIMI, A., MARTIN, G. H., WANG, J., NG, V., XIA, B., WITKOWSKI, M. T., MITCHELL-FLACK, M., GRILLO, I., BAKOGIANNI, S., NDIAYE-LOBRY, D., MARTIN, M. T., GUILLAMOT, M., BANH, R. S., XU, M., FIGUEROA, M. E., DICKINS, R. A., ABDEL-WAHAB, O., PARK, C. Y., TSIRIGOS, A., NEEL, B. G. & AIFANTIS, I. 2017. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*, 170, 1079-1095 e20.

CIMMINO, L., NEEL, B. G. & AIFANTIS, I. 2018. Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol*, 28, 698-708.

COHEN, M. P., FRANK, R. N. & KHALIFA, A. A. 1980. Collagen production by cultured retinal capillary pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 19, 90-4.

COSSET, E., ILMJARV, S., DUTOIT, V., ELLIOTT, K., VON SCHALSCHA, T., CAMARGO, M. F., REISS, A., MOROISHI, T., SEGUIN, L., GOMEZ, G., MOO, J. S., PREYNAT-SEAUVE, O., KRAUSE, K. H., CHNEIWEISS, H., SARKARIA, J. N., GUAN, K. L., DIETRICH, P. Y., WEIS, S. M., MISCHEL, P. S. & CHERESH, S. 2002. Identification of a novel integrin, alpha5beta1, as a component of the glioma stem cell niche. *Cell*, 110, 203-15.

- D. A. 2017. Glut3 Addiction Is a Druggable Vulnerability for a Molecularly Defined Subpopulation of Glioblastoma. *Cancer Cell*, 32, 856-868 e5.
- CREAGAN, E. T., MOERTEL, C. G., O'FALLON, J. R., SCHUTT, A. J., O'CONNELL, M. J., RUBIN, J. & 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, 687-90.
- CUDDAPAH, V. A., ROBEL, S., WATKINS, S. & SONTHEIMER, H. 2014. A neurocentric perspective on glioma invasion. *Nat Rev Neurosci*, 15, 455-65.
- D'ANIELLO, C., CERMOLA, F., PALAMIDESSI, A., WANDERLINGH, L. G., GAGLIARDI, M., MIGLIACCIO, A., VARRONE, F., CASALINO, L., MATARAZZO, M. R., DE CESARE, D., SCITA, G., PATRIARCA, E. J. & MINCHIOTTI, G. 2019. Collagen Prolyl Hydroxylation-Dependent Metabolic Perturbation Governs Epigenetic Remodeling and Mesenchymal Transition in Pluripotent and Cancer Cells. *Cancer Res*, 79, 3235-3250.
- DANG, L., WHITE, D. W., GROSS, S., BENNETT, B. D., BITTINGER, M. A., DRIGGERS, E. M., FANTIN, V. R., JANG, H. G., JIN, S., KEENAN, M. C., MARKS, K. M., PRINS, R. M., WARD, P. S., YEN, K. E., LIAU, L. M., RABINOWITZ, J. D., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B., VANDER HEIDEN, M. G. & SU, S. M. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462, 739-44.
- DARUWALA, R., SONG, J., KOH, W. S., RUMSEY, S. C. & LEVINE, M. 1999. Cloning and functional characterization of the human sodium-dependent vitamin C transporters hSVCT1 and hSVCT2. *FEBS Lett*, 460, 480-4.
- DE GOOIJER, M. C., GUILLEN NAVARRO, M., BERNARDS, R., WURDINGER, T. & VAN TELLINGEN, O. 2018. An Experimenter's Guide to Glioblastoma Invasion Pathways. *Trends Mol Med*, 24, 763-780.
- DENG, D., SUN, P., YAN, C., KE, M., JIANG, X., XIONG, L., REN, W., HIRATA, K., YAMAMOTO, M., FAN, S. & YAN, N. 2015. Molecular basis of ligand recognition and transport by glucose transporters. *Nature*, 526, 391-6.
- DENG, D., XU, C., SUN, P., WU, J., YAN, C., HU, M. & YAN, N. 2014. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*, 510, 121-5.
- DENICOLAI, E., TABOURET, E., COLIN, C., METELLUS, P., NANNI, I., BOUCARD, C., TCHOGHANDJIAN, A., MEYRONET, D., BAEZA-KALLEE, N., CHINOT, O. & FIGARELLA-BRANGER, D. 2016. Molecular heterogeneity of glioblastomas: does location matter? *Oncotarget*, 7, 902-913.

