

Tesis Doctoral

Establecimiento y estudio in vitro de células madre/progenitoras tumorales derivadas de gliomas de alto grado como fuente renovable para desarrollos terapéuticos

Videla Richardson, Guillermo Agustín

2014-04-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Videla Richardson, Guillermo Agustín. (2014-04-16). Establecimiento y estudio in vitro de células madre/progenitoras tumorales derivadas de gliomas de alto grado como fuente renovable para desarrollos terapéuticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Videla Richardson, Guillermo Agustín. "Establecimiento y estudio in vitro de células madre/progenitoras tumorales derivadas de gliomas de alto grado como fuente renovable para desarrollos terapéuticos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-04-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Establecimiento y estudio *in vitro* de células madre/progenitoras tumorales derivadas de gliomas de alto grado como fuente renovable para desarrollos terapéuticos

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Guillermo Agustín Videla Richardson

Director de tesis: Dra. María Elida Scassa

Consejero de estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Investigación Aplicada a Neurociencias (LIAN). Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI). Sede Escobar

Buenos Aires, 2014

Establecimiento y estudio *in vitro* de células madre/progenitoras tumorales derivadas de gliomas de alto grado como fuente renovable para desarrollos terapéuticos

RESUMEN

Los gliomas de alto grado son los tumores cerebrales primarios más frecuentes y son altamente agresivos e invasivos. Éstos parecen exhibir una organización jerárquica y se ha postulado que su generación ocurre a partir de células madre tumorales (CMT), las cuales corresponderían a una subpoblación minoritaria capaz de generar y propagar tumores al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes. De esta forma, el aislamiento y la caracterización de células tumorales derivadas de pacientes con fenotipo de células madre o progenitoras permite contar con un valioso modelo de estudio para comprender en mayor profundidad la biología de los gliomas.

En el presente trabajo logramos establecer con éxito nueve líneas de células madre/progenitoras tumorales (CMPT) a partir de biopsias de gliomas de alto grado. Éstas fueron capaces de generar tumores luego de ser inyectadas en el sistema nervioso central en ratones inmunodeficientes y presentaron las mismas alteraciones genéticas que se encontraron en los tumores parentales. Además, todas ellas fueron positivas para los marcadores de CMT: Nestina, Vimentina, CD44 y Sox2. Sin embargo, el grado de expresión de CD133 resultó ser variable en todas las líneas analizadas.

A pesar de las similitudes entre las CMPT y las células madre neurales, es concebible pensar que pueden existir diferencias en sus respectivos potenciales de diferenciación. Para responder este interrogante hemos sometido a estas líneas celulares a diversos protocolos de diferenciación basados principalmente en el agregado de BMP4 recombinante humano y en la privación de factores de crecimiento. Luego de analizar la expresión de distintos marcadores de

diferenciación y de evaluar cambios en la morfología celular, determinamos que estas líneas de CMPT poseen un grado variable de multipotencia, en donde cada una de ellas presenta un grado de compromiso particular hacia los linajes astrogial y neuronal. Además, pudimos observar que la adición de BMP4 recombinante redujo marcadamente la tasa de proliferación de todas las líneas celulares estudiadas. Por último, hemos determinado los niveles de expresión del ARNm de distintos ligandos y receptores involucrados en la señalización dependiente de BMPs en seis líneas de CMPT, encontrando en ellas ciertos patrones de expresión característicos.

Dado que las CMT probablemente dependan de determinadas señales del microambiente tumoral para mantener su identidad, un tratamiento efectivo podría basarse en el bloqueo de mediadores generados en el nicho perivascular. Por este motivo y dado el gran potencial de este modelo experimental para el testeo de drogas, decidimos estudiar los niveles de expresión de los ARNm de los componentes del eje endotelinérgico en diferentes líneas de CMPT. Pudimos observar que todas las líneas celulares analizadas mostraron una expresión elevada de los transcritos del receptor ETRB, mientras que el grado de expresión de los componentes restantes del sistema fue dependiente de cada línea celular. Más aún, en dos de cuatro líneas analizadas, el agregado de endotelinas recombinantes produjo una disminución significativa de los niveles de apoptosis generados en condiciones de privación de factores de crecimiento y nutrientes.

Dada la variabilidad observada en las respuestas celulares a diferentes tratamientos en las distintas líneas de CMPT, este trabajo pone de manifiesto la relevancia de contar con un modelo *in vitro* basado en cultivos derivados de gliomas que permita contribuir al desarrollo de terapias personalizadas.

Palabras clave: glioma, glioblastoma multiforme, células madre tumorales, progenitores tumorales, CD133, multipotencia, BMP4, EGF, bFGF, endotelinas

Isolation and *in vitro* study of cancer stem/progenitor cell lines derived from high grade glioma specimens as a renewable source for therapeutic design

ABSTRACT

High grade gliomas are the most frequent and malignant primary brain tumors in adults and appear to have a hierarchical organization suggestive of a stem cell foundation. Glioma stem cells (GSC) have been recently isolated from tumors of patients and were characterized as a small subset of stem-like tumor cells capable of initiating and sustaining tumor growth when grafted into mice. Thus, isolation and expansion of these putative cancer stem/progenitor cells, harboring tumor-specific phenotypes, constitutes a powerful model to study glioma biology. Significantly, GSC lines from different tumors exhibit divergent gene expression signatures and distinct differentiation behavior.

In the present study, we successfully established nine glioma stem/progenitor cell (GSPC) lines obtained from malignant gliomas which display stem cell properties and initiate high-grade gliomas following xenotransplantation. Importantly, all the established cell lines presented the same genomic alterations as parental tumors. Additionally, they were all positive for the stem cell markers: Nestin, Vimentin, CD44 and Sox2. In contrast, CD133 expression levels widely varied among GSPC lines.

Despite similarities between GSPC and normal neural stem cells, we hypothesized that there may be differences in their differentiation potentials. To address this issue, first, we exposed these cell lines to several differentiation conditions that principally include BMP4 treatment and growth factors withdrawal. After analyzing the expression of various markers of differentiation and assessing changes in cell morphology, we determined that these GSPC lines possess a varying degree of multipotency. Moreover, we observed that the addition of

recombinant BMP4 markedly reduced the rate of proliferation of all the studied cell lines. Finally, we determined the expression levels of different ligands and receptors involved in BMP-signaling, and found that the GSPC lines show characteristic patterns of expression.

As many cancer stem cells might depend on a niche to maintain their identity, targeting molecules triggered by the perivascular niche could be a strategy to deplete or differentiate them. For this reason and given the potential of the present experimental model for drug screening, we studied the expression profile of the endothelin (EDN) axis members in different GSPC lines grown *in vitro*. Our findings revealed that all tested cell lines robustly express ETRB receptor. Nevertheless, the expression levels of the other components of this axis resulted cell line specific. Furthermore, in two from four GSPC lines, the addition of recombinant EDNs (1, 2 and 3) reduced apoptotic rates upon growth factors and nutrients withdrawal.

Given the diversity of the responses displayed by patient-derived CSC lines, the present study highlights the relevance of the *in vitro* model presented herein for the development of tailor-made therapies.

Key words: glioma, glioblastoma multiforme, cancer stem cells, tumour progenitor cells, CD133, multipotency, BMP4, EGF, bFGF, endothelins

AGRADECIMIENTOS

Después de tantos años de esfuerzo, agradecer a todas las personas que colaboraron en este trabajo o que apoyaron este proyecto se vuelve una necesidad.

En primer lugar quiero agradecerles a todos los miembros del LIAN. A Santiago Miriuka por haberme recibido en el laboratorio y darme la libertad para realizar este trabajo doctoral. A Leonardo Romorini por haber colaborado en mi formación; a Carolina Blugermann por su compañerismo, por sus consejos y por sus “retos”, a los que siempre atendí; a María Questa por el soporte técnico y por la paciencia ante tanta ignorancia informática; a Nicolás Dimopoulos por su predisposición para ayudarme a resolver contratiempos; a Carlos Luzzani, a Gabriel Neiman y a Ximena Garate por la ayuda recibida; a Marcela Cañari por facilitar el trabajo del día a día. En especial le quiero agradecer a Darío Fernandez Espinosa y a Carolina García por haberme ayudado en muchos aspectos de esta tesis, sin dudas sin su colaboración todo hubiese sido mucho más complicado. Es imposible poner en palabras lo agradecido que me siento con María Elida Scassa, no sólo en el plano laboral, en el que desde hace muchos años ha sido mi guía, sino también en lo personal, por ser una gran amiga y por haberme cuidado como a un hijo en tantas oportunidades.

También les quiero agradecer a todos los profesionales de FLENI que hicieron posible este trabajo. A Andrés Cervio por su predisposición para ayudar. A Blanca Diez por su paciencia y por el interés en colaborar. A Naomi Arakaki y a Marcelo Schultz por haber dedicado parte de su tiempo a mejorar y completar esta tesis. A Silvia Vazquez, a Leandro Urrutia y a Germán Falasco, por su colaboración en un área tan ajena a mi formación. A Ezequiel Surace y a Eugenia Arias por haberme dado una mano en la preparación de la defensa y a Agata Fernandez Gamba por tantas qPCRs y por su interés en el proyecto. Especialmente quiero agradecerles a Horacio Martinetto y a Gustavo Sevlever por haber confiado en este proyecto, por haber participado en mi formación

profesional y por estar siempre dispuestos a enseñar y a aportar sus conocimientos.

Muchas gracias a todos los científicos que colaboraron en el desarrollo de este trabajo. Gracias a Elba Vazquez, a Silvia Moreno y a Juan Carlos Calvo por sus consejos; a Mariana García, a Irma Slavutzky, a Alejandro Roisman y a Ángela Suburo por sus ideas y por compartir su trabajo conmigo. A Corina García y a Lucas Colombo por las charlas constructivas.

A mis amigos de siempre, Mariano, Tomás, Juampy, Nacho, por haberme acompañado y ayudado a lo largo de la vida. Bietti, gracias por tu interés y entusiasmo, sé que te alegras mucho por todo esto. A mis compañeros devenidos en muy buenos amigos, a Marie, a Caro B, a Darío y a Germán, hicieron que el trabajo sea mucho más ameno.

A mi familia, por el amor, la confianza y los valores que siempre supieron transmitirme. Gracias a mis hermanos, cuñados y sobrinos, siempre cuento con ustedes. Gracias viejo por haberme ayudado a descubrir mi vocación y por contagiarme el interés por el conocimiento. Gracias mamá por quererme tanto, me alegra mucho saber que estás orgullosa de este trabajo.

Caro, mi amor, muchas gracias por tantos esfuerzos y sacrificios, por estar siempre pendiente de mi. No sólo me ayudaste muchísimo en el trabajo, también hiciste que mi vida sea plena. Sé muy bien lo difícil que fue soportarme en un año tan complicado para ambos. Estoy feliz de compartir esta tesis con vos y de que podamos seguir yendo juntos a la par. Te amo.

Este trabajo fue financiado por:

- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica
- Instituto Nacional del Cáncer
- Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia

ÍNDICE

ABREVIATURAS	12
INTRODUCCIÓN	14
- Tumores del sistema nervioso central	15
• Astrocitomas de alto grado.....	15
- Células madre adultas y organización jerárquica de los tejidos	18
• Células madre hematopoyéticas como modelo de organización jerárquica.....	20
• Métodos para el estudio de células madre adultas.....	21
- Modelos de propagación tumoral	25
- Células madre tumorales	32
• Definiciones y terminología.....	32
• Métodos para el estudio de células madre tumorales.....	33
• Abundancia relativa de las células madre tumorales.....	37
• Célula de origen y refinamiento del modelo.....	38
• Plasticidad fenotípica en células tumorales.....	40
• Células madre tumorales y metástasis.....	41
• Nichos de células madre tumorales.....	42
• Células madre tumorales y estrategias terapéuticas.....	43
- Células madre tumorales del sistema nervioso	46
• Regiones neurogénicas del sistema nervioso.....	47
• Origen celular de los gliomas.....	48
• Marcadores de células madre tumorales del sistema nervioso.....	50
• Estrategias terapéuticas y células madre tumorales del sistema nervioso.....	53
• Diferenciación de las células madre tumorales del sistema nervioso.....	54
• Células madre tumorales del sistema nervioso y el nicho perivascular.....	57
• Modelos <i>in vitro</i> desarrollados a partir de muestras quirúrgicas de pacientes...	61
OBJETIVOS	63
MATERIALES Y MÉTODOS	66
• Células utilizadas.....	67
• Aislamiento de MEF.....	67
• Cultivo y criopreservación de MEF.....	68
• Irradiación de MEF.....	69
• Co-Cultivo de CMEH sobre MEFi.....	70
• Criopreservación de CMEH.....	70
• Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina.....	71
• Diferenciación de CMEH a PN.....	71
• Propagación y criopreservación de PN.....	72
• Aislamiento de fibroblastos de prepucio humano.....	73
• Derivación de CMPT obtenidas a partir de muestras quirúrgicas.....	74
• Propagación y criopreservación de CMPT derivadas de muestras quirúrgicas.....	75

• Diferenciación de CMPT y de PN.....	75
• Xenotrasplantes ortotópicos en ratones inmunodeficientes.....	77
• Imágenes moleculares y estructurales pre-clínicas.....	78
• Tinciones e inmunohistoquímica de muestras tumorales.....	79
• Extracción de ADN genómico.....	79
• Detección de Micoplasma.....	80
• Determinación de alteraciones genéticas.....	81
• Preparación de ARN total.....	82
• Retrotranscripción.....	83
• RT-PCR en tiempo real.....	83
• Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia.....	85
• Citometría de flujo.....	87
• Determinación de apoptosis (fragmentación del ADN).....	87
• Ensayo de viabilidad celular.....	88
• Análisis estadístico.....	89
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	90
- Primera Parte: Obtención y caracterización de CMPT del sistema nervioso.....	91
• Establecimiento y propagación de CMPT del sistema nervioso derivadas de muestras quirúrgicas de pacientes.....	
• Obtención de PN normales a partir de la diferenciación de CMEH.....	96
• Determinación de las alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en CMPT y en PN.....	98
• Caracterización inmunofenotípica de CMPT y PN derivados de CMEH.....	101
• Xenotrasplantes de CMPT en ratones inmunodeficientes.....	106
• Imágenes moleculares y estructurales pre-clínicas de gliomas desarrollados a partir de xenotrasplantes ortotópicos.....	109
• Subtipificación de tumores y de CMPT.....	110
- Segunda Parte: Diferenciación de CMPT del sistema nervioso.....	114
• Niveles de expresión del ARNm de marcadores de linaje en CMPT y PN.....	114
• Niveles de expresión del ARNm de marcadores de linaje en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogial.....	115
• Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de CMPT a lo largo de la diferenciación astrogial.....	118
• Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de PN a lo largo de la diferenciación astrogial.....	124
• Niveles de expresión proteica de marcadores de CMN y CMT en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogial.....	125
• Modulación de la vías de señalización mediadas por miembros de la familia BMP.....	126
• Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de CMPT y de PN a lo largo de la diferenciación neuronal.....	132
• Multipotencia de las distintas líneas de CMPT y de los PN.....	136
• Proliferación de CMPT en distintas condiciones <i>in vitro</i>	138
• Niveles de expresión del ARNm de factores involucrados en la señalización mediada por miembros de la familia BMP en CMPT y PN.....	140
• Niveles de expresión del ARNm de factores involucrados en la señalización mediada por miembros de la familia BMP en distintas condiciones de cultivo que promueven la diferenciación de las líneas de CMPT.....	143

- Tercera Parte: Caracterización del sistema endotelinérico en distintas líneas de CMPT	148
• Niveles de expresión del ARNm de componentes del sistema endotelinérico en CMPT.....	148
• Niveles de expresión del ARNm de componentes del sistema endotelinérico en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogliol.....	150
• Efecto de las EDN en la supervivencia celular de CMPT.....	152
• Caracterización de los efectos de dos antagonistas del sistema endotelinérico: macitentan y tezosentan.....	156
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	166

ABREVIATURAS

μ: Micrón

AA: Astrocitoma anaplásico

AD: Astrocitoma Difuso

BDNF: *Brain derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado del cerebro)

bFGF: *Basic fibroblast growth factor* (factor de crecimiento de fibroblastos básico)

BMP: *Bone morphogenetic protein* (proteína morfogenética del hueso)

BMPR: *BMP receptor* (receptor de la proteína morfogenética del hueso)

Chk: *Checkpoint kinase* (quinasa de punto de control)

CMA: Células madre adultas

CMEH: Células madre embrionarias humanas

CMH: Células madre hematopoyéticas

CMN: Células madre neurales

CMPT: Células madre/progenitoras tumorales

CMT: Células madre tumorales

CNTF: *Ciliary neurotrophic factor* (factor neurotrófico ciliar)

ECE: *Endothelin converting enzyme* (enzima convertidora de endotelinas)

EDN: *Endothelin* (endotelina)

EGF: *Epidermal growth factor* (factor de crecimiento epidermal)

EGFR: *EGF receptor* (receptor del factor de crecimiento epidermal)

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase* (quinasa regulada por señales extracelulares)

ETRA: *Endothelin receptor type A* (receptor de endotelinas tipo A)

ETRB: *Endothelin receptor type B* (receptor de endotelinas tipo B)

FA: Fosfatasa alcalina

FH: Fibroblastos humanos

FLENI: Fundación para la lucha contra las enfermedades neurológicas de la infancia

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GBM: Glioblastoma Multiforme

GDNF: *Glial derived neurotrophic factor* (factor neurotrófico derivado de la glia)

GFAP: *Glial fibrillary acid protein* (proteína ácida fibrilar glial)

GMA: Glioma mixto anaplásico

GS: Gliosarcoma

HES: *Human embryonic stem cell media* (medio de cultivo para células madre embrionarias humanas)

HIF2 α : *Hypoxia-inducible factor 2 alpha* (factor inducible por hipoxia 2 alfa)

HUVEC: *Human umbilical vein endothelial cells* (células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical)

H&E: Hematoxilina y eosina

IDH1/2: *Isocitrate Dehydrogenase 1/2* (isocitrato deshidrogenasa 1/2)

iPSCs: *Induced Pluripotent Stem Cells* (células madre pluripotentes inducidas)

KSR: *Knock Out Serum Replacement* (suplemento para el reemplazo de suero)

LMC: Leucemia mieloide crónica

MEF: *Murine embryonic fibroblast* (fibroblastos embrionarios murinos)

MEFi: MEF irradiados

MS-PCR: *Methylation specific polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa metilación específica)

NE: Neuroferas

NOD/SCID: *Non obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency* (diabéticos no obesos con inmunodeficiencia severa combinada).