- DITROIA, S. P., PERCHARDE, M., GUERQUIN, M. J., WALL, E., COLLIGNON, E., EBATA, K. T., MESH, K., MAHESULA, S., AGATHOCLEOUS, M., LAIRD, D. J., LIVERA, G. & RAMALHO-SANTOS, M. 2019. Author Correction: Maternal vitamin C regulates reprogramming of DNA methylation and germline development. *Nature*, 576, E1.
- EBERT, B. L., FIRTH, J. D. & RATCLIFFE, P. J. 1995. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*, 270, 29083-9.
- ENGLARD, S. & SEIFTER, S. 1986. The biochemical functions of ascorbic acid. *Annu Rev Nutr*, 6, 365-406.
- FARIN, A., SUZUKI, S. O., WEIKER, M., GOLDMAN, J. E., BRUCE, J. N. & CANOLL, P. 2006. Transplanted glioma cells migrate and proliferate on host brain vasculature: a dynamic analysis. *Glia*, 53, 799-808.
- FERRADA, L., BARAHONA, M. J., SALAZAR, K., VANDENABEELE, P. & NUALART, F. 2020. Vitamin C controls neuronal necroptosis under oxidative stress. *Redox Biol*, 29, 101408.
- FERRADA, L., SALAZAR, K. & NUALART, F. 2019. Metabolic control by dehydroascorbic acid: Questions and controversies in cancer cells. *J Cell Physiol*, 234, 19331-19338.
- FERRIS, S. P., HOFMANN, J. W., SOLOMON, D. A. & PERRY, A. 2017. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch*, 471, 257-269.
- FLAVAHAN, W. A., WU, Q., HITOMI, M., RAHIM, N., KIM, Y., SLOAN, A. E., WEIL, R. J., NAKANO, I., SARKARIA, J. N., STRINGER, B. W., DAY, B. W., LI, M., LATHIA, J. D., RICH, J. N. & HJELMELAND, A. B. 2013. Brain tumor initiating cells adapt to restricted nutrition through preferential glucose uptake. *Nat Neurosci*, 16, 1373-82.
- GAO, P., ZHANG, H., DINAVAHI, R., LI, F., XIANG, Y., RAMAN, V., BHUJWALLA, Z. M., FELSHER, D. W., CHENG, L., PEVSNER, J., LEE, L. A., SEMENZA, G. L. & DANG, C. V. 2007. HIF-dependent antitumorigenic effect of antioxidants in vivo. *Cancer Cell*, 12, 230-8.
- GARCIA, C., DUBOIS, L. G., XAVIER, A. L., GERALDO, L. H., DA FONSECA, A. C., CORREIA, A. H., MEIRELLES, F., VENTURA, G., ROMAO, L., CANEDO, N. H., DE SOUZA, J. M., DE MENEZES, J. R., MOURA-NETO, V., TOVAR-MOLL, F. & LIMA, F. R. 2014. The orthotopic xenotransplant of human glioblastoma

successfully recapitulates glioblastoma-microenvironment interactions in a non-immunosuppressed mouse model. *BMC Cancer*, 14, 923.

GARCIA MDE, L., SALAZAR, K., MILLAN, C., RODRIGUEZ, F., MONTECINOS, H., CAPRILE, T., SILVA, C., CORTES, C., REINICKE, K., VERA, J. C., AGUAYO, L. G., OLATE, J., MOLINA, B. & NUALART, F. 2005. Sodium vitamin C cotransporter SVCT2 is expressed in hypothalamic glial cells. *Glia*, 50, 32-47.

GARCIA-KRAUSS, A., FERRADA, L., ASTUYA, A., SALAZAR, K., CISTERNAS, P., MARTINEZ, F., RAMIREZ, E. & NUALART, F. 2016. Dehydroascorbic Acid Promotes Cell Death in Neurons Under Oxidative Stress: a Protective Role for Astrocytes. *Mol Neurobiol*, 53, 5847-5863.

GEESIN, J. C., DARR, D., KAUFMAN, R., MURAD, S. & PINNELL, S. R. 1988. Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. *J Invest Dermatol*, 90, 420-4.

GODOY, A., ORMAZABAL, V., MORAGA-CID, G., ZUNIGA, F. A., SOTOMAYOR, P., BARRA, V., VASQUEZ, O., MONTECINOS, V., MARDONES, L., GUZMAN, C., VILLAGRAN, M., AGUAYO, L. G., ONATE, S. A., REYES, A. M., CARCAMO, J. G., RIVAS, C. I. & VERA, J. C. 2007. Mechanistic insights and functional determinants of the transport cycle of the ascorbic acid transporter SVCT2. Activation by sodium and absolute dependence on bivalent cations. *J Biol Chem*, 282, 615-24.

GODOY, A., ULLOA, V., RODRIGUEZ, F., REINICKE, K., YANEZ, A. J., GARCIA MDE, L., MEDINA, R. A., CARRASCO, M., BARBERIS, S., CASTRO, T., MARTINEZ, F., KOCH, X., VERA, J. C., POBLETE, M. T., FIGUEROA, C. D., PERUZZO, B., PEREZ, F. & NUALART, F. 2006. Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1-6 and GLUT9 in human cancer: ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol*, 207, 614-27.

GOHAR, O., WEISS, T., WINEMAN, E. & KESSLER, E. 2019. Ascorbic Acid Promotes Procollagen C-Proteinase Enhancer 1 Expression, Secretion, and Cell Membrane Localization. *Anat Rec (Hoboken)*.

GRITSENKO, P. G., ILINA, O. & FRIEDL, P. 2012. Interstitial guidance of cancer invasion. *J Pathol*, 226, 185-99.

GUTMANN, D. H. & KETTENMANN, H. 2019. Microglia/Brain Macrophages as Central Drivers of Brain Tumor Pathobiology. *Neuron*, 104, 442-449.

HAMBARDZUMYAN, D. & BERGERS, G. 2015. Glioblastoma: Defining Tumor Niches. *Trends Cancer*, 1, 252-265.

- HAMBARDZUMYAN, D., GUTMANN, D. H. & KETTENMANN, H. 2016. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*, 19, 20-7.
- HAN, J. & DANIEL, J. C. 1995. Biosynthesis of type VI collagen by glioblastoma cells and possible function in cell invasion of three-dimensional matrices. *Connect Tissue Res*, 31, 161-70.
- HAN, J., DANIEL, J. C. & PAPPAS, G. D. 1995. Expression of type VI collagen during glioblastoma cell invasion in brain tissue cultures. *Cancer Lett*, 88, 127-32.
- HASLUND-VINDING, J., MCBEAN, G., JAQUET, V. & VILHARDT, F. 2017. NADPH oxidases in oxidant production by microglia: activating receptors, pharmacology and association with disease. *Br J Pharmacol*, 174, 1733-1749.
- HEANEY, M. L., GARDNER, J. R., KARASAVVAS, N., GOLDE, D. W., SCHEINBERG, D. A., SMITH, E. A. & O'CONNOR, O. A. 2008. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res*, 68, 8031-8.
- HENRIK HEILAND, D., RAVI, V. M., BEHRINGER, S. P., FRENKING, J. H., WURM, J., JOSEPH, K., GARRELF, N. W. C., STRAHLE, J., HEYNCKES, S., GRAUVOGEL, J., FRANCO, P., MADER, I., SCHNEIDER, M., POTTHOFF, A. L., DELEV, D., HOFMANN, U. G., FUNG, C., BECK, J., SANKOWSKI, R., PRINZ, M. & SCHNELL, O. 2019. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun*, 10, 2541.
- INUKAI, M., HARA, A., YASUI, Y., KUMABE, T., MATSUMOTO, T. & SAEGUSA, M. 2015. Hypoxia-mediated cancer stem cells in pseudopalisades with activation of hypoxia-inducible factor-1alpha/Akt axis in glioblastoma. *Hum Pathol*, 46, 1496-505.
- JARA, N., CIFUENTES, M., MARTINEZ, F., SALAZAR, K. & NUALART, F. 2016. Cytoarchitecture, Proliferative Activity and Neuroblast Migration in the Subventricular Zone and Lateral Ventricle Extension of the Adult Guinea Pig Brain. *Stem Cells*.
- JEON, H., ONO, M., KUMAGAI, C., MIKI, K., MORITA, A. & KITAGAWA, Y. 1996. Pericytes from microvessel fragment produce type IV collagen and multiple laminin isoforms. *Biosci Biotechnol Biochem*, 60, 856-61.
- JOO, K. M., KIM, J., JIN, J., KIM, M., SEOL, H. J., MURADOV, J., YANG, H., CHOI, Y. L., PARK, W. Y., KONG, D. S., LEE, J. I., KO, Y. H., WOO, H. G., LEE, J., KIM, S. & NAM, D. H. 2013. Patient-specific orthotopic glioblastoma xenograft models

recapitulate the histopathology and biology of human glioblastomas in situ. *Cell Rep*, 3, 260-73.

JUNG, C. Y. & RAMPAL, A. L. 1977. Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts. *J Biol Chem*, 252, 5456-63.

KAPOOR, K., FINER-MOORE, J. S., PEDERSEN, B. P., CABONI, L., WAIGHT, A., HILLIG, R. C., BRINGMANN, P., HEISLER, I., MULLER, T., SIEBENEICHER, H. & STROUD, R. M. 2016. Mechanism of inhibition of human glucose transporter GLUT1 is conserved between cytochalasin B and phenylalanine amides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 4711-6.

KIM, E. J., PARK, Y. G., BAIK, E. J., JUNG, S. J., WON, R., NAHM, T. S. & LEE, B. H. 2005. Dehydroascorbic acid prevents oxidative cell death through a glutathione pathway in primary astrocytes. *J Neurosci Res*, 79, 670-9.

KIM, E. J., WON, R., SOHN, J. H., CHUNG, M. A., NAM, T. S., LEE, H. J. & LEE, B. H. 2008. Anti-oxidant effect of ascorbic and dehydroascorbic acids in hippocampal slice culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 366, 8-14.

KIM, J. E., CHO, H. S., YANG, H. S., JUNG, D. J., HONG, S. W., HUNG, C. F., LEE, W. J. & KIM, D. 2012. Depletion of ascorbic acid impairs NK cell activity against ovarian cancer in a mouse model. *Immunobiology*, 217, 873-81.

KISHIMOTO, Y., SAITO, N., KURITA, K., SHIMOKADO, K., MARUYAMA, N. & ISHIGAMI, A. 2013. Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 430, 579-84.

KOMAKI, S., SUGITA, Y., FURUTA, T., YAMADA, K., MORITSUBO, M., ABE, H., AKIBA, J., MIYAGI, N., NAKAMURA, H., MIYOSHI, H., OHSHIMA, K. & MORIOKA, M. 2019. Expression of GLUT1 in Pseudopalisaded and Perivascular Tumor Cells Is an Independent Prognostic Factor for Patients With Glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 78, 389-397.

KUIPER, C. & VISSERS, M. C. 2014. Ascorbate as a co-factor for fe- and 2-oxoglutarate dependent dioxygenases: physiological activity in tumor growth and progression. *Front Oncol*, 4, 359.

LATHIA, J. D., MACK, S. C., MULKEARNS-HUBERT, E. E., VALENTIM, C. L. & RICH, J. N. 2015. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev*, 29, 1203-17.