PET: *Positron emission tomography* (tomografía por emisión de positrones)

PI3K: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato-3-quinasa

PN: Progenitores neurales

PTEN: *Phosphatase and tensin homolog* (homólogo de fosfatasa y tensina)

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPL7: *Ribosomal protein L7* (proteína ribosomal L7)

SNC: Sistema nervioso central

SFB: Suero fetal bovino

SSEA-1: *Stage-specific embryonic antigen-1* (antígeno embrionario específico de estadio 1)

SSEA-4: *Stage-specific embryonic antigen-4* (antígeno embrionario específico de estadio 4)

TGF- β : *Transforming growth factor β* (factor de crecimiento transformante β)

TMZ: Temozolamida

TSM: *Tumor stem cell media* (medio de cultivo de células madre tumorales)

VEGF: *Vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento vascular endotelial)

ZSG: Zona subgranular

ZSV: Zona subventricular

INTRODUCCIÓN

TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En païses occidentales, los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan entre el 1.4% y el 2% de todas las neoplasias. Aproximadamente la mitad de estos tumores son primarios, con una incidencia sólo de entre el 6 al 8 por 100.000 habitantes y año. Sin embargo, los tumores del SNC representan un 2.4% de las causas de muerte relacionadas con el cáncer. De hecho, en estos tumores, la tasa global de supervivencia a los 5 años es tan sólo del 17% (Stupp R. 2005). Dentro de los tumores primarios del SNC se encuentran, entre otros, los gliomas, los meningiomas, los adenomas hipofisarios, los schwannomas y los meduloblastomas (Figura 1) (Louis D. 2007).

Los gliomas son los tumores primarios del SNC más frecuentes, representando alrededor de un 40% de este tipo de neoplasias. La clasificación más reciente de la organización mundial de la salud (OMS) designa cuatro grandes grupos de gliomas (astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y ependimomas) de acuerdo a sus características histológicas y los divide a su vez en grados (II, III y IV) según su agresividad. Los gliomas malignos, frecuentemente astrocitomas, forman el subtipo primario más común. Estos tumores son altamente agresivos e invasivos. En su progresión producen gran daño neurológico y se incluyen entre los tumores más mortales que existen (Louis D. 2007).

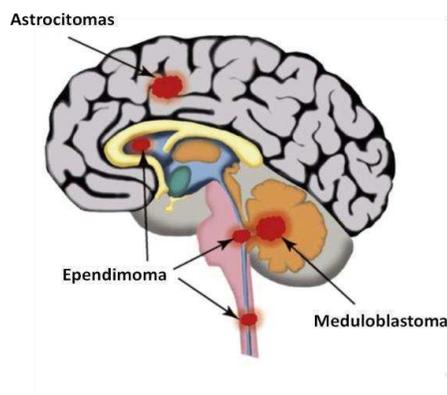


Figura 1: Representación de distintos tipos de tumores del SNC. Se indican las localizaciones más frecuentes de cada uno de ellos. Modificado de Hadjipanayis C. et. al. 2009.

Astrocitomas de alto grado

La clasificación más reciente de la OMS considera en pacientes adultos tres grandes variantes de tumores astrocitarios: Astrocitoma Difuso (AD), Astrocitoma

Anaplásico (AA) y Glioblastoma Multiforme (GBM). Dentro de estos grupos, los gliomas malignos presentan una alta agresividad biológica y clínica constituyendo formas neoplásicas definidas con grados III (AA) y IV (GBM). Estos tumores son altamente resistentes a los distintos tratamientos y evolucionan rápidamente hasta la muerte del paciente (Maher D. 2001). En el GBM, la media de supervivencia se encuentra entre los 9 y 12 meses y apenas ha variado a pesar de varias décadas de importantes avances en las áreas de la neurocirugía, la radioterapia y los ensayos clínicos de diversos posibles agentes terapéuticos (Maher D. 2001; Louis D. 2007). Si bien el GBM constituye el tipo más frecuente dentro de los gliomas de alto grado, existen distintas clases de gliomas de grado IV. Entre ellas se encuentra el gliosarcoma (GS), una variante del GBM caracterizada por un patrón alternado de diferenciación glial y mesenquimal. El pronóstico en estos casos es similar al del GBM. Por otra parte, el glioma mixto anaplásico (GMA) u oligoastrocitoma anaplásico, corresponde a un glioma de alto grado (III o IV) que exhibe un perfil astrocitario, pero posee un mayor componente oligodendroglial que el GBM. Los casos de GMA suelen tener mejor pronóstico que los de GBM, aunque la media de supervivencia es tan sólo de 2.8 años (Louis D. 2007).

En el último tiempo, el conocimiento de la biología del cáncer ha evolucionado profundamente y se ha avanzado significativamente en el tratamiento de diversos tumores humanos. Sin embargo, terapias que presentan altos índices de éxito en distintos tipos de cáncer, apenas tienen una mínima influencia en la evolución del GBM. Aunque se ha avanzado enormemente en la recopilación de información sobre las lesiones genéticas presentes en los gliomas de alto grado, la falta de conocimiento acerca del significado funcional y/o clínico de éstas constituye el mayor obstáculo en el desarrollo de terapias eficientes (Reifenberger G. 2003; Louis D. 2006). Actualmente, el tratamiento más utilizado es el llamado régimen de Stupp, que consiste en la administración conjunta de radioterapia y quimioterapia (mediante el uso de temozolamida); esta combinación ha mostrado buenos resultados en determinados tipos de GBM (Stupp R. 2005).

El estudio morfológico de estos tumores permite definir criterios diferenciales que se centran en sus características celulares, los patrones de

organización tisular, los índices de crecimiento (mitosis, Ki67/MIB-1) y los patrones infiltrantes de estructuras adyacentes. Entre los criterios diferenciales más característicos del GBM se destacan la presencia de necrosis y la proliferación vascular con patrones pseudo-glomerulares. Por otra parte, la heterogeneidad, tanto a nivel inter-tumoral como intra-tumoral de estas neoplasias, se refleja en los diversos estudios genéticos en los que se han descrito un gran número de alteraciones en diferentes cromosomas (cr 7, 10), los cuales contienen a distintos oncogenes (EGFR, PDGFR, MDM2 y CDK4) y genes supresores tumorales (TP53, PTEN, RB1, INK4A-ARF). Entre dichas alteraciones, aquellas asociadas a la regulación de la supervivencia celular y del ciclo celular son las que presentan una relación más directa con el crecimiento neoplásico (Ino Y. 2001; Louis D. 2006; DeAngelis N. 2005). El estudio y el análisis de estas alteraciones se ha orientado a definir los mecanismos de iniciación y progresión de los tumores, así como también a perfilar la existencia de subgrupos de neoplasias (GBM primario o 'de novo' y GBM secundario) con características biológicas, comportamiento clínico y respuesta terapéutica diferenciada que puedan tener repercusión en el pronóstico del paciente (Ino Y. 2001).

En los últimos años se han publicado distintos trabajos que establecieron sistemas de clasificación de gliomas (ya sea en general o para alguna clase en particular) basados en el uso de la tecnología de microarreglos (*microarrays*) (Nutt C. 2003; French P. 2005). De hecho, nuestra institución ha participado en la elaboración de un nuevo sistema de clasificación de tumores oligodendrogiales (Ferrer-Luna R. 2009; Ferrer-Luna R. 2011). Los gliomas de alto grado fueron estudiados en forma similar y se han establecido cuatro grupos de GBM: Proneural, Neural, Proliferativo o Clásico y Mesenquimático; se ha propuesto también un grupo híbrido con características intermedias entre los grupos Proliferativo y Mesenquimático. Estos grupos tienen perfiles de expresión característicos y la evolución de cada uno de ellos es diferente en términos de supervivencia y respuesta a tratamientos, siendo los grupos neural y proneural los de mejor evolución y el grupo mesenquimático el de peor pronóstico (Phillips H. 2006; Colman H. 2010).

CÉLULAS MADRE ADULTAS NORMALES Y ORGANIZACIÓN JERÁRQUICA DE LOS TEJIDOS

El concepto de células madre se origina a partir de observaciones realizadas en el siglo dieciocho sobre la regeneración múltiple de tejidos y órganos en animales inferiores (Dinsmore C. 1992). En la actualidad está claro que la capacidad de regeneración tisular en los mamíferos adultos es una propiedad esencial y que el proceso regenerativo se encuentra finamente regulado por múltiples tipos de células indiferenciadas denominadas células madre adultas (CMA). Las CMA residen en nichos especializados en cada tejido y se encargan de reponer las células perdidas, tanto durante la homeostasis normal, como luego de una lesión tisular. La abundancia relativa de CMA en los tejidos es, en la mayoría de los casos, escasa (Reya T. 2001). Estas CMA se definen fundamentalmente como células capaces de auto-renovarse y de dar origen a todas las células maduras del tejido al cual pertenecen. La capacidad de una CMA de auto-renovarse radica en una compleja interacción entre señales intracelulares propias y señales extracelulares generadas en el microambiente del nicho (Fuchs E. 2013). Es importante tener presente que la auto-renovación no es una característica única de las CMA, ya que ciertos progenitores y algunas células diferenciadas también muestran esta propiedad. Como ejemplos de estos casos se encuentran los progenitores gliales tempranos y los linfocitos maduros respectivamente. Sin embargo, el potencial de auto-renovación de las CMA suele ser mucho mayor al del resto de las células, pudiendo mantenerse a lo largo de toda la vida del organismo (He S. 2009).

Aunque las CMA se caracterizan por una extensa capacidad de auto-renovación, esto no necesariamente implica que bajo condiciones fisiológicas estas células estén en constante auto-renovación. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas (CMH) son capaces de experimentar una extensa auto-renovación durante trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes, mientras que en condiciones fisiológicas, la mayoría de estas células permanecen quiescentes durante largos períodos y sólo sufren ciclos limitados de auto-

renovació en un rató adult (Cheishier S. 1999; Foudi A. 2009; Wilson A. 2008). Otro ejemplo de este comportamiento lo muestran las células madre de la cresta neural, que si bien son capaces de experimentar una extensa auto-renovación *in vitro* (Kruger G. 2002), durante el desarrollo sólo exhiben pocas rondas de división celular antes de diferenciarse (Fraser S. 1991; Morrison, S. 1999). Este mayor potencial de auto-renovación *in vitro*, respecto al observado en condiciones fisiológicas, sería fundamental para la extensa proliferación de CMA en respuesta a una lesión (He S. 2009). Si por alguna falla genética o ambiental, las CMA muestran una capacidad disminuida de auto-renovación, es posible que esta situación origine atrofia y/o envejecimiento prematuro del tejido en cuestión. Por el contrario, si las CMA sufren alteraciones que promuevan una proliferación exacerbada sin una diferenciación apropiada, es posible que se produzcan fallas en el desarrollo o que se genere cáncer (Fuchs E. 2013). Dado que los distintos tejidos adultos poseen diferencias, tanto en las necesidades de recambio celular como en la estructura jerárquica de sus células, las frecuencias de auto-renovación *in vivo* son variables. Sin embargo, la regulación del proceso de auto-renovación conduce en cualquier caso a asegurar la regeneración de los tejidos adultos a lo largo de la vida del organismo (O'Brien L. 2011).

Existen dos modelos que explican cómo las CMA, gracias a sus propiedades de auto-renovación y multipotencia, son capaces de mantener la homeostasis de los tejidos (Fuchs E. 2013). En el primero de ellos, denominado modelo de división asimétrica, ocurre una polarización celular durante la mitosis dada por la segregación desigual de componentes responsables del destino de la célula. Para el final de la anafase, una de las células hijas habrá recibido un exceso de factores que mantienen el estado indiferenciado, mientras que la otra habrá recibido un exceso de factores que inducen el compromiso a diferenciarse a algún linaje. Por el contrario, en el modelo de división celular simétrica, todos los componentes celulares son distribuidos por igual entre las dos células hijas. En esta situación, el compromiso hacia un linaje y el inicio de la diferenciación, ocurre luego de que la mitosis finalice. Así, este proceso no necesariamente se encuentra acoplado al de división celular.

La demostración de cuál de los 2 mecanismos de división celular es empleado por una CMA es a menudo una tarea difícil. De hecho, no existe un único mecanismo de división celular aplicable a todas las CMA conocidas. Muchas poblaciones de CMA probablemente sufran ambos tipos de división celular, tanto de manera determinada (por señales ambientales) como en forma estocástica. Las divisiones simétricas predominan en circunstancias en las que se requiera una expansión de CMA, por ejemplo, durante el desarrollo o luego de una lesión. En condiciones de homeostasis, las divisiones asimétricas permitirán mantener el equilibrio entre CMA y progenie diferenciada (He S. 2009). Los mecanismos de estos modelos de división celular son detallados en distintas revisiones (Gonczy P. 2008; Knoblich J. 2008).

Células madre hematopoyéticas como modelo de organización jerárquica

Las primeras evidencias que sugerían la existencia de las CMH fueron descritas hace más de 50 años (Till J. 1961) y en las últimas 2 décadas pudieron definirse distintas subpoblaciones celulares con diferentes capacidades de auto-renovación y multipotencia (Morrison S. 1994; Yang L. 2005). Además de estos avances, fue posible proponer un modelo de organización jerárquica de las distintas subpoblaciones que conforman el sistema hematopoyético (Reya T. 2001; Majeti R. 2007). De este modo, las CMH han servido de paradigma para poner a prueba distintas hipótesis sobre las propiedades y la regulación de las CMA en diferentes tejidos, incluyendo el SNC (Reynolds B. 1992; Uchida N. 2000).

Como se mencionó anteriormente, las CMH son capaces de regenerar el sistema hematopoyético tras ser trasplantadas en la médula ósea de ratones irradiados. Luego, si estas CMH son nuevamente aisladas y se realizan trasplantes seriados, esta regeneración continúa a través de los distintos trasplantes. En estos experimentos seriados fue posible distinguir a las CMH denominadas LT-HSC (del inglés, *long-term haematopoietic stem cells*), capaces de regenerar la médula ósea a lo largo de un elevado número de trasplantes seriados, de las ST-HSC (del inglés, *short-term haematopoietic stem cells*) y de los MPP (del inglés *multipotent progenitors*). Como se mencionó anteriormente, conforme transcurre la diferenciación de las LT-HSCs hacia las ST-HSCs y MPPs,

la capacidad de auto-renovación de estas células va disminuyendo (Reya T. 2013). Es importante mencionar que estas subpoblaciones son minoritarias, de hecho, el conjunto de LT-HSCs, ST-HSCs y MPPs constituyen aproximadamente el 0.05% de las células de la médula ósea. En la figura 2 se presenta un esquema de la organización jerárquica del sistema hematopoyético.