- LEE, Y. & RIO, D. C. 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem*, 84, 291-323.
- LI, X., HUANG, J. & MAY, J. M. 2003. Ascorbic acid spares alpha-tocopherol and decreases lipid peroxidation in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 305, 656-61.
- LIANG, W. J., JOHNSON, D., MA, L. S., JARVIS, S. M. & WEI-JUN, L. 2002. Regulation of the human vitamin C transporters expressed in COS-1 cells by protein kinase C [corrected]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C1696-704.
- LIEBES, L., KRIGEL, R., KUO, S., NEVRLA, D., PELLE, E. & SILBER, R. 1981. Increased ascorbic acid content in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 6481-4.
- LIU, C., SAGE, J. C., MILLER, M. R., VERHAAK, R. G., HIPPENMEYER, S., VOGEL, H., FOREMAN, O., BRONSON, R. T., NISHIYAMA, A., LUO, L. & ZONG, H. 2011. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell*, 146, 209-21.
- LIU, G., YUAN, X., ZENG, Z., TUNICI, P., NG, H., ABDULKADIR, I. R., LU, L., IRVIN, D., BLACK, K. L. & YU, J. S. 2006. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.
- LU, F., LI, S., JIANG, Y., JIANG, J., FAN, H., LU, G., DENG, D., DANG, S., ZHANG, X., WANG, J. & YAN, N. 2011. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA. *Nature*, 472, 243-6.
- LUTSENKO, E. A., CARCAMO, J. M. & GOLDE, D. W. 2004. A human sodium-dependent vitamin C transporter 2 isoform acts as a dominant-negative inhibitor of ascorbic acid transport. *Mol Cell Biol*, 24, 3150-6.
- LV, H., WANG, C., FANG, T., LI, T., LV, G., HAN, Q., YANG, W. & WANG, H. 2018. Vitamin C preferentially kills cancer stem cells in hepatocellular carcinoma via SVCT-2. *NPJ Precis Oncol*, 2, 1.
- MAHESPARAN, R., TYSNES, B. B., EDVARDBSEN, K., HAUGELAND, H. K., CABRERA, I. G., LUND-JOHANSEN, M., ENGBRAATEN, O. & BJERKVIG, R. 1997. Role of high molecular weight extracellular matrix proteins in glioma cell migration. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23, 102-12.

- MAHESPARAN, R., TYSNES, B. B., READ, T. A., ENGER, P. O., BJERKVIG, R. & LUND-JOHANSEN, M. 1999. Extracellular matrix-induced cell migration from glioblastoma biopsy specimens in vitro. *Acta Neuropathol*, 97, 231-9.
- MAMMOTO, T., JIANG, A., JIANG, E., PANIGRAHY, D., KIERAN, M. W. & MAMMOTO, A. 2013. Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *Am J Pathol*, 183, 1293-305.
- MANDL, J., SZARKA, A. & BANHEGYI, G. 2009. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 157, 1097-110.
- MARGITTAI, E., BANHEGYI, G., KISS, A., NAGY, G., MANDL, J., SCHAFF, Z. & CSALA, M. 2005. Scurvy leads to endoplasmic reticulum stress and apoptosis in the liver of Guinea pigs. *J Nutr*, 135, 2530-4.
- MARKOLOVIC, S., WILKINS, S. E. & SCHOFIELD, C. J. 2015. Protein Hydroxylation Catalyzed by 2-Oxoglutarate-dependent Oxygenases. *J Biol Chem*, 290, 20712-22.
- MARTINEZ-LAGE, M., LYNCH, T. M., BI, Y., COCITO, C., WAY, G. P., PAL, S., HALLER, J., YAN, R. E., ZIOBER, A., NGUYEN, A., KANDPAL, M., O'ROURKE, D. M., GREENFIELD, J. P., GREENE, C. S., DAVULURI, R. V. & DAHMANE, N. 2019. Immune landscapes associated with different glioblastoma molecular subtypes. *Acta Neuropathol Commun*, 7, 203.
- MAXFIELD, L. & CRANE, J. S. 2019. *Vitamin C Deficiency (Scurvy) [Updated 2019 Nov 19]*, In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493187/?report=classic>, StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- MAY, J. M., QU, Z. & MORROW, J. D. 2001. Mechanisms of ascorbic acid recycling in human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1528, 159-66.
- MAY, J. M. & QU, Z. C. 2005. Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 434, 178-86.
- MAY, J. M. & QU, Z. C. 2015. Ascorbic acid efflux from human brain microvascular pericytes: role of re-uptake. *Biofactors*, 41, 330-8.
- MCCARTY, M. F. 2013. Expression and/or activity of the SVCT2 ascorbate transporter may be decreased in many aggressive cancers, suggesting potential utility for

sodium bicarbonate and dehydroascorbic acid in cancer therapy. *Med Hypotheses*, 81, 664-70.

MIGLIOZZI, J. A. 1977. Effect of ascorbic acid on tumour growth. *Br J Cancer*, 35, 448-53.

MOERTEL, C. G., FLEMING, T. R., CREAGAN, E. T., RUBIN, J., O'CONNELL, M. J. & 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, 137-41.

MORGELLO, S., USON, R. R., SCHWARTZ, E. J. & HABER, R. S. 1995. The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia*, 14, 43-54.

MORI, S., KURATA, Y., TAKEUCHI, Y., TOYAMA, M., MAKINO, S. & FUKUSHIMA, S. 1987. Influences of strain and diet on the promoting effects of sodium L-ascorbate in two-stage urinary bladder carcinogenesis in rats. *Cancer Res*, 47, 3492-5.

MOTEGI, H., KAMOSHIMA, Y., TERASAKA, S., KOBAYASHI, H. & HOUKIN, K. 2014. Type 1 collagen as a potential niche component for CD133-positive glioblastoma cells. *Neuropathology*, 34, 378-85.

MUN, G. H., KIM, M. J., LEE, J. H., KIM, H. J., CHUNG, Y. H., CHUNG, Y. B., KANG, J. S., HWANG, Y. I., OH, S. H., KIM, J. G., HWANG, D. H., SHIN, D. H. & LEE, W. J. 2006. Immunohistochemical study of the distribution of sodium-dependent vitamin C transporters in adult rat brain. *J Neurosci Res*, 83, 919-28.

MUNDEL, T. M., YLINIEMI, A. M., MAESHIMA, Y., SUGIMOTO, H., KIERAN, M. & KALLURI, R. 2008. Type IV collagen alpha6 chain-derived noncollagenous domain 1 (alpha6(IV)NC1) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Int J Cancer*, 122, 1738-44.

MURAD, S., GROVE, D., LINDBERG, K. A., REYNOLDS, G., SIVARAJAH, A. & PINNELL, S. R. 1981. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 2879-82.

MURAI, T., MORI, S., HOSONO, M., TAKASHIMA, A., MACHINO, S., OOHARA, T., YAMASHITA, H., MAKINO, S., MATSUDA, T., WANIBUCHI, H. & FUKUSHIMA, S. 1997. Strain differences in sensitivity to the promoting effect of sodium L-ascorbate in a two-stage rat urinary bladder carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res*, 88, 245-53.

- MYLLYLA, R., KUUTTI-SAVOLAINEN, E. R. & KIVIRIKKO, K. I. 1978. The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 83, 441-8.
- NAGAMATSU, S., KORNHAUSER, J. M., BURANT, C. F., SEINO, S., MAYO, K. E. & BELL, G. I. 1992. Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3, the brain facilitative glucose transporter isoform, and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem*, 267, 467-72.
- NAGAMATSU, S., SAWA, H., WAKIZAKA, A. & HOSHINO, T. 1993. Expression of facilitative glucose transporter isoforms in human brain tumors. *J Neurochem*, 61, 2048-53.
- NGO, B., VAN RIPER, J. M., CANTLEY, L. C. & YUN, J. 2019. Targeting cancer vulnerabilities with high-dose vitamin C. *Nat Rev Cancer*, 19, 271-282.
- NISHIKIMI, M., FUKUYAMA, R., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N. & YAGI, K. 1994. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem*, 269, 13685-8.
- NISHIKIMI, M., KAWAI, T. & YAGI, K. 1992. Guinea pigs possess a highly mutated gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the key enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in this species. *J Biol Chem*, 267, 21967-72.
- NISHIOKA, T., ODA, Y., SEINO, Y., YAMAMOTO, T., INAGAKI, N., YANO, H., IMURA, H., SHIGEMOTO, R. & KIKUCHI, H. 1992. Distribution of the glucose transporters in human brain tumors. *Cancer Res*, 52, 3972-9.
- NUALART, F., MACK, L., GARCIA, A., CISTERNAS, P., BONGARZONE, E. R., HEITZER, M., JARA, N., MARTINEZ, F., FERRADA, L., ESPINOZA, F., BAEZA, V. & SALAZAR, K. 2014. Vitamin C Transporters, Recycling and the Bystander Effect in the Nervous System: SVCT2 versus Gluts. *J Stem Cell Res Ther*, 4, 209.
- NUALART, F. J., RIVAS, C. I., MONTECINOS, V. P., GODOY, A. S., GUAQUIL, V. H., GOLDE, D. W. & VERA, J. C. 2003. Recycling of vitamin C by a bystander effect. *J Biol Chem*, 278, 10128-33.
- OGAWA, K., OGUCHI, M., NAKASHIMA, Y. & YAMABE, H. 1989. Distribution of collagen type IV in brain tumors: an immunohistochemical study. *J Neurooncol*, 7, 357-66.
- OHGAKI, H., BURGER, P. & KLEIHUES, P. 2014. Definition of primary and secondary glioblastoma--response. *Clin Cancer Res*, 20, 2013.

- OHGAKI, H. & KLEIHUES, P. 2013. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 19, 764-72.
- PADAYATTY, S. J. & LEVINE, M. 2016. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis*, 22, 463-93.
- PARKER, W. H., QU, Z. C. & MAY, J. M. 2015. Ascorbic acid transport in brain microvascular pericytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 458, 262-7.
- PARSONS, K. K., MAEDA, N., YAMAUCHI, M., BANES, A. J. & KOLLER, B. H. 2006. Ascorbic acid-independent synthesis of collagen in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290, E1131-9.
- PASTOR, P., CISTERNAS, P., SALAZAR, K., SILVA-ALVAREZ, C., OYARCE, K., JARA, N., ESPINOZA, F., MARTINEZ, A. D. & NUALART, F. 2013. SVCT2 vitamin C transporter expression in progenitor cells of the postnatal neurogenic niche. *Front Cell Neurosci*, 7, 119.
- PAULING, L., NIXON, J. C., STITT, F., MARCUSON, R., DUNHAM, W. B., BARTH, R., BENSCH, K., HERMAN, Z. S., BLAISDELL, B. E., TSAO, C. & ET AL. 1985. Effect of dietary ascorbic acid on the incidence of spontaneous mammary tumors in RIII mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 5185-9.
- PENA, E., ROA, F. J., INOSTROZA, E., SOTOMAYOR, K., GONZALEZ, M., GUTIERREZ-CASTRO, F. A., MAURIN, M., SWEET, K., LABROUSSE, C., GATICA, M., AYLWIN, C. F., MENDOZA, P., MALDONADO, M., DELGADO, C., MADARIAGA, J., PANES, J., SILVA-GRECCHI, T., CONCHA, II, MORAGA-CID, G., REYES, A. M., MUNOZ-MONTESINO, C., VERA, J. C. & RIVAS, C. I. 2019. Increased expression of mitochondrial sodium-coupled ascorbic acid transporter-2 (mitSVCT2) as a central feature in breast cancer. *Free Radic Biol Med*, 135, 283-292.
- PERRONE, G., HIDESHIMA, T., IKEDA, H., OKAWA, Y., CALABRESE, E., GORGUN, G., SANTO, L., CIRSTEIA, D., RAJE, N., CHAUHAN, D., BACCARANI, M., CAVO, M. & ANDERSON, K. C. 2009. Ascorbic acid inhibits antitumor activity of bortezomib in vivo. *Leukemia*, 23, 1679-86.
- PERRY, A. & WESSELING, P. 2016. Histologic classification of gliomas. *Handb Clin Neurol*, 134, 71-95.
- PLATTEN, M., KRETZ, A., NAUMANN, U., AULWURM, S., EGASHIRA, K., ISENMANN, S. & WELLER, M. 2003. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol*, 54, 388-92.