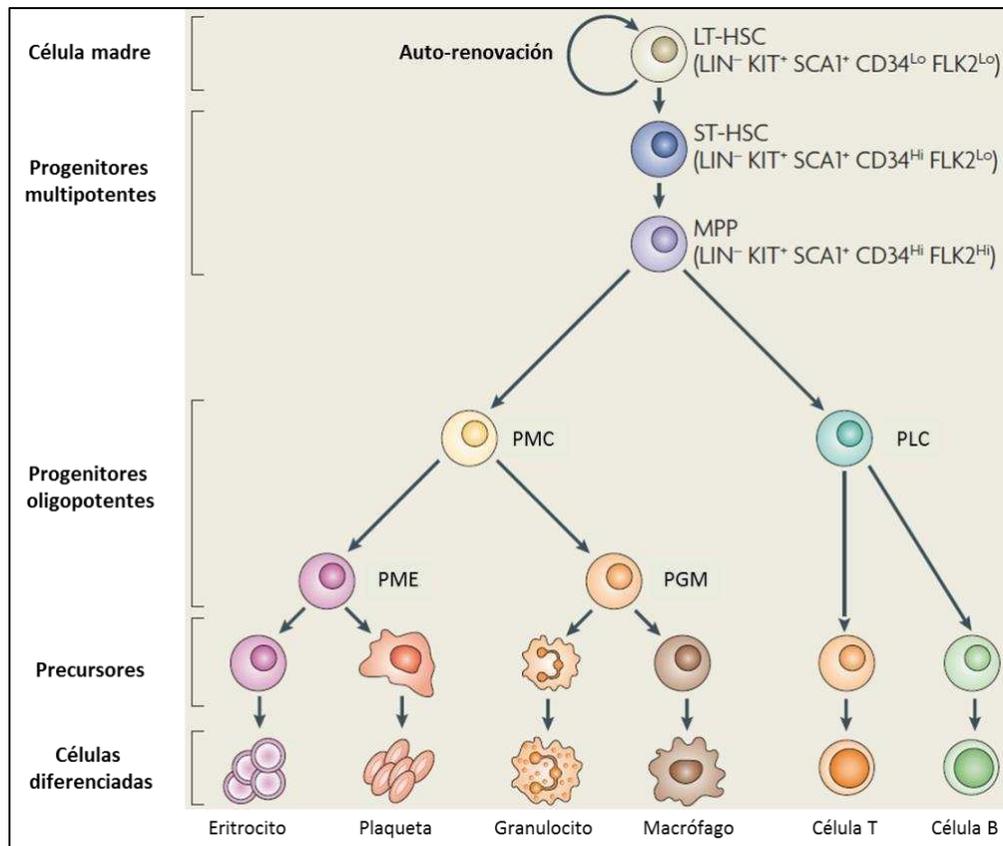


Figura 2: Representación de la organización jerárquica del sistema hematopoyético. PMC: progenitor mielóide común; PLC: progenitor linfóide común; PME: progenitor de megacariocitos y de eritrocitos; PGM: progenitor de granulocitos y de macrófagos. Modificado de Sharpless N. et. al. 2007.

Métodos para el estudio de células madre adultas

Inicialmente, la existencia de poblaciones de células madre fue sugerida a partir de evidencias histológicas en las cuales se observaban células con fenotipo indiferenciado y proliferante junto con una mayoría de células diferenciadas. Sin embargo, la naturaleza de estas poblaciones pudo validarse a partir del desarrollo

de nuevas metodologías que permitieron, tanto su identificación y purificación, como la evaluación de sus capacidades de auto-renovación y multipotencia (Nguyen L. 2012).

Entre las técnicas más utilizadas que permiten evaluar auto-renovación y multipotencia se encuentran ciertos ensayos *in vitro*, los trasplantes celulares en animales de laboratorio y las técnicas *in vivo* de seguimiento de linaje (del inglés *lineage tracing*). Como se verá más adelante, estos mismos abordajes experimentales fueron los que permitieron sugerir la organización jerárquica de ciertos tumores y la existencia de las células madre tumorales (Beck B. 2013).

➤ Ensayos *in vitro* de auto-renovación

Uno de los primeros trabajos que evidenciaban la heterogeneidad de los tejidos adultos en función de la capacidad de auto-renovación y del grado de diferenciación que mostraban las células que los conformaban fue realizado en epidermis (Barrandon Y. 1987). En este trabajo se realizaron cultivos celulares en una densidad clonal y se observó que los queratinocitos eran capaces de originar 3 tipos de colonias, en donde una de ellas estaba compuesta por células con un fenotipo indiferenciado y eran capaces de auto-renovarse durante largos períodos. Estas células fueron propuestas como CMA de la epidermis. Los 2 tipos restantes de colonias contenían células con fenotipo más diferenciado y poseían una capacidad de auto-renovación disminuida.

Diferentes tipos de ensayos clonogénicos *in vitro* han sido desarrollados con el fin de evaluar la capacidad de auto-renovación y multipotencia en diferentes tejidos. Entre ellos se encuentra el método de formación de neuroesferas en suspensión, el cual evalúa la capacidad de una única célula de origen neural de formar una esfera multicelular (Reynolds B. 1992). Los ensayos de formación de esferas han sido utilizados también en células provenientes de otros órganos, incluyendo el páncreas, la próstata y la glándula mamaria (Pastrana E. 2011). Si bien estos ensayos permiten evaluar clonogenicidad, auto-renovación y multipotencia, es importante tener presente que diferentes tipos de progenitores también son capaces de formar esferas y que las CMA que se encuentren quiescentes no tendrán esta habilidad. De este modo, esta metodología no

permite realizar estimaciones precisas de la frecuencia de las CMA en un tejido dado (Reynolds B. 2005; Pastrana E. 2011).

➤ Identificación de marcadores de CMA.

A partir de los ensayos mencionados en el párrafo anterior, los cuales permitirían distinguir subpoblaciones con distintas capacidades de auto-renovación y multipotencia, fue posible comenzar la búsqueda de marcadores de CMA. Hace tiempo se postuló que las CMA podrían ser identificadas en base a su expresión génica; por consiguiente, la detección de proteínas específicas de éstas permitiría su purificación. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible encontrar un marcador universal para todas las CMA. Estudios de expresión génica han demostrado que el perfil de expresión de un tipo de CMA muestra mayor similitud con el de su propia progenie que con el de una CMA de otro tejido (Morrison S. 2008). De hecho, en muchos tejidos aún no se han encontrado marcadores específicos de sus respectivas CMA (Baker B. 2013). El análisis de las CMA conocidas ha permitido comprender algunas de las razones de estas dificultades. En primer lugar, se demostró que la expresión de muchos marcadores propuestos se mantiene a lo largo de la diferenciación de estas células (Kai T. 2004). En segundo lugar, la expresión de ciertos marcadores puede depender del estado metabólico, tanto de las propias CMA, como de las células que conforman su microambiente (Morrison S. 2008). Pese a estas dificultades, el uso de ciertos marcadores ha permitido enriquecer o purificar con éxito distintas CMA. Por ejemplo, LGR5 ha sido útil para la identificación de ciertas poblaciones de estas células en el tracto digestivo (Barker N. 2007) y en la epidermis (Jaks B. 2008). Además, el uso de múltiples marcadores en determinadas combinaciones permite obtener poblaciones de CMA más homogéneas. Si bien las CMH han sido aisladas principalmente en base a la expresión de CD34, la combinación de este marcador con CD133 y CD90, sumada a la falta de expresión de CD38 y otros marcadores de linaje, ha demostrado ser muy efectiva para la purificación de estas células (Calloni R. 2013).

➤ Trasplantes celulares en animales de laboratorio

Como se describió en la sección anterior, el uso de ciertos marcadores celulares ha permitido aislar subpoblaciones con propiedades de CMA, las cuales fueron validadas realizando trasplantes seriados en animales aptos para tal fin. En el caso de las CMH, los animales son previamente irradiados con el objetivo de eliminar su propio sistema hematopoyético y poder así monitorear el destino de las células trasplantadas. Para el caso de células madre de músculo esquelético, pueden utilizarse ratones con algún tipo de distrofia muscular. Este tipo de abordaje ha sido empleado en numerosos trabajos para evaluar si una subpoblación celular, aislada prospectivamente en base a marcadores celulares, contiene o no CMA. De esta forma, mediante técnicas de separación celular (por ejemplo, por FACS, del inglés *fluorescence activated cell sorting* o por exclusión de colorantes vitales) y posterior caracterización luego de ser trasplantadas en animales de laboratorio, se ha logrado identificar diversas subpoblaciones enriquecidas en CMA, tanto en el sistema hematopoyético (Wilson A. 2008) como en otros órganos, incluyendo la próstata, el músculo esquelético y la glándula mamaria (Cerletti M. 2008; Lawson D. 2007; Shackleton M. 2006).

➤ Técnicas de seguimiento de linaje *in vivo* (“*lineage tracing*”).

Idealmente, un seguimiento de linaje *in vivo* consiste en introducir en una única célula un reportero, a menudo genético, que permita rastrear a ésta luego de ser trasplantada en un animal. La expresión de dicho reportero deberá ser sostenida, tanto en la célula trasplantada, como en su progenie potencial. De este modo, podrá determinarse si la célula trasplantada cumple con los requisitos de una CMA. Si luego de un monitoreo a largo plazo, la expresión del reportero persiste en las células indiferenciadas de un tejido, entonces la célula trasplantada habrá sido capaz de auto-renovarse. Asimismo, si las células diferenciadas pertenecientes a los distintos linajes del órgano en cuestión, también expresan la marca, se habrá demostrado la multipotencia de la célula trasplantada (Fuchs E. 2013). Actualmente existen diferentes formas de analizar los resultados de un seguimiento de linaje *in vivo*. En una de ellas, la o las células marcadas son evaluadas por única vez luego de un período determinado, y mediante métodos

estadísticos, se infiere el destino que tomaron dichas células (Blanpain C. 2013 b). En otros casos, el seguimiento puede realizarse en tiempo real durante la vida del animal, aunque este método suele ser muy invasivo y no permite un seguimiento durante períodos prolongados (Nakagawa T. 2010; He J. 2012; Blanpain C. 2013 b). Este abordaje también puede realizarse utilizando reporteros inducibles, los cuales permiten el seguimiento de las células de una subpoblación determinada en un tejido determinado. La ventaja de esta estrategia radica en que las células marcadas pueden ser estudiadas en su propio microambiente. Existen revisiones recientes en donde se detalla esta metodología y su alcance (Snippert H. 2011; Blanpain C. 2013 b).

El seguimiento *in vivo* de linaje se ha vuelto un ensayo de referencia para evaluar auto-renovación a largo plazo y multipotencia de CMA de diferentes órganos en su microambiente natural (Barker N. 2007; Barker N. 2010; Mascre 2012). Esta metodología también permite el estudio de los potenciales de auto-renovación y de diferenciación durante el desarrollo, de la homeostasis de tejidos adultos, y como se verá más adelante, del desarrollo tumoral.

Finalmente, es posible concluir que la definición más apropiada de las CMA responde a un criterio funcional. Para que una célula sea considerada una CMA, ésta deberá ser multipotente y auto-renovable en el largo plazo.

MODELOS DE PROPAGACIÓN TUMORAL

Durante más de 100 años los diferentes tipos de cáncer han sido reconocidos como poblaciones celulares altamente heterogéneas. En 1976, luego de décadas de intensa investigación, fue descrito el modelo de evolución clonal (Nowell P. 1976), basado principalmente en evidencias obtenidas a partir de estudios citogenéticos en tumores (Sandberg A. 1970; Yosida T. 1975), de análisis de silenciamiento del cromosoma X en pacientes femeninos (Linder D, 1965; Failkow P. 1974) y de estudios que demostraban que en las neoplasias de células plasmáticas, las inmunoglobulinas serían producidas por un único clon (Milstein C. 1967). Este modelo postula que las células tumorales que posean ventajas en la

tasa de crecimiento serán seleccionadas y expandidas dentro de la masa tumoral. De este modo, la adquisición de mutaciones en las células tumorales sería el principal motor de la progresión tumoral, aunque las diferencias epigenéticas y los cambios en el microambiente también serían relevantes. Por lo tanto, la permanente generación de nuevas subpoblaciones por selección natural, permitiría explicar tanto la heterogeneidad tumoral como la progresión de la enfermedad. Por otra parte, en controvertidos trabajos publicados en las décadas del 50 y del 60 (Lerner B.H. 2004) en los que se realizaron autotrasplantes en pacientes con cáncer, se determinó que la capacidad de una población de células tumorales para regenerar una neoplasia es baja. Incluso implantando de manera subcutánea un millón de células tumorales, sólo en el 50% de los casos se desarrollaban nódulos palpables (Brunschwig, A. 1965). En base a estos resultados, también se postuló que todas las células tumorales tendrían una capacidad similar de proliferar y regenerar un tumor al ser trasplantadas en un tejido normal, pero la probabilidad de que esto ocurra para una célula en particular sería muy baja. La variabilidad en la capacidad tumorigénica dentro de una población tumoral estaría dada, al menos en parte, por alguna variable estocástica que afecte dicha capacidad. Por esta razón, este modelo de tumorigenicidad se denomina modelo estocástico (Ward R. J.2007; Beck B. 2013) (Figura 3A). Aunque esta interpretación sobre la iniciación, la progresión y la regeneración tumoral ha dominado por décadas, evidencias experimentales obtenidas desde principios del siglo veinte ya sugerían la posibilidad de que, al menos en determinados tumores, existiera una organización jerárquica.

Una de las primeras conexiones entre cáncer y células madre data desde el año 1907, cuando se encontraron similitudes histológicas entre tumores y tejidos embrionarios. Estas observaciones dieron origen a la teoría del “resto embrionario”, la cual postulaba que los distintos tipos de cáncer eran causados por células que mostraban características similares a las de células de embriones tempranos (Askanazy M. 1907). En 1930, a partir de observaciones clínicas, se sugiere que el meduloblastoma era originado a partir de células embrionarias denominadas meduloblastos, las cuales fallaban en el proceso de diferenciación

(Eisenhardt L. 1930). Recientemente, esta idea ha sido reconsiderada a partir de evidencias que sugieren que los distintos subtipos de meduloblastoma se originarían a partir de diferentes precursores durante el desarrollo (Gibson P. 2010). Para el año 1941, los teratocarcinomas eran reconocidos como estructuras neoplásicas que contenían distintos tipos de células diferenciadas, lo cual sugería que este tipo de cáncer se originaba a partir de células madre tumorales (Jackson E. 1941). Luego de aproximadamente veinte años, se demuestra el origen clonal de los teratocarcinomas de ratón a partir del trasplante de una única célula tumoral multipotente (Kleinsmith L. 1964). Como consecuencia de estos descubrimientos, el grupo de Barry Pierce formula una visión más general del cáncer, en la cual los tumores son considerados una “caricatura” del desarrollo normal. Bajo este paradigma, las células con mayor grado de malignidad no sólo serían capaces de proliferar y propagar el cáncer, sino que además podrían dar origen a una progenie de células “benignas” más diferenciadas (Pierce G. 1971; Pierce G. 1988). Estos trabajos permitieron introducir el concepto de que los tumores podrían originarse a partir de células indiferenciadas preexistentes en un tejido adulto y que no necesariamente era la desdiferenciación de células normales la causa de la iniciación tumoral.

Pero no todas las evidencias a favor de un modelo de propagación tumoral basado en una organización jerárquica provenían de trabajos realizados en teratocarcinomas. Con el fin de dilucidar cuál era el número mínimo de células neoplásicas necesario para generar un tumor, en el año 1937 se demuestra que basta con trasplantar una única célula tumoral obtenida de una leucemia a un ratón para que éste desarrolle la enfermedad (Furth J. 1937). En este trabajo se advierte que cuanto mayor sea el número de células inoculadas, mayor será la proporción de ratones que desarrollarán leucemia. Los autores consideran como una posible explicación que no todas las células tumorales trasplantadas serían capaces de proliferar, y por ende, de regenerar un tumor. En el año 1963 se propone un método cuantitativo mediante el cual podría ser posible estimar el número de células de linfoma capaces de proliferar *in vivo*. El ensayo consistía en evaluar el número de colonias macroscópicas generadas en el bazo de ratones

irradiados luego de que estos fueran inoculados con una suspensión de células de linfoma. Los autores especularon que si el origen de estas colonias es clonal, entonces, el método permitiría evaluar el porcentaje de “células formadores de colonias” en un linfoma (Bruce W. 1963). En 1977, un año después de que Peter Nowel proponga el modelo de evolución clonal de los tumores, se publica un ensayo *in vitro* que, según los autores, permitiría evaluar el contenido de “células madre tumorales” (sic) en diferentes tipos de cáncer (Hamburger A. 1977). En este trabajo, se define “célula madre tumoral” como una célula capaz de generar una colonia de más de cuarenta células al ser cultivada en placas con agar semisólido utilizando un medio de cultivo suplementado con suero. En estas condiciones las células podían ser propagadas durante un tiempo limitado; es decir, no mostraban capacidad auto-renovable a largo plazo. Resulta interesante mencionar que, tal como se detallará más adelante, hoy en día se sabe que la presencia de suero en cultivos primarios de células indiferenciadas, normalmente induce la diferenciación de éstas, promoviendo la pérdida de su capacidad auto-renovable. Esto podría explicar por qué los cultivos mencionados en este trabajo no mostraban una auto-renovación en el largo plazo. En trabajos cruciales desarrollados a mediados de la década de 1990, el grupo de John Dick logra fraccionar diferentes tipos de subpoblaciones de la médula ósea de pacientes con leucemia mieloide aguda y demuestra que la capacidad de propagar la enfermedad en ratones inmunodeficientes, radica sólo en un grupo pequeño de células que expresan marcadores de CMH normales (Lapidot T. 1994; Bonnet D. 1997). A partir de estos trabajos, surgieron numerosas publicaciones que demostraron la existencia de subpoblaciones capaces de iniciar la formación de tumores en ratones inmunodeficientes con gran eficiencia. Estas subpoblaciones fueron aisladas con éxito a partir de distintos tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama (Al-Hajj M. 2003), tumores cerebrales (Singh S. 2004), cáncer de próstata (Collins A. 2005), cáncer de pulmón (Eramo A. 2008), cáncer de colon (Ricci-Vitiani L. 2007; O’Brien C. 2007), cáncer de ovario (Zhang S. 2008; Curley M. 2009) y carcinoma de células escamosas de la piel (Malanchi I. 2008) entre otros.

De este modo, luego de una intensa investigación, se desarrolló un modelo de propagación tumoral basado en una estructura jerárquica en la cual las células madre tumorales se encuentran en la cima de la pirámide. Si bien este modelo es respaldado por numerosas evidencias en muchos tipos de cáncer, como se verá más adelante, aún no es posible afirmar que sea aplicable en todos los tumores. En la figura 3B se esquematiza este modelo y se destacan las principales diferencias respecto al modelo estocástico.

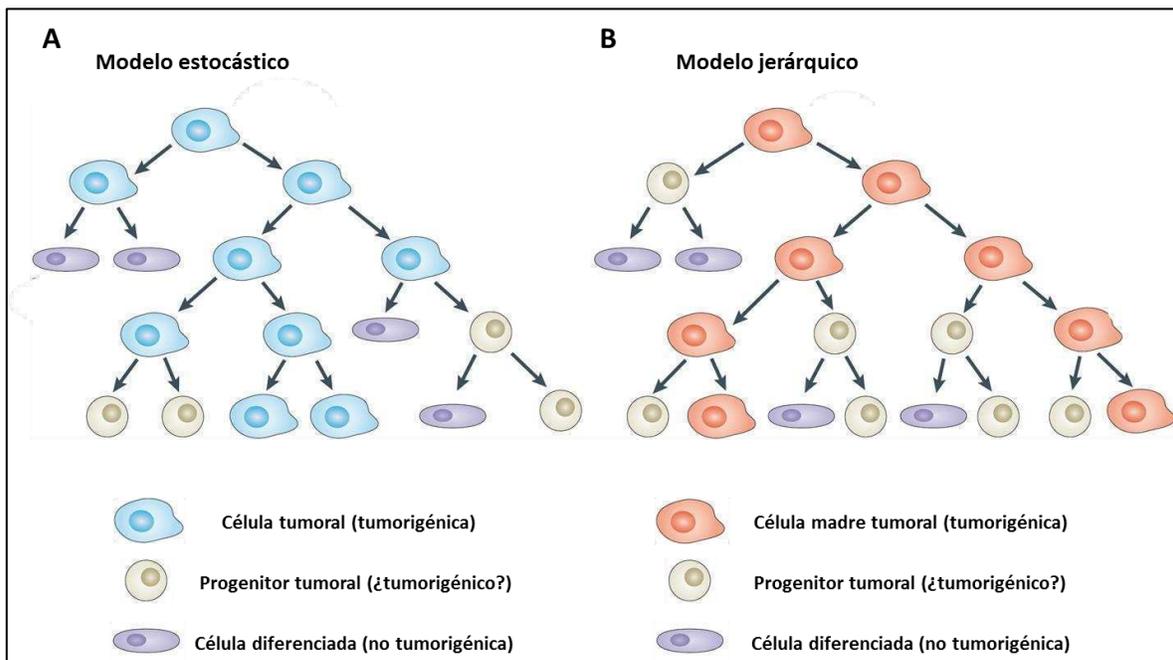


Figura 3: Esquemas del modelo estocástico (A) y del modelo jerárquico (B). Nótese que en el primero, una variable estocástica afectaría el grado de diferenciación de ciertas células y por lo tanto su tumorigenicidad. Modificado de Beck B. et. al. 2013.

Si bien el modelo estocástico y el modelo jerárquico ofrecen explicaciones diferentes en cuanto a la organización y a los mecanismos de propagación de los tumores, es importante advertir que el proceso de evolución clonal puede ocurrir en ambos (Zhou B. 2009) (Figura 4). De hecho, en la publicación original del modelo de evolución clonal (Nowell P. 1976) se discute sobre la posibilidad de que, en ciertos casos, la célula que da origen a un tumor podría corresponder a una célula madre tumoral. Un trabajo publicado en el año 2007 finalmente reveló que las células madre tumorales derivadas de leucemias agudas son capaces de

dar origen a distintas subpoblaciones por evolución clonal (Barabe F. 2007). Este hallazgo fue confirmado años más tarde en dos trabajos publicados independientemente durante el año 2011 (Anderson K. 2011; Notta F. 2011).

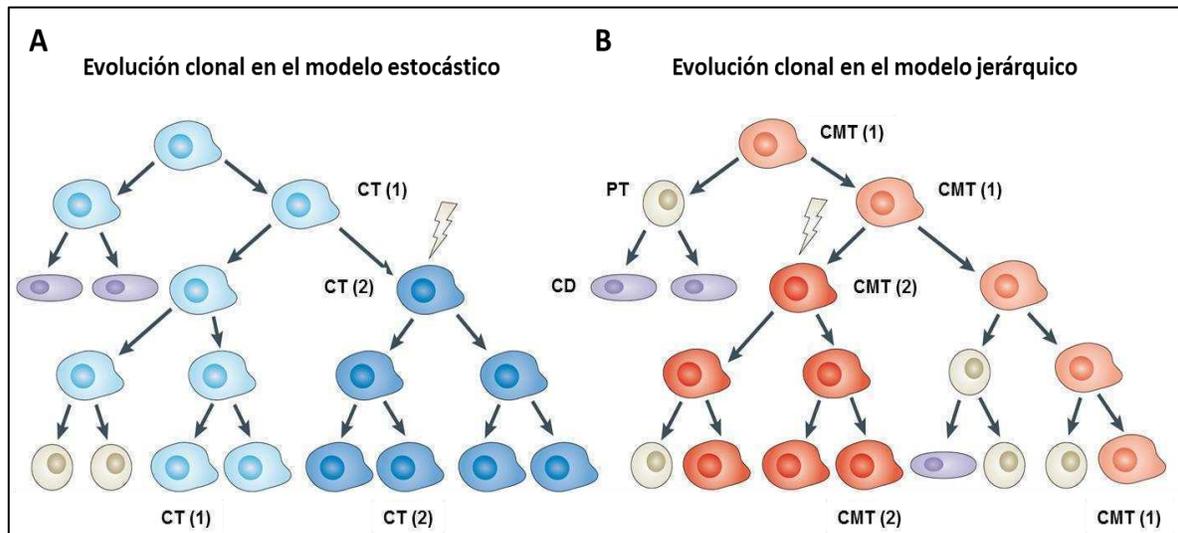


Figura 4: Esquemas del modelo estocástico (A) y del modelo jerárquico (B) en los cuales se muestra cómo en ambos casos, el proceso de evolución clonal (indicado con rayos) puede contribuir a la heterogeneidad tumoral. CT: Célula tumorigénica; PT: progenitor tumoral; CD: célula diferenciada; CMT: célula madre tumoral. Modificado de Beck B. et. al. 2013.

En un trabajo muy reciente (Kreso A. 2013) se evaluó la dinámica de la propagación tumoral de 150 clones celulares derivados a partir de 10 biopsias de cáncer de colon humano. El objetivo de este trabajo consistía en estudiar cómo evolucionaban los distintos clones y qué ocurría con el grado de heterogeneidad tumoral a lo largo de trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes. Los análisis revelaron que la heterogeneidad a nivel genético se mantuvo relativamente constante, aunque alteraciones sutiles del genoma pudieron no haber sido detectadas. Sin embargo, en función de la prevalencia de los diferentes clones a lo largo de los trasplantes y de la contribución de cada uno de ellos al crecimiento tumoral, los autores lograron identificar 5 tipos diferentes de clones. En este trabajo también se determinó que los diferentes clones mostraron distintas sensibilidades frente a un esquema de quimioterapia realizado también en ratones trasplantados. Como era esperable, los clones de crecimiento más lento resultaron

los más resistentes, siendo responsables de la recurrencia tumoral. Resultados similares fueron reportados de manera independiente (Dalerba P. 2011).

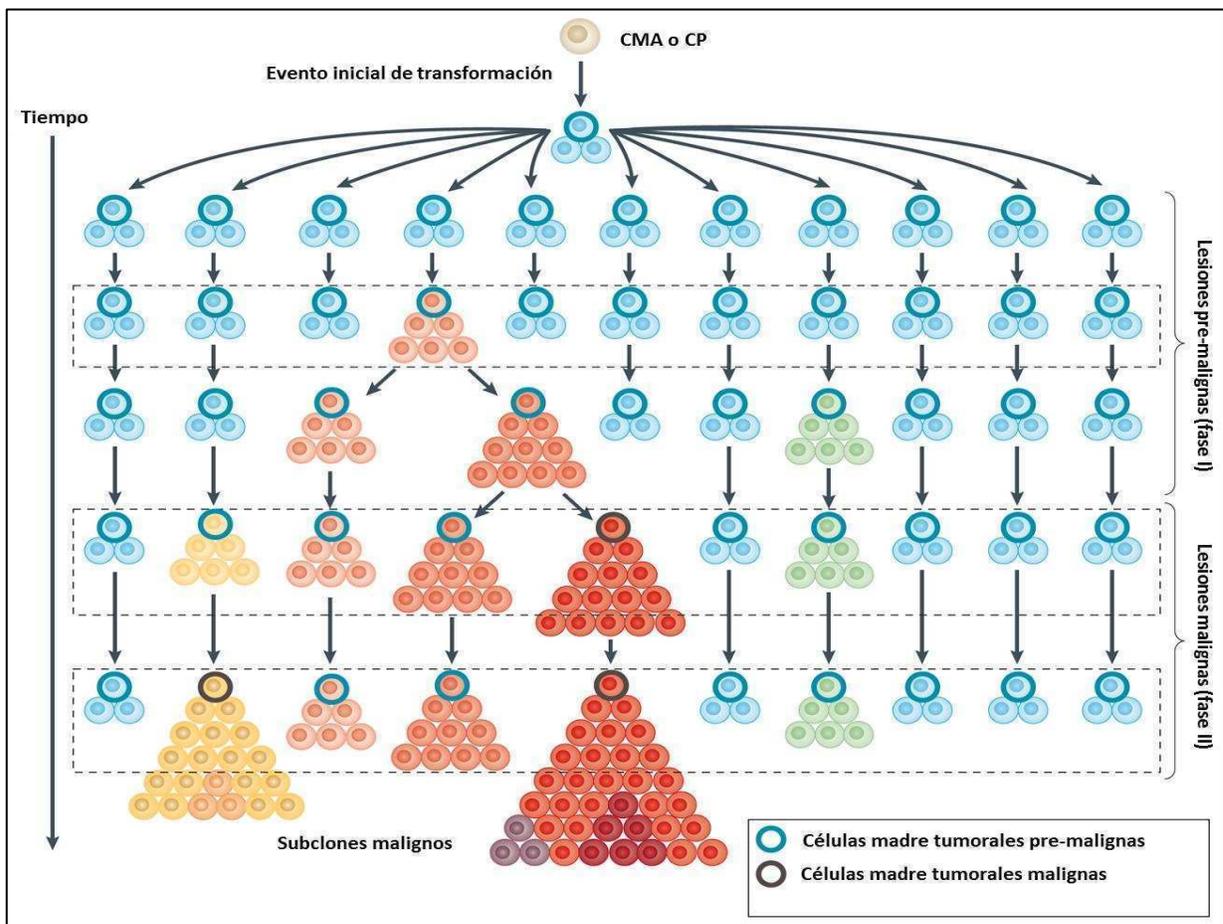


Figura 5: Modelo de evolución de células madre tumorales Representación esquemática de la ramificación de subclones que acompaña la expansión de una célula que experimentó alteraciones genéticas y/o epigenéticas que le confirieron una ventaja proliferativa con respecto a su contraparte normal. El clon inicial puede dar origen a subclones particulares que estarían controlados por el sistema inmune natural y/o el microambiente de los tejidos circundantes (rectángulos punteados) y por ende éstos no desarrollarían una malignidad manifiesta. En esta primera etapa de la evolución del cáncer (fase I) las células madre neoplásicas (indicadas por bordes marcados en azul) son células madre pre-malignas. Si uno o más subclones experimentasen ciertas transformaciones (*hits*) la malignidad se desarrollaría (indicada por cambio de color). En esta etapa (fase II), las células madre neoplásicas se convertirían en células madre tumorales (indicadas por bordes marcados en negro). Sin embargo, otros subclones neoplásicos y sus respectivas células madre podrían permanecer en ese estado y continuar generando subclones pre-malignos o malignos adicionales. Modificado de Valent P. et. al. 2013.

De este modo, el modelo jerárquico de progresión tumoral, actualmente contempla que en un mismo tumor coexistirían distintas subpoblaciones generadas por evolución clonal. Éstas estarían definidas no sólo en función de las

alteraciones genéticas de cada una de ellas, sino también según sus respectivas capacidades de contribuir al crecimiento tumoral. A su vez, cada una de estas subpoblaciones estaría conformada tanto por células madre tumorales como por su progenie. Ambos factores reflejarían así la elevada heterogeneidad tumoral (Valent P. 2012; Beck B. 2013). En la figura 5 se esquematiza como en un mismo tumor pueden coexistir diferentes subpoblaciones o clones en donde cada una de ellas es sostenida por un tipo de célula madre tumoral particular.

CÉLULAS MADRE TUMORALES

Definiciones y terminología

Desde las primeras publicaciones referidas a las células madre tumorales (CMT) hasta la fecha, han existido inconsistencias en la terminología aplicada y en cómo son definidas estas células. Por este motivo, se ha propuesto que la comunidad científica abocada a esta área del conocimiento, debería ser más precisa en las definiciones y seguir ciertos parámetros para dejar en claro cuál es el marco de trabajo en el cual se realizan las investigaciones (Valent P. 2012).

Como en el caso de las CMA, la definición de CMT también es operativa o funcional. En una de sus definiciones más rigurosas (Ward R. 2007), una población de CMT deberá cumplir 3 requisitos fundamentales:

1. **Tumorigenicidad:** estas células deberán ser capaces de regenerar el tumor del cual derivan cuando son trasplantadas en animales adecuados en un microambiente ortotópico. El grado de tumorigenicidad de una población celular será inversamente proporcional al número de células inyectadas necesarias para regenerar un tumor. Las poblaciones enriquecidas en CMT deberán mostrar un elevado grado de tumorigenicidad.
2. **Auto-renovación:** las CMT deberán evidenciar auto-renovación *in vivo*. Comúnmente esta propiedad es evaluada realizando trasplantes seriados en ratones inmunodeficientes. Recientemente, los experimentos de

seguimiento de linaje *in vivo* también han sido empleados para este fin. En trabajos en donde las CMT se definen con menor rigurosidad, esta propiedad suele ser determinada por ensayos clonogénicos *in vitro*.