- POGUZHESKAYA, E., ARTAMONOV, D., BOLSHAKOVA, A., VLASOVA, O. & BEZPROZVANNY, I. 2014. Simplified method to perform CLARITY imaging. *Mol Neurodegener*, 9, 19.
- POINTER, K. B., CLARK, P. A., SCHROEDER, A. B., SALAMAT, M. S., ELICEIRI, K. W. & KUO, J. S. 2017. Association of collagen architecture with glioblastoma patient survival. *J Neurosurg*, 126, 1812-1821.
- PORTUGAL, C. C., SOCODATO, R., CANEDO, T., SILVA, C. M., MARTINS, T., COREIXAS, V. S., LOIOLA, E. C., GESS, B., ROHR, D., SANTIAGO, A. R., YOUNG, P., MINSHALL, R. D., PAES-DE-CARVALHO, R., AMBROSIO, A. F. & RELVAS, J. B. 2017. Caveolin-1-mediated internalization of the vitamin C transporter SVCT2 in microglia triggers an inflammatory phenotype. *Sci Signal*, 10.
- POZZER, D., INVENIZZI, R. W., BLAAUW, B., CANTONI, O. & ZITO, E. 2020. Ascorbic Acid Route to the Endoplasmic Reticulum: Function and Role in Disease. *Antioxid Redox Signal*.
- PUSKAS, F., GERGELY, P., JR., BANKI, K. & PERL, A. 2000. Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. *FASEB J*, 14, 1352-61.
- QIAO, H., BELL, J., JULIAO, S., LI, L. & MAY, J. M. 2009. Ascorbic acid uptake and regulation of type I collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 46, 15-24.
- QIAO, H. & 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. & MAY, J. M. 2007. Ascorbate transport by primary cultured neurons and its role in neuronal function and protection against excitotoxicity. *J Neurosci Res*, 85, 1046-56.
- RAJAN, D. P., HUANG, W., DUTTA, B., DEVOE, L. D., LEIBACH, F. H., GANAPATHY, V. & PRASAD, P. D. 1999. Human placental sodium-dependent vitamin C transporter (SVCT2): molecular cloning and transport function. *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 762-8.
- RAO, S., SENGUPTA, R., CHOE, E. J., WOERNER, B. M., JACKSON, E., SUN, T., LEONARD, J., PIWNICA-WORMS, D. & RUBIN, J. B. 2012. CXCL12 mediates trophic interactions between endothelial and tumor cells in glioblastoma. *PLoS One*, 7, e33005.

- RAVINDRAN, P., WILTSHIRE, S., DAS, K. & WILSON, R. B. 2018. Vitamin C deficiency in an Australian cohort of metropolitan surgical patients. *Pathology*, 50, 654-658.
- RICE, M. E. 2000. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci*, 23, 209-16.
- RICE, M. E. & RUSSO-MENNA, I. 1998. Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience*, 82, 1213-23.
- ROA, F. J., PENA, E., INOSTROZA, E., SOTOMAYOR, K., GONZALEZ, M., GUTIERREZ-CASTRO, F. A., MAURIN, M., SWEET, K., LABROUSSE, C., GATICA, M., AYLWIN, C. F., MENDOZA, P., MALDONADO, M., DELGADO, C., MADARIAGA, J., PANES, J., SILVA-GRECCHI, T., CONCHA, II, MORAGA-CID, G., REYES, A. M., MUNOZ-MONTESINO, C., VERA, J. C. & RIVAS, C. I. 2019. Data on SVCT2 transporter expression and localization in cancer cell lines and tissues. *Data Brief*, 25, 103972.
- ROHR, D., HALFTER, H., SCHULZ, J. B., YOUNG, P. & GESS, B. 2017. Sodium-dependent Vitamin C transporter 2 deficiency impairs myelination and remyelination after injury: Roles of collagen and demethylation. *Glia*, 65, 1186-1200.
- ROOMI, M. W., CHA, J., KALINOVSKY, T., ROOMI, N., NIEDZWIECKI, A. & RATH, M. 2015. Effect of a nutrient mixture on the localization of extracellular matrix proteins in HeLa human cervical cancer xenografts in female nude mice. *Exp Ther Med*, 10, 901-906.
- RUMSEY, S. C., KWON, O., XU, G. W., BURANT, C. F., SIMPSON, I. & LEVINE, M. 1997. Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid. *J Biol Chem*, 272, 18982-9.
- RYSZAWY, D., PUDELEK, M., CATAPANO, J., CIARACH, M., SETKOWICZ, Z., KONDURACKA, E., MADEJA, Z. & CZYZ, J. 2019. High doses of sodium ascorbate interfere with the expansion of glioblastoma multiforme cells in vitro and in vivo. *Life Sci*, 232, 116657.
- SALAZAR, K., CERDA, G., MARTINEZ, F., SARMIENTO, J. M., GONZALEZ, C., RODRIGUEZ, F., GARCIA-ROBLES, M., TAPIA, J. C., CIFUENTES, M. & NUALART, F. 2014. SVCT2 transporter expression is post-natally induced in cortical neurons and its function is regulated by its short isoform. *J Neurochem*, 130, 693-706.