3. **Diferenciación y recapitulación del tumor original:** estas células deberán ser capaces de dar origen a una progenie que logre cierto grado de diferenciación. También deberán ser capaces de generar una organización celular que refleje el tipo de tumor del cual provienen. Sin embargo, la multipotencia, aunque muchas veces se encuentra asociada a estas células, no es un requisito para que una célula sea considerada CMT. Sobre este tema se volverá más adelante.

Es importante tener presente que esta definición no da cuenta del origen de una CMT. El término “célula madre tumoral” es utilizado para hacer referencia a que estas células muestran un comportamiento similar al de las CMA (auto-renovación y capacidad de originar una progenie con mayor grado de diferenciación). Como se verá más adelante, una CMT no se origina necesariamente de una CMA. Por este motivo, para referirse a estas células, muchos investigadores optan por utilizar el término “célula iniciadora de tumor”. Sin embargo, esta designación sólo hace referencia a la capacidad de una célula de iniciar la formación de tumores luego de ser trasplantada en ratones inmunodeficientes y no implica necesariamente que ésta forme parte de una estructura jerárquica (Visvader J. 2012). En ciertas publicaciones se utilizan también los términos “célula propagadora de tumor” o “células tumorales tipo célula madre”.

En este trabajo nos referimos a estas células como “células madre tumorales” ya que es la denominación más frecuentemente utilizada en la literatura científica.

Métodos para el estudio de células madre tumorales

Al igual que en el caso de las CMA, las técnicas que permiten evaluar las propiedades de las CMT son los ensayos de auto-renovación *in vitro*, los

trasplantes celulares en animales de laboratorio y las técnicas de seguimiento de linaje *in vivo*.

➤ Ensayos de auto-renovación *in vitro*

Los ensayos clonogénicos basados en la formación de esferas también han sido utilizados para identificar CMT en diferentes tipos de cáncer. En la mayoría de los casos, las mismas células que son capaces de formar esferas *in vitro*, también son capaces de formar tumores *in vivo* al ser trasplantadas en ratones inmunodeficientes (Singh S. 2004; Collins A. 2005; Ponti D. 2005; Ricci-Vitiani L. 2007; Zhang S. 2008; Eramo A. 2008). Como se mencionó anteriormente, estos ensayos no son adecuados para estimar la frecuencia de CMT en un tumor, ya que los progenitores en tránsito originados a partir de las CMT también son capaces formar esferas (Reynolds B. 2005; Pastrana E. 2011). Otra limitación de esta metodología radica en que las condiciones de cultivo *in vitro* podrían no estar permitiendo la auto-renovación de ciertas CMT (Valent P. 2012).

Al igual que en el presente trabajo, en ciertos casos se ha logrado con éxito obtener líneas celulares con características de CMT. En esta estrategia se emplean las mismas condiciones utilizadas en los ensayos de formación de esferas. Los medios de cultivo utilizados en estos casos permiten el mantenimiento de CMT *in vitro*. La estabilidad de estos cultivos en el largo plazo, sin la alteración de su fenotipo indiferenciado, da cuenta de la capacidad de auto-renovación de estas células (Pollard S. 2009). Esta estrategia tiene como desventaja que la expansión celular *in vitro*, a mediano o a largo plazo, puede producir una selección de subpoblaciones no representativas del tumor original (Valent P. 2012). También es importante tener presente que estas líneas celulares no corresponden a cultivos puros de CMT, sino que más bien estarían conformados por diferentes tipos celulares: CMT; progenitores en tránsito y una minoría de células diferenciadas (Venere M. 2011).

➤ Marcadores de CMT

Muchos marcadores propuestos para identificar distintas poblaciones de CMT son los mismos que han sido utilizados para aislar CMA de los tejidos

respectivos, y tal como ocurre en el caso de las CMA, aún no se han encontrado marcadores de CMT que sean totalmente específicos en ningún tipo de cáncer. Además, se ha observado que la expresión de determinados marcadores puede variar en función de las condiciones ambientales (Visvader J. 2012; Valent P. 2012). De hecho, el fenotipo de las CMT puede ser variable entre tumores de distintos pacientes con la misma patología. Además, en muchas oportunidades se ha demostrado que una población aislada con un marcador en particular no coincide, al menos completamente, con la aislada mediante el uso de otro marcador. Esta discrepancia podría deberse a la presencia de distintos tipos de CMT dentro de un tumor, pero también podría ser causada por variaciones en las técnicas empleadas para aislar a cada población (Visvader J. 2012). Por ejemplo, en cáncer de mama, la superposición entre la fracción $CD44^+CD24^-$, descrita previamente como población enriquecida en CMT (Al-Hajj M. 2003) y la población $ALDH^+$ dentro de un mismo tumor resultó ser muy baja (entre 0.1% y 1.2%) (Ginestier C. 2007). Resultados similares fueron obtenidos en cáncer de colon (Dalerba P. 2007), de páncreas (Hermann P. 2007) y de ovario (Stewart J. 2011). También es importante tener en cuenta que la separación prospectiva de CMT podría no incluir subpoblaciones celulares que dependan del nicho presente en el tumor original (Zhou B. 2009). Por estas razones, no es correcto definir una población de CMT sólo en función de su inmunofenotipo; la validación definitiva deberá realizarse evaluando su tumorigenicidad y su capacidad auto-renovable (Visvader J. 2012). Pese a estas dificultades, un número importante de marcadores han resultado útiles para aislar subpoblaciones celulares enriquecidas en CMT. Incluso, en ciertos tipos de cáncer, el grado de expresión de algunos marcadores ha correlacionado con el pronóstico de la enfermedad (Schatten T. 2008; Zeppernick F. 2008).

➤ Trasplantes celulares en animales inmunodeficientes

El trasplante de células tumorales en ratones inmunodeficientes es, sin dudas, un método muy adecuado para evaluar si una población celular exhibe propiedades de CMT. Sin embargo, el éxito o el fracaso en la formación de un tumor luego de este tipo de trasplantes no necesariamente reflejarán el

comportamiento que puedan tener estas células en un paciente con cáncer. Esto se debe a que este modelo posee importantes limitaciones. Entre ellas se encuentran la falta de un sistema inmunológico anti-tumoral y la presencia de un microambiente que pueda dificultar el desarrollo de un tumor humano o que pueda seleccionar sólo las subpoblaciones de CMT que sean capaces de proliferar en dicho contexto (Kelly P. 2007; Kennedy J. 2007; Valent P. 2012).

En este tipo de experimentos, cuando se evalúa la tumorigenicidad de una subpoblación celular (número mínimo de células necesario para generar un tumor), es fundamental referir los resultados al tipo de ratón empleado. En general, los ratones utilizados con mayor frecuencia son los NOD/SCID (del inglés *Non obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*), los cuales presentan una inmunodeficiencia severa caracterizada principalmente por la ausencia tanto de linfocitos B como de linfocitos T (Jin K. 2010). En este tipo de ratones, generalmente se logra obtener una mayor eficiencia en la formación de tumores a partir de CMT humanas al compararlos con los “ratones desnudos” (del inglés *nude mice*, por su fenotipo sin pelos). Estos últimos tienen un grado de inmunodeficiencia moderado ya que muestran un desarrollo anormal del timo pero poseen linfocitos B funcionales. Además, los “ratones desnudos” adultos suelen poseer cierto grado de linfocitos T maduros. Para una descripción más detallada de los distintos tipos de ratones inmunodeficientes se recomienda la página web de “*The Jackson Laboratory*”. Otra cuestión fundamental a la hora de interpretar resultados en este tipo de trasplantes, es considerar los detalles experimentales empleados en la técnica, ya que la manipulación previa a la que son sometidas las células, puede afectar su viabilidad (Morton C. 2007).

Por otra parte, una alternativa a los trasplantes celulares en ratones inmunodeficientes, consiste en la utilización de ratones modificados genéticamente. En estos casos se trabaja con ratones transgénicos en los que es posible inducir la expresión de oncogenes o impedir la expresión de genes supresores de tumor. Este modelo evita las dificultades impuestas en los xenotrasplantes por la falta de un sistema inmune eficiente y permite el desarrollo tumoral en un microambiente nativo. Si la expresión de las alteraciones genéticas

introducidas en los ratones es limitada a diferentes subpoblaciones celulares en un tejido en particular, es posible realizar investigaciones en el marco de las CMT. Los inconvenientes de este modelo son la dificultad para generar ratones con más de una alteración genética y el hecho de que los tumores generados no son humanos (Williams S. 2013).

Probablemente en el futuro sea posible realizar rutinariamente trasplantes de CMT humanas en ratones modificados de forma tal que pueda evitarse, o al menos reducirse, tanto la deficiencia del sistema inmunológico como los problemas del microambiente tumoral (Valent P. 2012). Se ha demostrado que esto es posible si se utilizan ratones transgénicos que puedan expresar ciertas citoquinas humanas y/o ratones con vasculatura u órganos humanizados (Wunderlich M. 2010; Akkina R. 2011; Strowig T. 2011).

➤ *Técnicas de seguimiento de linaje in vivo (“lineage tracing”).*

Los experimentos de seguimiento de linaje *in vivo* han aportado recientes y valiosas evidencias en favor del modelo jerárquico de progresión tumoral. Esta estrategia, muchas veces realizada en ratones modificados genéticamente, ha sido empleada exitosamente en adenomas intestinales (Schepers A. 2012), en tumores de mama (Zomer A. 2013) y en tumores epidérmicos (Driessens G. 2012) entre otros, contribuyendo en gran medida, como se verá a continuación, en la determinación del origen celular de ciertos tipos de cáncer (Blanpain C. 2013 a). Estos hallazgos resaltan la utilidad de los modelos animales para el desarrollo de la investigación traslacional (Valent P. 2012). Más adelante se describirá cómo esta metodología contribuyó profundamente en la comprensión de la propagación del GBM, luego de tratar a éste con quimioterapia (Chen J. 2012 a).

Abundancia relativa de las células madre tumorales

El modelo jerárquico de propagación tumoral ha cobrado gran aceptación en los últimos años gracias al creciente número de publicaciones que lo avalan en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, aún no es posible afirmar que este modelo pueda explicar los mecanismos de propagación de todos los tumores

conocidos. De hecho, tampoco está del todo claro cuál es la frecuencia de las CMT en los distintos tipos de cáncer. En la mayoría de las estimaciones realizadas, dicha frecuencia es muy baja (desde 1 cada 100.000 células, hasta 1 cada 1000 células) (Ishizawa K. 2010). Sin embargo, ha sido reportado que si se trasplantan células de melanoma en presencia de matrigel (matriz extracelular sintética) a ratones NOD/SCID deficientes para el receptor γ de interleuquina 2 (también conocidos como NSG, del inglés, NOD/SCID gamma), los cuales tienen defectos adicionales en el sistema inmune, la frecuencia de CMT estimada aumenta un orden de magnitud, alcanzando valores de 1 cada 4 células (Quintana E. 2008), demostrando que la abundancia relativa de las CMT no siempre es baja. De todas formas, este caso pareciera ser una excepción más que una regla. Serán necesarios nuevos trabajos en los que se utilicen dichas condiciones experimentales para evaluar si la baja frecuencia de CMT hallada en muchos otros tumores es consecuencia de condiciones experimentales sub-óptimas (Beck B. 2013). Es importante advertir que si el porcentaje de CMT en un tipo de cáncer en particular es muy elevado, el grado de organización jerárquica de un tumor probablemente será menor (Valent P. 2012).

Célula de origen y refinamiento del modelo

Desde que fue propuesto el modelo jerárquico de propagación tumoral, se ha intentado determinar si los tumores que siguen esta organización se originan a partir de CMA, de progenitores en tránsito o de células diferenciadas. Hace ya varios años que se sugiere que cualquiera de estas opciones podría ser posible (Kim C. 2008). El requisito fundamental para que una célula distinta de una CMA se vuelva una CMT, consistiría en que ésta sufra las alteraciones necesarias para volverse auto-renovable en el largo plazo y poder así sustentar el crecimiento tumoral (Jordan C. 2009).

Existen ciertos tipos celulares, como los linfocitos, que mantienen una extensa capacidad auto-renovable, aun cuando han alcanzado un estado de diferenciación terminal. En estos casos, a diferencia de la mayoría de las células diferenciadas, no serían necesarias demasiadas alteraciones para que una célula

transformada pueda adquirir las propiedades de una CMT (Valent P. 2012). Podría creerse que la adquisición de la capacidad de auto-renovación por parte de células diferenciadas es poco probable. Sin embargo, el hallazgo de que es posible reprogramar distintas células somáticas para convertirlas en células madre pluripotentes inducidas o iPSCs (del inglés *Induced Pluripotent Stem Cells*) mediante tan sólo la expresión de 4 genes, ha demostrado que los procesos de desdiferenciación celular no son tan improbables (Takahashi K. 2007).

Recientemente han sido publicados numerosos trabajos basados en la técnica de seguimiento de linaje *in vivo* en los que se ha podido determinar, con gran precisión, el origen celular de distintos tipos de cáncer (Blanpain C. 2013a). Los resultados obtenidos en estos trabajos demostraron que la expresión de determinados oncogenes en las células de un órgano en particular, produce la transformación de ciertas subpoblaciones pero no de otras y que este evento no siempre coincide con el potencial proliferativo de las células ni con la habilidad de los oncogenes en promover la división celular. Una segunda conclusión importante que puede extraerse de estas publicaciones consiste en que los marcadores de diferenciación que expresa una célula tumoral no necesariamente son indicativos del origen celular del tumor correspondiente (Youssef K. 2010; Lapouge G; 2011). Por ejemplo, en cáncer de mama se observó que las células tumorales que muestran un fenotipo de células basales, serían originadas a partir de células lumbinales (Molyneux G. 2010).

Por lo tanto, actualmente se acepta que el origen celular de un tumor dependerá principalmente del tipo de cáncer en cuestión y de la combinación de mutaciones acumuladas en las células de un órgano dado. La identificación del origen celular en los distintos tipos de cáncer permitirá comprender con mayor detalle los mecanismos moleculares que conllevan a la iniciación y a la progresión del cáncer. Este conocimiento también podría posibilitar el desarrollo de estrategias terapéuticas destinadas a prevenir, e incluso bloquear, el desarrollo tumoral (Blanpain C. 2013).

Plasticidad fenotípica en células tumorales

Se ha observado que durante la regeneración tisular, en condiciones en las cuales las CMA han sido agotadas, ciertos tipos de progenitores tempranos son capaces de repoblar los nichos correspondientes y exhibir propiedades de CMA. Esto ha sido documentado en la piel (Ito M. 2004) y en el intestino (van Es J. 2012). También han sido reportados indicios de este fenómeno de “reversibilidad fenotípica” en células tumorales. En melanoma se ha demostrado que la expresión de ciertos marcadores de superficie es variable de manera dinámica y reversible entre distintas subpoblaciones celulares (Quintana E. 2010). En tumores intestinales ha sido sugerido que la activación paracrina de la vía de señalización de Wnt en células Lgr5⁻ podría conferirles características de CMT (Kemper K. 2012). En células de carcinoma escamoso de piel, células CD34^{bajo} son capaces de dar origen a células CD34^{alto} luego de ser trasplantadas en animales. Sin embargo, estas células no generan tumores secundarios con la misma eficiencia que muestran las células CD34^{alto} aisladas de tumores primarios (Lapouge G. 2012). Esto sugiere que la reversibilidad en la expresión de un marcador de superficie no necesariamente está acompañada de una reversibilidad de todas las propiedades celulares. Resultados similares han sido reportados en células aisladas de cáncer de mama (Gupta P. 2011).

La adquisición de propiedades de CMT por parte de otros tipos celulares podría ser inducida por factores de crecimiento secretados del microambiente y por señales de estrés. Por ejemplo, en cáncer de colon, el factor de crecimiento del hepatocito (HGF, del inglés *hepatocyte growth factor*) ha sido implicado en la reprogramación celular hacia un fenotipo similar al de CMT (Vermeulen L. 2010). En gliomas, la inducción de HIF2 α (del inglés, *hypoxia-inducible factor 2 alpha*), un factor de transcripción mediador de la respuesta a hipoxia, ha sido involucrado en el mantenimiento de CMT, en la adquisición de propiedades de CMT y en el aumento de la expresión de CD133, un marcador de CMT de gliomas (Heddleston J. 2009; Li Z. 2009). La idea de la inter-conversión fenotípica de las células tumorales plantea nuevos desafíos en el diseño de tratamientos. De hecho, se ha

propuesto que la reversibilidad de estados celulares podría ser determinante en la resistencia tumoral frente a diversos tratamientos (Sharma S. 2010).