- SALAZAR, K., MARTINEZ, F., PEREZ-MARTIN, M., CIFUENTES, M., TRIGUEROS, L., FERRADA, L., ESPINOZA, F., SALDIVIA, N., BERTINAT, R., FORMAN, K., OVIEDO, M. J., LOPEZ-GAMBERO, A. J., BONANSCO, C., BONGARZONE, E. R. & NUALART, F. 2018. SVCT2 Expression and Function in Reactive Astrocytes Is a Common Event in Different Brain Pathologies. *Mol Neurobiol*, 55, 5439-5452.
- SANAI, N., ALVAREZ-BUYLLA, A. & BERGER, M. S. 2005. Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med*, 353, 811-22.
- SANKARAPANDI, S., ZWEIER, J. L., MUKHERJEE, G., QUINN, M. T. & HUSO, D. L. 1998. Measurement and characterization of superoxide generation in microglial cells: evidence for an NADPH oxidase-dependent pathway. *Arch Biochem Biophys*, 353, 312-21.
- SAVINI, I., CATANI, M. V., ARNONE, R., ROSSI, A., FREGA, G., DEL PRINCIPE, D. & AVIGLIANO, L. 2007a. Translational control of the ascorbic acid transporter SVCT2 in human platelets. *Free Radic Biol Med*, 42, 608-16.
- SAVINI, I., ROSSI, A., CATANI, M. V., CECI, R. & AVIGLIANO, L. 2007b. Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, 361, 385-90.
- SCHERER, H. J. 1938. Structural Development in Gliomas. *The American Journal of Cancer*, 34, 333-351.
- SELIGER, C., MEYER, A. L., RENNER, K., LEIDGENS, V., MOECKEL, S., JACHNIK, B., DETTMER, K., TISCHLER, U., GERTHOFER, V., RAUER, L., UHL, M., PROESCHOLDT, M., BOGDHORN, U., RIEMENSCHNEIDER, M. J., OEFNER, P. J., KREUTZ, M., VOLLMANN-ZWERENZ, A. & HAU, P. 2016. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF-beta2. *Cell Cycle*, 15, 1755-66.
- SERRANO, O. K., PARROW, N. L., VIOLET, P. C., YANG, J., ZORNJAK, J., BASSEVILLE, A. & LEVINE, M. 2015. Antitumor effect of pharmacologic ascorbate in the B16 murine melanoma model. *Free Radic Biol Med*, 87, 193-203.
- SHI, R., HU, W., ZHANG, Y., GAO, S., SMITH, A. H., YE, J., CAI, L., GRAHAM, L. M. & LI, C. 2019. Ascorbate inducible N259 glycans on prolyl 4-hydroxylase subunit alpha1 promote hydroxylation and secretion of type I collagen. *Cell Mol Life Sci*, 76, 3449-3464.
- SIMPSON, I. A., CARRUTHERS, A. & VANNUCCI, S. J. 2007. Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1766-91.

- SIMPSON, I. A., DWYER, D., MALIDE, D., MOLEY, K. H., TRAVIS, A. & VANNUCCI, S. J. 2008. The facilitative glucose transporter GLUT3: 20 years of distinction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295, E242-53.
- SINGH, S. K., CLARKE, I. D., TERASAKI, M., BONN, V. E., HAWKINS, C., SQUIRE, J. & DIRKS, P. B. 2003. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 63, 5821-8.
- SINGH, S. K., HAWKINS, C., CLARKE, I. D., SQUIRE, J. A., BAYANI, J., HIDE, T., HENKELMAN, R. M., CUSIMANO, M. D. & DIRKS, P. B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432, 396-401.
- SOTIRIOU, S., GISPERT, S., CHENG, J., WANG, Y., CHEN, A., HOOGSTRATEN-MILLER, S., MILLER, G. F., KWON, O., LEVINE, M., GUTTENTAG, S. H. & NUSSBAUM, R. L. 2002. Ascorbic-acid transporter Slc23a1 is essential for vitamin C transport into the brain and for perinatal survival. *Nat Med*, 8, 514-7.
- SPIELHOLZ, C., GOLDE, D. W., HOUGHTON, A. N., NUALART, F. & VERA, J. C. 1997. Increased facilitated transport of dehydroascorbic acid without changes in sodium-dependent ascorbate transport in human melanoma cells. *Cancer Res*, 57, 2529-37.
- STAMFORD, J. A., KRUK, Z. L. & MILLAR, J. 1984. Regional differences in extracellular ascorbic acid levels in the rat brain determined by high speed cyclic voltammetry. *Brain Res*, 299, 289-95.
- STEED, T. C., TREIBER, J. M., PATEL, K., RAMAKRISHNAN, V., MERK, A., SMITH, A. R., CARTER, B. S., DALE, A. M., CHOW, L. M. & CHEN, C. C. 2016. Differential localization of glioblastoma subtype: implications on glioblastoma pathogenesis. *Oncotarget*, 7, 24899-907.
- STRAUME, O., CHAPPUIS, P. O., SALVESEN, H. B., HALVORSEN, O. J., HAUKAAS, S. A., GOFFIN, J. R., BEGIN, L. R., FOULKES, W. D. & AKSLEN, L. A. 2002. Prognostic importance of glomeruloid microvascular proliferation indicates an aggressive angiogenic phenotype in human cancers. *Cancer Res*, 62, 6808-11.
- SUBRAMANI, T., YEAP, S. K., HO, W. Y., HO, C. L., OMAR, A. R., AZIZ, S. A., RAHMAN, N. M. & ALITHEEN, N. B. 2014. Vitamin C suppresses cell death in MCF-7 human breast cancer cells induced by tamoxifen. *J Cell Mol Med*, 18, 305-13.
- SUN, H., GUO, D., SU, Y., YU, D., WANG, Q., WANG, T., ZHOU, Q., RAN, X. & ZOU, Z. 2014. Hyperplasia of pericytes is one of the main characteristics of microvascular architecture in malignant glioma. *PLoS One*, 9, e114246.

- SUN, X., JOHNSON, J. & ST JOHN, J. C. 2018. Global DNA methylation synergistically regulates the nuclear and mitochondrial genomes in glioblastoma cells. *Nucleic Acids Res*, 46, 5977-5995.
- SUNDBERG, C., NAGY, J. A., BROWN, L. F., FENG, D., ECKELHOEFER, I. A., MANSEAU, E. J., DVORAK, A. M. & DVORAK, H. F. 2001. Glomeruloid microvascular proliferation follows adenoviral vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-164 gene delivery. *Am J Pathol*, 158, 1145-60.
- TELANG, S., CLEM, A. L., EATON, J. W. & CHESNEY, J. 2007. Depletion of ascorbic acid restricts angiogenesis and retards tumor growth in a mouse model. *Neoplasia*, 9, 47-56.
- TOMER, R., YE, L., HSUEH, B. & DEISSEROTH, K. 2014. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nat Protoc*, 9, 1682-97.
- TSUKAGUCHI, H., TOKUI, T., MACKENZIE, B., BERGER, U. V., CHEN, X. Z., WANG, Y., BRUBAKER, R. F. & HEDIGER, M. A. 1999. A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature*, 399, 70-5.
- UCHIDA, N., BUCK, D. W., HE, D., REITSMA, M. J., MASEK, M., PHAN, T. V., TSUKAMOTO, A. S., GAGE, F. H. & WEISSMAN, I. L. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 14720-5.
- ULLOA, V., GARCIA-ROBLES, M., MARTINEZ, F., SALAZAR, K., REINICKE, K., PEREZ, F., GODOY, D. F., GODOY, A. S. & NUALART, F. 2013. Human choroid plexus papilloma cells efficiently transport glucose and vitamin C. *J Neurochem*, 127, 403-14.
- ULLOA, V., SALDIVIA, N., FERRADA, L., SALAZAR, K., MARTINEZ, F., SILVA-ALVAREZ, C., MAGDALENA, R., OVIEDO, M. J., MONTECINOS, H., TORRES-VERGARA, P., CIFUENTES, M. & NUALART, F. 2019. Basal Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 polarization in choroid plexus explant cells in normal or scorbutic conditions. *Sci Rep*, 9, 14422.
- 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. & 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.
- VOLLMANN-ZWERENZ, A., LEIDGENS, V., FELICIELLO, G., KLEIN, C. A. & HAU, P. 2020. Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *Int J Mol Sci*, 21.
- WATKINS, S., ROBEL, S., KIMBROUGH, I. F., ROBERT, S. M., ELLIS-DAVIES, G. & SONTHEIMER, H. 2014. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun*, 5, 4196.
- XU, Y., ZHANG, L., WEI, Y., ZHANG, X., XU, R., HAN, M., HUANG, B., CHEN, A., LI, W., ZHANG, Q., LI, G., WANG, J., ZHAO, P. & LI, X. 2017. Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 promotes hypoxia-induced glioma migration and invasion. *Oncotarget*, 8, 23401-23413.
- YANG, Y., ZHANG, K., CHEN, X., WANG, J., LEI, X., ZHONG, J., XIAN, J., QUAN, Y., LU, Y., HUANG, Q., CHEN, J., GE, H. & FENG, H. 2019. SVCT2 Promotes Neural Stem/Progenitor Cells Migration Through Activating CDC42 After Ischemic Stroke. *Front Cell Neurosci*, 13, 429.
- YU, X., YANG, G., YAN, C., BAYLON, J. L., JIANG, J., FAN, H., LU, G., HASEGAWA, K., OKUMURA, H., WANG, T., TAJKHORSHID, E., LI, S. & YAN, N. 2017. Dimeric structure of the uracil:proton symporter UraA provides mechanistic insights into the SLC4/23/26 transporters. *Cell Res*, 27, 1020-1033.
- YUN, J., MULLARKY, E., LU, C., BOSCH, K. N., KAVALIER, A., RIVERA, K., ROPER, J., CHIO, II, GIANNOPOULOU, E. G., RAGO, C., MULEY, A., ASARA, J. M., PAIK, J., ELEMENTO, O., CHEN, Z., PAPPIN, D. J., DOW, L. E., PAPADOPOULOS, N., GROSS, S. S. & CANTLEY, L. C. 2015. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. *Science*, 350, 1391-6.
- ZAGZAG, D., ESENCAY, M., MENDEZ, O., YEE, H., SMIRNOVA, I., HUANG, Y., CHIRIBOGA, L., LUKYANOV, E., LIU, M. & NEWCOMB, E. W. 2008. Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am J Pathol*, 173, 545-60.
- ZANDERS, E. D., SVENSSON, F. & BAILEY, D. S. 2019. Therapy for glioblastoma: is it working? *Drug Discov Today*, 24, 1193-1201.
- ZHAI, H., HEPPNER, F. L. & TSIRKA, S. E. 2011. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*, 59, 472-85.

ZHU, Z., DU, S., DU, Y., REN, J., YING, G. & YAN, Z. 2018. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. *J Neurochem*, 144, 93-104.