La mayoría de los trabajos en los que se ha observado este fenómeno de “plasticidad celular” han sido realizados en líneas celulares o en cultivos primarios. Hasta la fecha no está del todo claro si este fenómeno de desdiferenciación tumoral ocurre *in vivo*. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, sí se ha observado que esto puede ocurrir con baja frecuencia en tejidos normales (Barroca V. 2009). Por último, es importante considerar que la organización jerárquica de un tumor no sólo puede perderse cuando la mayoría de las células tumorales muestran propiedades de CMT; también podría desaparecer si la reversibilidad fenotípica ocurre con una frecuencia elevada (Valent P. 2012).

Células madre tumorales y metástasis

Dado que las CMT han sido definidas operacionalmente por su capacidad de generar tumores secundarios en ratones inmunodeficientes, se ha sugerido que estas células también podrían ser responsables de producir metástasis.

En cáncer de mama, las CMT caracterizadas por la expresión de CD44 parecen estar involucradas directamente en la formación de metástasis (Liu H. 2010). De manera similar, en cáncer de colon se observó que las células capaces de formar metástasis coincidían con las que mostraban mayor grado de auto-renovación a largo plazo, sugiriendo que éstas corresponden a una subpoblación de CMT (Dieter S. 2011). También en cáncer de colon, una subpoblación de células CD26⁺, presente tanto en los tumores primarios como en las metástasis, mostraron una elevada capacidad de propagación tumoral, un grado significativo de quimio-resistencia y fueron capaces de originar metástasis hepáticas luego de ser implantadas ortotópicamente (en colon) en ratones. Llamativamente, la presencia de células CD26⁺ en tumores primarios permitió predecir la aparición de metástasis en los pacientes correspondientes (Pang R. 2010). En cáncer de páncreas, sólo una subpoblación definida de CMT tuvo la capacidad de generar metástasis. Si bien tanto en las células CD133⁺ CXCR4⁺ como en las CD133⁺ CXCR4⁻ se observaron características de CMT, sólo las primeras fueron capaces

de originar metástasis (Hermann P. 2007). Es importante notar que si bien este tipo de estudios, basados en la expresión de determinados marcadores de superficie, indican que ciertas subpoblaciones poseen mayor capacidad de formar metástasis, ninguno describe si éstas, al igual que los tumores primarios, muestran una organización jerárquica (Beck B. 2013).

Nichos de células madre tumorales

Como se mencionó con anterioridad, las CMA típicamente residen en microambientes especializados denominados nichos, los cuales serían capaces de regular el balance entre la auto-renovación y la diferenciación. Aunque el concepto de nichos fue propuesto hace muchos años (Schofield R. 1978), los componentes moleculares y celulares que los definen aún no se conocen en profundidad (Reya T. 2001; Fuchs E. 2013). Estos nichos están compuestos por células mesenquimales especializadas, células diferenciadas, vasos sanguíneos y otros tipos celulares, incluyendo células del sistema hematopoyético y del sistema inmune (Spradling A. 2001). De modo similar, los tumores también están compuestos por estos tipos de células, los cuales en conjunto conforman el nicho tumoral. Aunque resulta concebible que algunas CMT no requieran de un nicho para mantener sus propiedades, es probable que otras dependan fuertemente de las señales específicas generadas por el microambiente (Visvader J. 2012). Recientemente, distintos trabajos han demostrado el rol crucial que cumplen las células endoteliales en el mantenimiento tanto de las CMA como de las CMT (Carmeliet P. 2011). Como se verá más adelante, el nicho perivascular de las CMT del SNC es uno de los nichos tumorales mejor estudiados (Gilbertson R. 2007). Además, la relevancia de ciertas señales generadas por células del estroma tumoral en el mantenimiento de las CMT ha sido demostrada en distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon (Vermeulen L. 2010), cáncer de mama (Malanchi I. 2012) y leucemias (Raaijmakers M. 2010). De este modo, las terapias destinadas a interferir con la señalización generada por los nichos tumorales podrían favorecer la eliminación de las CMT (Visvader J. 2012). Cabe destacar que en ciertos casos, la respuesta de CMT frente a distintos agentes antitumorales

in vitro ha sido diferente a la observada en condiciones *in vivo*, resaltando el importante rol que jugaría el microambiente en el éxito de las estrategias terapéuticas (Valent P. 2012).

Células madre tumorales y estrategias terapéuticas

Las terapias antineoplásicas modernas comenzaron a mediados del siglo veinte, luego de la observación de que ciertos compuestos citotóxicos lograban eliminar principalmente a las células con tasas proliferativas elevadas (Gilman A. 1963; Kohn K. 1996). Desde entonces, el desarrollo de nuevas terapias, basadas inicialmente en observaciones empíricas, ha comenzado a fundamentarse en los conocimientos actuales de la biología tumoral. Sin embargo, más allá del vertiginoso aumento de los descubrimientos en el área, las opciones terapéuticas aún son limitadas en muchos tipos de cáncer, particularmente en aquellos con un fenotipo altamente indiferenciado. Además, la recurrencia tumoral y la aparición de metástasis luego de la remisión inicial de los tumores tratados aún continúa siendo un desafío. Por estos motivos, la demostración experimental de la existencia de CMT en distintos tipos de cáncer ha permitido plantear nuevas y promisorias estrategias antineoplásicas (Zhou B. 2009).

Hace tiempo ha sido sugerido que los tumores más agresivos poseen un mayor contenido de CMT (Al-Hajj M. 2004). En la leucemia mieloide aguda humana se ha determinado que la detección de una elevada proporción de CMT durante el diagnóstico está asociada a un mal pronóstico (van Rhenen A. 2005). Del mismo modo, las muestras de melanoma que poseen células positivas para ABCB5, un marcador de CMT, exhiben un fenotipo primitivo y existe una correlación entre el porcentaje de estas células y el progreso de la enfermedad (Schatten T. 2008). Tanto en gliomas como en meduloblastomas, la abundancia relativa de células positivas para el marcador de CMT CD133 correlaciona con un mal pronóstico (Pallini R. 2008; Raso A. 2011).

Esta correlación positiva entre la frecuencia de CMT y el mal pronóstico de la enfermedad sería debida no sólo a que estas células contribuirían fuertemente al crecimiento tumoral, sino que además serían más resistentes a las terapias

antineoplásicas convencionales (Zhou B. 2009). En ciertas CMA se ha observado una mayor resistencia a la muerte celular inducida por daño en el ADN en comparación con su progenie más comprometida a la diferenciación. Estas CMA expresan elevados niveles de factores anti-apoptóticos y reparan con gran eficiencia el daño en el ADN (Mohrin M. 2010; Sotiropoulou P. 2010). Su capacidad de mantenerse quiescentes por largos períodos y su elevada expresión de diferentes bombas de eflujo pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC son otros factores que contribuyen a dicha resistencia (Dean M. 2005). En los últimos años se han publicado numerosos trabajos que indican que las CMT también poseen una elevada resistencia a la quimioterapia y a la radioterapia. Por ejemplo, ha sido documentado que el porcentaje de CMT de cáncer de colon aumenta luego de que los tumores sean tratados con quimioterapia (Dylla S. 2008). Resultados similares indican que las CMT derivadas de gliomas y de cáncer de mama exhiben un alto grado de resistencia a la radioterapia (Bao S. 2006a; Diehn M. 2009).

Durante las últimas décadas, las estrategias terapéuticas han estado orientadas principalmente a eliminar células con una elevada tasa de proliferación. Como consecuencia, los antineoplásicos clásicos, como la doxorrubicina o el paclitaxel, producen una remisión tumoral inicial sin ser efectivos, muchas veces, en la prevención de las recidivas, las cuales probablemente sean producidas a partir de CMT resistentes (Zhou B. 2009). Por estos motivos en los últimos años se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar agentes capaces de eliminar CMT sin producir daño en las poblaciones de CMA normales. Hasta ahora han sido identificados diversos blancos terapéuticos potenciales, incluyendo antígenos específicos de CMT (van Rhenen A. 2007), receptores (Jaras M. 2010), moléculas de adhesión (Jin L. 2006), intermediarios de vías de señalización (de Sousa E. 2011; Martelli A. 2011), modificadores de la cromatina (Dawson M. 2011) y enzimas con funciones metabólicas (Chaturvedi A. 2013). Sin embargo, la gran mayoría de estos estudios se encuentran en fases muy tempranas. De hecho, las conclusiones derivadas de investigaciones en CMT muchas veces pueden no ser del todo confiables. En muchos casos, los marcadores utilizados para definir y

estudiar CMT resultan poco específicos y no necesariamente definen a todas las CMT presentes en un tumor. Por otra parte, a menudo no es posible evaluar inequívocamente la remisión total de un tumor. Esto se debe a que muchas de las metodologías empleadas no son lo suficientemente sensibles para detectar un número muy pequeño de células remanentes. Además, generalmente, la esperanza de vida normal de los animales de laboratorio no es lo suficientemente alta para evaluar éxitos terapéuticos a largo plazo (Valent P. 2012). De todos modos, el concepto de CMT ha permitido plantear nuevas estrategias terapéuticas (Figura 6), las cuales podrían ser eficaces tanto de forma individual como combinada.

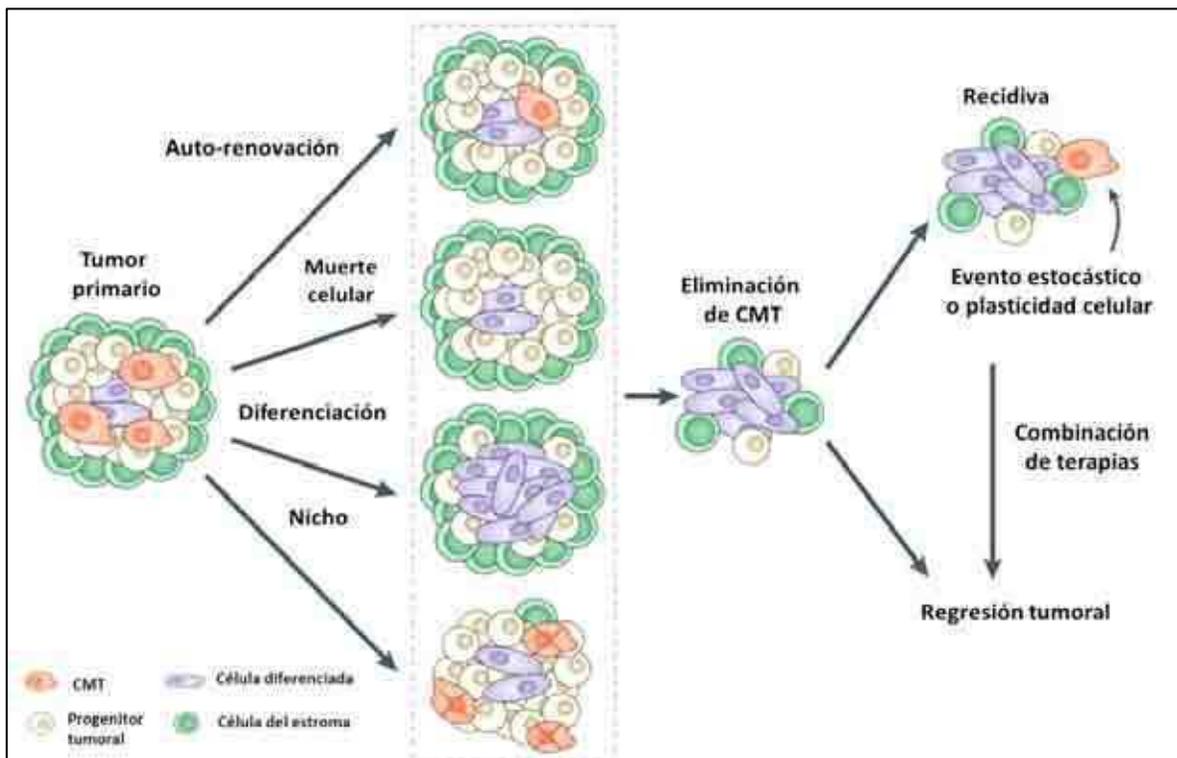


Figura 6: Implicancias de las CMT en terapias antineoplásicas y recidivas tumorales. El uso de drogas capaces de impedir la auto-renovación de las CMT, inducir su muerte, su diferenciación o modificar su nicho, conllevaría a la depleción del "pool" de CMT y a la subsecuente regresión tumoral. Sin embargo, si las propiedades de las CMT fuesen reversibles o si la adquisición de nuevas mutaciones confiriese resistencia a estas terapias, la regresión tumor resultaría transitoria. Modificado de Beck B. et. al. 2013.

CÉLULAS MADRE TUMORALES DEL SISTEMA NERVIOSO

En el año 1992 se describe por primera vez un protocolo que permite obtener y propagar *in vitro* células provenientes del SNC de ratones adultos (Reynolds B. 1992). En este trabajo, luego de disociar enzimáticamente el cuerpo estriado de ratones de entre 3 y 18 semanas de edad, los autores lograron cultivar las células obtenidas en un medio libre de suero suplementado con el factor de crecimiento epidermal (EGF, del inglés, *epidermal growth factor*). En estas condiciones y luego de 48 horas de cultivo, fueron detectadas células proliferantes en suspensión capaces de dar origen a agregados celulares, los cuales fueron luego denominados “neuroesferas” (NE). Una década más tarde se publica un trabajo en el que los autores, utilizando un protocolo similar al mencionado en el párrafo anterior, logran cultivar *in vitro* y caracterizar células derivadas de gliomas corticales humanos, encontrando similitudes entre éstas y las CMA del sistema nervioso (Ignatova T. 2002). En el año 2003, el grupo de investigación dirigido por Peter Dirks obtiene resultados similares y demuestra que las subpoblaciones tumorales que expresan el marcador CD133 exhiben propiedades de CMT (Singh S. 2003). Un año después, este mismo grupo encuentra que sólo las subpoblaciones CD133⁺ eran capaces de originar tumores en ratones NOD/SCID y que éstos además conservaban las características fenotípicas de los tumores originales (Singh. S. 2004). Notablemente, en el mismo año se describe que la línea celular C6, derivada de un glioma de rata, contiene un pequeño porcentaje (0,4%) de células que exhiben propiedades de CMT y se caracterizan por ser capaces de excluir el colorante vital Hoechst 33342. Este resultado ha permitido sugerir que las líneas celulares contienen una fracción pequeña de CMT, responsables de la auto-renovación de los cultivos (Kondo T. 2004).

Estos trabajos seminales no sólo representaron el inicio de las investigaciones en CMT derivadas de gliomas, sino que además han permitido la realización de trabajos científicos a partir de muestras quirúrgicas de pacientes con otros tipos de tumores cerebrales (Morrison L. 2013; Taylor M. 2005).

Regiones neurogénicas del sistema nervioso

Durante gran parte del siglo pasado dominó la idea que las células del sistema nervioso adulto de los mamíferos eran incapaces de proliferar y generar nuevas células diferenciadas. Este paradigma sólo se basaba en la falta de evidencias experimentales que indicaran lo contrario. Esta visión cambió luego de que se observaran regiones con capacidad neurogénica en cerebros adultos (Reynolds B. 2005). Años más tarde se desarrollaron sistemas *in vitro* que permitieron propagar células del sistema nervioso (Reynolds B. 1992; Richards L. 1992) y finalmente se descubrió la existencia de células madre neurales (CMN) en el SNC de los mamíferos adultos (Weiss S. 1996).

Las CMN han sido halladas en diferentes regiones del cerebro humano adulto. Éstas comprenden el hipocampo (Eriksson P. 1998), la materia blanca subcortical (Nunes M. 2003) y la zona subventricular (ZSV) (Doetsch F. 1999) (Figura 7A). La principal región neurogénica del SNC de los mamíferos es la ZSV (Figura 7B). Dentro de ésta, las células que expresan el marcador de astrocitos GFAP (del inglés, *glial fibrillary acid protein*) han sido propuestas como las CMN de esta región. Estas células madre simil-astrocitos, con un ciclo celular promedio de aproximadamente 28 días, se denominan células B y representan una pequeña subpoblación de los astrocitos de la ZSV (Morshead C. 1994; Doetsch F. 1999). *In vivo*, las células B se dividen para generar células C, las cuales poseen un ciclo celular promedio de 12 horas y mantienen la multipotencia (Ming G. 2005). Otra región neurogénica importante corresponde a la zona subgranular (ZSG), localizada en el hipocampo. En esta región, la cual contiene astrocitos fuertemente asociados a vasos sanguíneos, se observan focos de proliferación activa. Al igual que en la ZSV, en esta región están presentes células madre adultas capaces de generar distintos tipos de precursores (Eriksson P. 1998; Ming G. 2005).

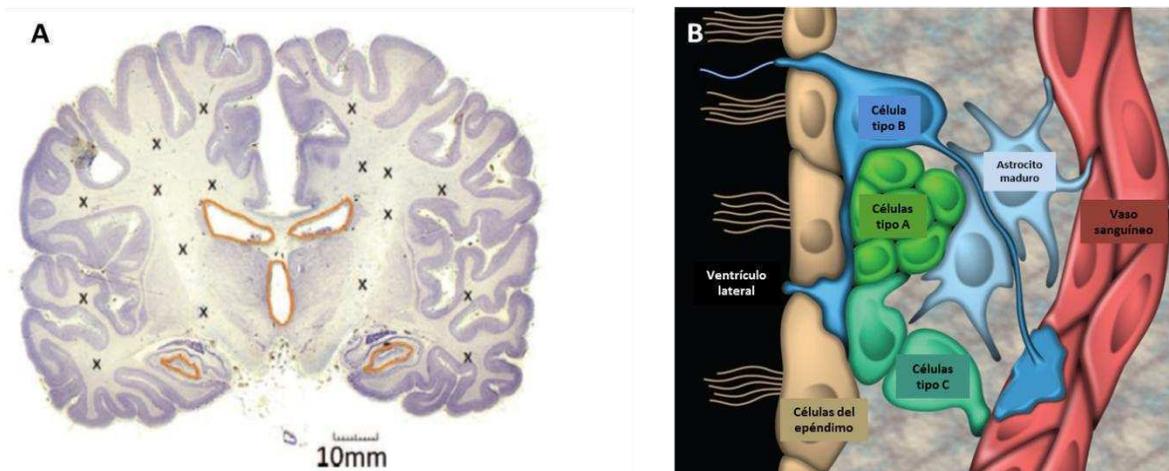


Figura 7. A. Localización de células multipotentes dentro del cerebro. Las áreas marcadas en color naranja denotan regiones que presentan CMN. Las "X" muestran áreas habitadas por progenitores gliales. Imagen obtenida de *The Brain Biodiversity Bank at Michigan State University*, <https://www.msu.edu/brains> y modificado de Nduom E. et. al. 2012. **B. Celulas madre neurales adultas de la ZSV.** Los diferentes tipos de CMN se clasifican de acuerdo a su capacidad de auto-renovación y de diferenciación. Las células radiales GFAP⁺ son células tipo B que están expuestas al ventrículo y en contacto con los vasos sanguíneos a través de la cilia apical y los extremos basales respectivamente. Las células tipo B poseen el potencial de generar células tipo C, que corresponden a CMN capaces de dividirse activamente. Éstas finalmente dan lugar a las células tipo A. Modificado de Suh H. et. al. 2009.

Origen celular de los gliomas

Muchas de las investigaciones destinadas a dilucidar el origen celular de los gliomas fueron realizadas en ratones modificados genéticamente. En éstos, es posible inducir la expresión de oncogenes o impedir la expresión de genes supresores de tumor en determinadas subpoblaciones celulares del sistema nervioso adulto. Como se verá a continuación, de manera similar a lo descrito en diferentes tipos de cáncer, la alteración de la expresión de determinados oncogenes o genes supresores tumorales induce la transformación de ciertas subpoblaciones pero no de otras. Sin embargo, las evidencias experimentales indican que en la mayoría de los casos, los gliomas se originarían a partir de CMA, o más probablemente, de progenitores tempranos (Alcantara-LLaguno S. 2011).

En el año 2000 es publicado un trabajo que sugiere que las proteínas Akt y RAS promueven la generación de gliomas de alto grado sólo si éstas se encuentran conjuntamente activadas en progenitores neurales (Holland E. 2000). En otro trabajo, desarrollado en ratones en donde es posible inducir la formación

de gliomas de alto grado al impedir la expresi3n del supresor tumoral PTEN (del ingl3s, *phosphatase and tensin homolog*), se determin3 que los cerebros de ratones pre-sintom3ticos exhibían una migraci3n aberrante de c3lulas de la ZSV, sugiriendo que este nicho de CMN podría representar una regi3n del cerebro en la cual se originan los gliomas (Kwon C. 2008). En concordancia con estos resultados, se demostraría luego que la inactivaci3n de determinados supresores tumorales, entre los que se incluye PTEN, en c3lulas madre o en progenitores neurales, es suficiente para generar astrocitomas de alto grado en ratones. En este mismo trabajo tambi3n fue determinado que la inactivaci3n de dichos supresores tumorales en c3lulas diferenciadas no conlleva a la formaci3n de tumores (Alcantara-LLaguno S. 2009). Resultados similares fueron publicados de manera independiente (Jacques T. 2010). Sin embargo, ha sido reportado que la activaci3n del EGFR (del ingl3s, *epidermal growth factor receptor*) y la ausencia conjunta de Ink4a (p16) y de p19 (ARF), tanto en CMN como en astrocitos diferenciados, promueven la formaci3n de gliomas de alto grado. La falta de p16 y de ARF permitirían la desdiferenciaci3n astrogliar, facilitando así la transformaci3n de las c3lulas con elevada actividad del EGFR (Bachoo R. 2002). Se observ3 tambi3n que la activaci3n de HRAS y de Akt en ausencia de p53, promueve la generaci3n de gliomas a partir de CMN y de progenitores tempranos. Contrariamente, la alteraci3n de estas proteínas en c3lulas diferenciadas de la corteza cerebral s3lo ocasionalmente genera este tipo de tumores (Marumoto T. 2009).

Por estas razones, generalmente se acepta que diferentes tipos celulares del linaje astrogliar sean capaces de transformarse y desarrollar gliomas, aunque resulta m3s probable que este tipo de tumores se origine, al menos en la mayoría de los casos, a partir de CMN o de progenitores tempranos. En la figura 8 se esquematizan los diferentes orígenes celulares posibles de los tumores del SNC.

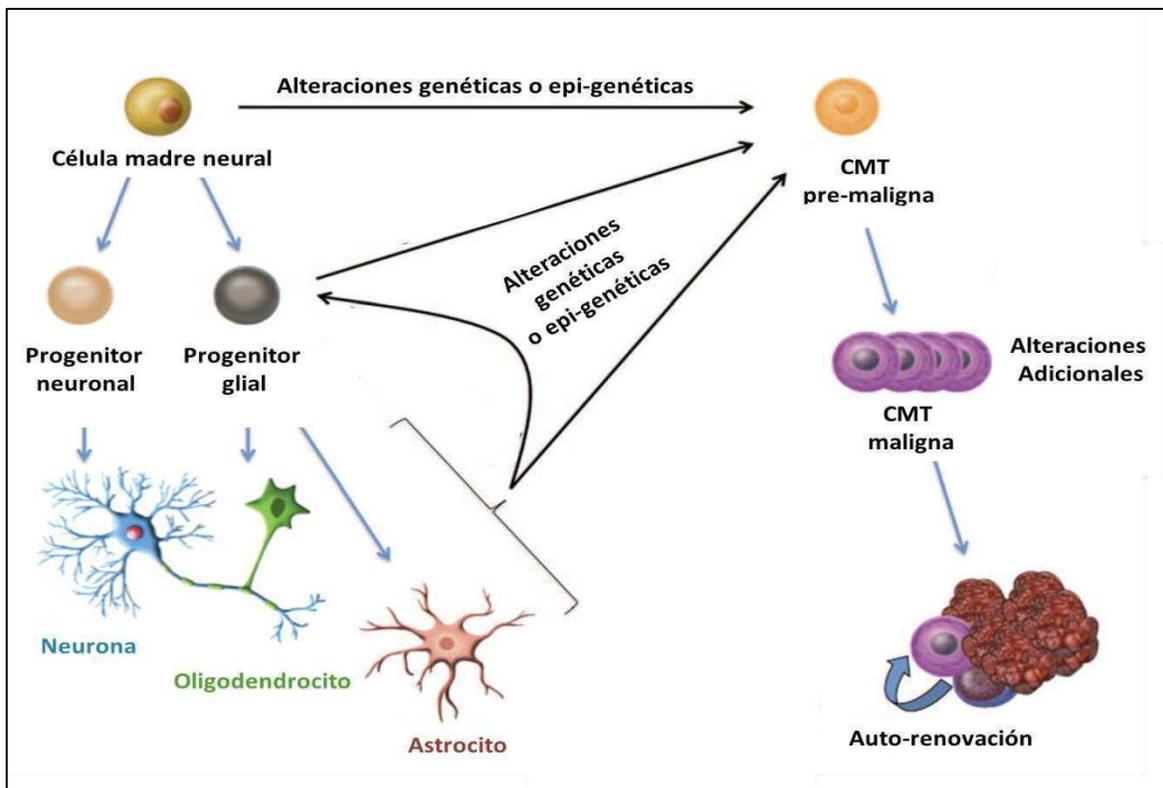


Figura 8. Origen celular de los tumores del SNC. Las teorías más recientes contemplan que los eventos de transformación neoplásica iniciales podrían ocurrir en diferentes tipos celulares presentes en el sistema nervioso adulto: CMN, progenitores en tránsito y células diferenciadas. Sin embargo, las evidencias experimentales indican que el origen más frecuente de estos tumores sería a partir de las CMN o de los progenitores en tránsito. Modificado de Nduom E. et. al. 2012.

Marcadores de células madre tumorales del sistema nervioso

Al igual que en muchos tipos de cáncer, en gliomas también existen distintos marcadores capaces de definir poblaciones de CMT. Éstos corresponden, en muchas oportunidades, a proteínas que previamente han sido identificadas como marcadores de CMN (Pollard S. 2009; Chen J. 2012 b).

Como se describió anteriormente, el primer marcador utilizado para obtener subpoblaciones enriquecidas en CMT de gliomas fue la proteína CD133 (Singh S. 2004), también conocida como Prominina-1. Ésta fue descrita inicialmente en células neuroepiteliales de ratón (Weigmann A. 1997) y rápidamente fue propuesta como un marcador de CMH humanas (Yin A. 1997). Más tarde, se observó su expresión en células de diversos órganos, tanto embrionarios como adultos. En algunos de ellos, por ejemplo en páncreas, riñón, hígado y retina, esta proteína

también ha sido utilizada para aislar exitosamente CMA y progenitores. CD133 corresponde a una glicoproteína de 5 pasos transmembrana localizada normalmente en las membranas celulares. El gen que codifica esta proteína, PROM1, posee al menos 24 exones y en humanos actualmente se conocen 5 promotores alternativos y 7 formas de corte y empalme (*splicing*) alternativas. Las distintas variantes de esta proteína muestran una expresión tejido específica y su regulación varía en función del desarrollo. Si bien aún no tiene asignada una función fisiológica, se ha determinado que se encuentra preferentemente en proyecciones de las membranas plasmáticas (por ejemplo, microvellosidades y cilias) asociándose al colesterol de éstas. También ha sido demostrado que cumple un rol fundamental en el desarrollo de los fotorreceptores de ratón (Grosse-Gehling P. 2013).

Además de ser el primer marcador eficaz para lograr el enriquecimiento de CMT de gliomas, CD133 también ha sido empleada exitosamente para aislar CMT a partir de otros tipos de cáncer, incluyendo entre otros, cáncer de colon (Ricci-Vitiani L. 2007; O'Brien C. 2007), cáncer de mama (Meyer M. 2010), cáncer de pulmón (Eramo A. 2008) y cáncer de ovario (Curley M. 2009). Sin embargo, se ha generado cierta controversia en torno a estos resultados ya que también ha sido observado que determinadas células CD133⁺ poseen las propiedades fundamentales de las CMT (Shmelkov S. 2008; Du L. 2008; Chu P. 2009). De hecho, en gliomas, la existencia de CMT CD133⁺ ha sido reportada en distintas ocasiones. Algunos de estos resultados han sido relativizados por haber sido obtenidos a partir de células mantenidas *in vitro* (Beier D. 2007; Chen R. 2010). En estas condiciones podrían ocurrir modificaciones genéticas, epigenéticas y/o selecciones de ciertas subpoblaciones celulares (Venere M. 2011). Sin embargo, resultados similares también fueron observados a partir de células que no fueron propagadas en condiciones de cultivo (Joo K. 2008; Ogden A. 2008; Wang J. 2008). Por lo tanto, ha sido propuesto que existiría una clase de CMT de gliomas que no expresa CD133 (Joo K. 2008).

CD44, una glicoproteína de membrana capaz de unirse al ácido hialurónico y a otros sustratos de la matriz extracelular, se expresa en diversos tejidos, tanto

embrionarios como adultos (Zoller M. 2011). Ha sido reportado que esta proteína se encuentra presente en diferentes células del SNC, incluyendo CMN y progenitores gliales (Luo Y. 2002; Pollard S. 2009; Naruse M. 2013). CD44 también ha sido detectada en líneas celulares derivadas de gliomas humanos (Pollard S. 2009). Recientemente CD44 ha sido empleada exitosamente, en combinación con Id1 (del inglés, *inhibitor of DNA binding 1*), para identificar una subpoblación enriquecida en CMT de gliomas (Aido J. 2010). Otras proteínas de membrana, como SSEA-1 (CD15) (Son M. 2009) y la integrina $\alpha 6$ (Lathia J. 2010) también han sido descritas como marcadores de CMT de gliomas de alto grado.

El factor de transcripción Sox2 se expresa en diferentes tipos de células madre, incluyendo las células madre embrionarias humanas (CMEH) y las CMN, y participa en importantes aspectos del desarrollo (Bani-Yaghoub M. 2006; Fong H. 2008; Suh H. 2007; Cavallaro M. 2008). Además, Sox2 ha sido propuesto como un marcador de CMT ya que no sólo ha sido detectado en células derivadas de gliomas humanos con características de CMT (Pollard S. 2009), sino que también se ha determinado que cumple un importante rol en el mantenimiento de la auto-renovación de este tipo de líneas celulares (Gangemi R. 2009).

Por otra parte, dado que determinados filamentos intermedios son expresados diferencialmente durante el desarrollo del sistema nervioso, éstos son comúnmente utilizados para evaluar el grado de diferenciación de distintas subpoblaciones celulares (Lepinoux-Chambaud C. 2013). Por ejemplo, la proteína Vimentina se expresa tanto en CMN (Pollard S. 2009) como en astrocitos inmaduros y en algunos tipos de astrocitos maduros (Liem R. 2009). Nestina, otro filamento intermedio, es detectada exclusivamente en células indiferenciadas del sistema nervioso, tanto durante el desarrollo embrionario como en los nichos de CMN presentes en los cerebros adultos (Krupkova O. 2010). Ambos filamentos intermedios son considerados marcadores de CMT de gliomas (Pollard S. 2009; Chen J. 2012 a; Lepinoux-Chambaud C. 2013). En la clínica, el grado de expresión de Nestina y de CD133 es mayor en gliomas de alto grado, lo que les confiere un valor pronóstico (Pallini R. 2011; Dahlrot R. 2013).

Estrategias terapéuticas y células madre tumorales del sistema nervioso

Pese a décadas de avances en neurocirugía, radioterapia y quimioterapia, la tasa de supervivencia a 5 años de los gliomas de alto grado se mantiene aún por debajo del 5% y prácticamente en todos los casos la recurrencia tumoral es inevitable (Dolocek T. 2012). En este contexto, el descubrimiento de las CMT de gliomas parece ofrecer una explicación, al menos parcial, para la elevada recurrencia de estos tumores luego de distintos tratamientos (Chen J. 2012 a y b). Ha sido reportado que la subpoblación celular CD133⁺ derivada de gliomas humanos posee mayor resistencia a la radiación ionizante respecto a las células CD133⁻. Este fenómeno se debería, al menos en parte, a que las CMT de gliomas muestran una mayor actividad de las vías de reparación del ADN mediadas por Chk1 y Chk2 (del inglés, *checkpoint kinase*) (Bao S. 2006a). Por otra parte, se demostró que las CMT de gliomas son capaces de sobre-expresar determinadas bombas de eflujo presentes en las membranas celulares, pudiendo así exportar distintos agentes quimioterapéuticos, entre ellos la temozolamida (TMZ) (Bleau A. 2009). Recientemente, en un elegante trabajo basado en la técnica de seguimiento de linaje *in vivo* realizado en ratones, se demostró que la recurrencia tumoral luego del tratamiento de gliomas de alto grado con TMZ ocurre a partir de una población de CMT caracterizada por ser Nestina⁺ (Chen J. 2012 a). En este trabajo se ha logrado además obtener evidencias *in vivo* a favor del modelo de organización jerárquica de los gliomas.

Estos descubrimientos ponen de manifiesto la necesidad de definir nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a eliminar, directa o indirectamente, a las subpoblaciones de CMT. Numerosos trabajos han puesto en evidencia que ciertas vías de señalización, entre ellas la de Hedgehog (Zbinden M. 2010) y la de Wnt (Zheng H. 2010), son cruciales en el mantenimiento de la auto-renovación de las CMT de gliomas. Como se detalla a continuación, existen diferentes estrategias terapéuticas promisorias, entre las cuales se encuentran la inducción de la diferenciación de las CMT y la alteración de las señales generadas por los nichos tumorales.

Diferenciación de las células madre tumorales del sistema nervioso

Las proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, del inglés, *bone morphogenetic proteins*) comprenden una familia de citoquinas pertenecientes a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β , del inglés, *transforming growth factor β*) que cumplen importantes funciones en el desarrollo embrionario, incluyendo el del SNC. Esta familia está compuesta por un gran número de ligandos (entre los cuales BMP2 y BMP4 poseen funciones de gran relevancia en el desarrollo del sistema nervioso) capaces de unirse a 2 tipos de receptores de membrana: BMPR tipo 1 y BMPR tipo 2, ambos con actividad de serina/treonina quinasa. Dentro de los receptores tipo 1 se encuentran los subtipos 1A y 1B (BMPR1A y BMPR1B). El complejo funcional corresponde a un tetrámero formado por dos subunidades tipo 1 y dos subunidades tipo 2. Estas últimas funcionan como co-receptores y en presencia del ligando fosforilan y activan a las subunidades tipo 1. Luego, en la denominada vía canónica, las formas activas de estas subunidades receptoras son capaces de fosforilar a los miembros de la familia proteica Smad. Los Smads se clasifican en 3 grupos: R-Smads (Smads 1/5/8), los cuales son regulados positivamente por los receptores tipo 1; I-Smads o Smads inhibitorios (Smads 6/7), que por competencia impiden la acción de los R-Smads y Smad4 o co-Smad, el cual funciona como un adaptador para los distintos R-Smads. Una vez fosforilados, los distintos R-Smads se asocian a Smad4 y los complejos resultantes translocan al núcleo, en donde son capaces de interactuar con factores de transcripción, co-activadores o co-represores, modulando así la expresión de distintos genes. Además, han sido descritas diferentes vías no canónicas, las cuales aumentan la complejidad de este sistema (Bond A. 2012). La actividad de las vías de la familia BMP es tan importante durante el desarrollo como lo es su inhibición; de hecho, el establecimiento del neuroectodermo requiere la ausencia de señales mediadas por BMP. En la actualidad se conocen más de veinte antagonistas naturales diferentes, los cuales son capaces de unirse a ciertos miembros de la familia BMP, impidiendo que éstos se unan a los BMPR correspondientes. Uno de ellos es la proteína Nogina (*Noggin*). Estudios *in vitro* han demostrado que ésta se une con distintas afinidades a BMP2, BMP4, BMP5,

BMP6, BMP7, BMP13 y BMP14, antagonizando así sus respectivas acciones. Los ratones deficientes para Nogina mueren durante el desarrollo embrionario, exhibiendo fallas en la formación del tubo neural, dismorfogénesis del esqueleto axial y lesiones articulares (Krause C. 2011).

En embriones tempranos, las BMP son capaces de promover tanto la proliferación como la diferenciación de CMN hacia el linaje neuronal. Estos procesos están dirigidos por la señalización de los receptores BMPR1A. Sin embargo, la actividad de este receptor no sólo mantiene la proliferación de ciertas CMN, sino que también induce la expresión del receptor BMPR1B, el cual en fases más tardías del desarrollo, promueve la salida del ciclo celular y la diferenciación astrogliar (Figura 9). De este modo, el cambio en los patrones de expresión de los receptores de BMP promueve el establecimiento de tres fases fundamentales del desarrollo del sistema nervioso: una fase de expansión de células indiferenciadas, una fase de especificación y diferenciación neuronal y una fase de especificación y diferenciación astrogliar (Panchision D. 2002; Bond A. 2012).

Como se describe a continuación, las vías de señalización mediadas por la familia BMP no sólo son fundamentales en el control del destino celular de las CMN, sino que también han demostrado ser efectivas en la diferenciación de las CMT de gliomas.

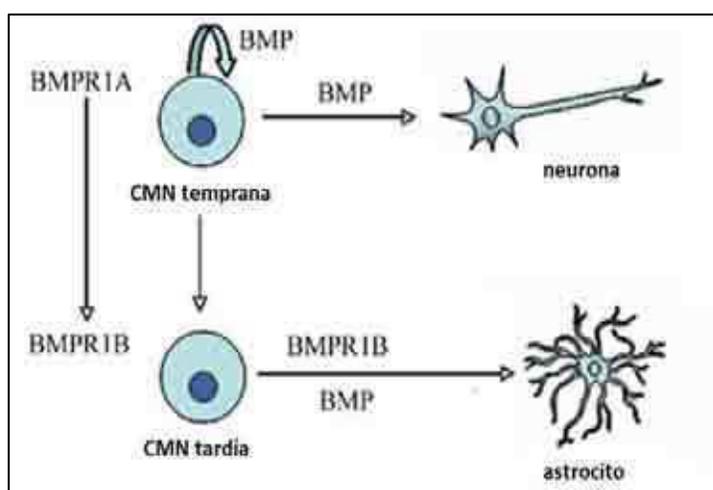


Figura 9. Efectos de la señalización mediada por la familia BMP en CMN. Durante el desarrollo temprano del sistema nervioso las BMP promueven, mediante el receptor BMPR1A, tanto la proliferación como la diferenciación hacia el linaje neuronal de CMN. Por el contrario, el aumento de expresión de BMPR1B en CMN presentes durante el desarrollo tardío conlleva a que las BMP promuevan la diferenciación astrogliar. Modificado de Nakano I. et. al. 2008.

Es importante tener presente que aunque el modelo de organización jerárquica de los tumores propone que las CMT comparten propiedades con las CMA, no siempre existen similitudes en los diferentes aspectos celulares. Tanto las CMA como las CMT son poblaciones auto-renovables en el largo plazo y ambas comparten un fenotipo indiferenciado; sin embargo, sus respectivas capacidades para dar origen a células diferenciadas de distintos linajes pueden ser muy diferentes. Si bien es frecuente que determinados contextos moleculares, tanto *in vitro* como *in vivo*, promuevan la diferenciación de las CMT, esto no necesariamente deberá ocurrir en todos los casos. Dado que la regulación de la diferenciación celular se encuentra íntimamente asociada a los sistemas de control del ciclo celular y éstos normalmente se encuentran alterados en las células tumorales, no resulta llamativo que las células que posean propiedades de CMT, muestren también perturbaciones en las vías de señalización responsables de la diferenciación celular. Por lo tanto, la multipotencia, aunque muchas veces se encuentra asociada a estas células, no constituye un requisito para que una célula sea considerada CMT (Ward R. 2007; Venere M. 2011).

En el año 2006 se demostró por primera vez que distintos miembros de la familia BMP (principalmente BMP4) son capaces de promover la diferenciación de CMT de gliomas (Piccirillo S. 2006). En este trabajo, los autores aislaron la subpoblación CD133⁺ de diferentes muestras de GBM y evaluaron las consecuencias de cultivar estas células en presencia de BMP4. *In vitro* detectaron una importante reducción de la proliferación y de la capacidad clonogénica de estas células, junto con un significativo aumento en el nivel de expresión de marcadores de diferenciación neuronal y astrogial. Además, lograron determinar que el tratamiento de las células CD133⁺ con BMP4, durante sólo 48 horas, es suficiente para impedir que éstas formen tumores cerebrales en ratones inmunodeficientes. Finalmente, demostraron que la administración *in vivo* de BMP4 permite bloquear el crecimiento de tumores pre-existentes. En otro importante trabajo (Lee J. 2008) se determinó la existencia de CMT derivadas de GBM con una capacidad de diferenciación disminuida o nula en respuesta a miembros de la familia BMP y al factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés, *ciliary*

neurotrophic factor). Los autores reportan que esto se debe a una metilación del promotor del receptor BMPR1B mediada por la metiltransferasa de histonas EZH2. Notablemente, en las CMT que poseen silenciado este receptor, el tratamiento con BMP2 no sólo no produce la diferenciación de estas células, sino que por el contrario, induce su proliferación. Finalmente en este trabajo se observa que la sobre-expresión de BMPR1B en las CMT que poseen metilado el promotor endógeno correspondiente permite que éstas se vuelvan sensibles a la diferenciación inducida tanto por BMP2 como por CTNF.

Es importante mencionar que la diferenciación de CMT de glioma puede también ser inducida *in vitro* mediante diferentes tratamientos. La simple remoción del EGF y del bFGF (del inglés, *basic fibroblast growth factor*) del medio de cultivo es suficiente para que estas células disminuyan su proliferación y comiencen a diferenciarse, ya que ambos factores de crecimiento están involucrados directamente en el mantenimiento de la auto-renovación de estas células (Tropepe B. 1999; Lee J. 2006). El ácido retinoico también ha sido involucrado en la diferenciación de CMT de gliomas en diversas oportunidades (Karsy M. 2010; Ying M. 2011; Friedman M. 2013). Por último, en muchos trabajos publicados se ha empleado suero fetal bovino (SFB) para evaluar la capacidad de diferenciación de estas células y su grado de multipotencia (Pollard S. 2009).

Células madre tumorales del sistema nervioso y el nicho perivascular

En el SNC las CMN se encuentran en íntimo contacto con células endoteliales formando el denominado nicho perivascular. En estas regiones, las células endoteliales secretan una variedad de factores solubles que mantienen la auto-renovación y el fenotipo indiferenciado de las CMN (Palmer T. 2000; Shen Q. 2004; Shen Q. 2008).

La presencia excesiva de vasos sanguíneos desorganizados es una de las características de los GBM. Esta vasculatura aberrante fue considerada desde hace mucho tiempo una estructura que permitiría satisfacer la enorme demanda de nutrientes por parte de las células tumorales. Sin embargo, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que indican que estas redes vasculares

juegan un rol mucho más complejo en el mantenimiento y la progresión de los tumores cerebrales (Gilbertson R. 2007). La descripción de que en gliomas, las células tumorales frecuentemente migran asociadas a los vasos sanguíneos del parénquima normal, sugirió por primera vez la existencia de una importante relación entre estas células tumorales y la vasculatura (Scherer H. 1940). Más tarde, esta observación fue confirmada tras determinarse que el número de capilares en los astrocitomas correlaciona con un peor pronóstico clínico (Leon S. 1996) y que esta clase de tumores es sensible al tratamiento con bevacizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra VEGF (del inglés, *vascular endothelial growth factor*) (Vredenburgh J. 2007).

De manera similar a los que ocurre con las CMN, las CMT de gliomas también se encuentran asociadas funcionalmente con las células endoteliales. Se ha reportado que sólo las subpoblaciones CD133⁺, aisladas directamente de muestras quirúrgicas de GBM, son capaces de generar tumores altamente vascularizados y hemorrágicos cuando son trasplantados ortotópicamente en ratones inmunodeficientes. Más aún, el tratamiento de estas células con bevacizumab logró evitar la iniciación de tumores en dichos ratones (Bao S. 2006b). Resultados similares han sido publicados independientemente (Folkins C. 2007). Por otra parte, se ha demostrado que en distintos tipos de tumores cerebrales, el nicho perivascular cumple un papel fundamental en la propagación tumoral al secretar factores que mantienen las propiedades de las CMT (Calabrese C. 2007). Notablemente, en dos trabajos independientes publicados de manera simultánea, ha sido descrito que las mismas CMT son capaces de diferenciarse incluso en células endoteliales (Ricci Vitiani L. 2010; Wang R. 2010).

Puesto que las células endoteliales han demostrado ser clave en el mantenimiento y la propagación de las CMT, muchos de los factores solubles secretados por éstas estarían involucrados en dichas funciones. Por lo tanto, conocer los mecanismos moleculares involucrados en la comunicación entre las células endoteliales y las CMT podría contribuir al diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a los gliomas de alto grado. Dentro de los factores comúnmente liberados por las células endoteliales se encuentran las

denominadas endotelinas. Como se describe a continuación, estos polipéptidos forman parte de un sistema de señalización que está involucrado en múltiples procesos biológicos, los cuales incluyen la supervivencia y la proliferación de diferentes tipos de células tumorales.

➤ Sistema endotelinérgico

Las endotelinas (EDN) conforman un grupo de polipéptidos de 21 aminoácidos (EDN1, EDN2 y EDN3). Cada una de ellas es sintetizada a partir de un precursor, que luego de ser clivado por acción de enzimas convertidoras de endotelinas (ECE), se vuelve activo (Denault et al, 1995). Las EDN actúan a través de dos subtipos de receptores, ETRA (del inglés, *endothelin receptor type A*) y ETRB (del inglés, *endothelin receptor type B*) y ambos pertenecen a la familia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G. En concentraciones fisiológicas, tanto EDN1 como EDN2 son capaces de unirse a los ETRA, mientras que las tres EDN se unen a los ETRB con una afinidad similar (Bagnato A. 2008). La EDN1 presenta una potente actividad vasoconstrictora y se expresa ubicuamente, inclusive en el cerebro (Naidoo V. 2004); la expresión de EDN2 se encuentra restringida principalmente al tracto gastrointestinal, a los órganos sexuales y a la glándula pituitaria. La EDN3 muestra, como la EDN1, una expresión amplia, habiendo sido detectada en intestino, pulmón, riñón, bazo y cerebro (Wang R. 2013). Estos polipéptidos también poseen propiedades mitogénicas, las cuales no sólo están asociadas a la remodelación vascular y a la angiogénesis, sino que también influyen en los procesos tumorales (Bagnato A. 2008).

Diferentes trabajos describen la participación de la vía de las EDN en distintos tipos de cáncer, incluyendo melanoma (Spinella F. 2007), cáncer de ovario (Spinella F. 2002), cáncer de próstata (Nelson J.1996) y cáncer de mama (Smollich M. 2007). La influencia de esta familia de polipéptidos en el cáncer es multifactorial. Según el contexto, las EDN son capaces de activar diferentes vías de señalización, entre las cuales se incluyen la vía de PI3K (del inglés, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) y la vía de ERK (del inglés,

extracelular signal-regulated kinase), promoviendo tanto la proliferación y la migración celular, como la supresión de la apoptosis y el aumento de la angiogénesis (Bagnato A. 2008). En células normales y en algunos tipos de cáncer, los efectos proliferativos y anti-apoptóticos suelen estar mediados por la EDN1 y por los ETRA, mientras que la señalización de los ETRB antagonizaría dichos efectos. Sin embargo, en otros tipos de cáncer esto no es así. En el cáncer de mama, por ejemplo, tanto la actividad de los ETRA como la de los ETRB, favorecería la invasión tumoral (Grimshaw M. 2004).

En líneas celulares de glioma se ha reportado que la EDN1 y el ETRB muestran mayores niveles de expresión que la EDN2 y el ETRA respectivamente (Paolillo M. 2006). En estos tipos celulares se demostró también que la inhibición selectiva del ETRB pero no la del ETRA, produce un arresto del ciclo celular, un aumento de la apoptosis y una inhibición de las vías de señalización mediadas por ERK y p38MAPK (Paolillo M. 2010). Llamativamente, hace unos años fue reportado que en CMT de glioma existe un circuito de señalización autocrina mediado por EDN3 y ETRB, el cual resultaría indispensable para el mantenimiento de la auto-renovación y la viabilidad de estas células (Liu Y. 2011).

Dado que las vías de señalización mediadas por EDN contribuyen a la progresión tumoral en distintos tipos de cáncer, éstas se han vuelto un posible blanco de terapias anti-neoplásicas. En la actualidad se encuentran disponibles una variedad de drogas diseñadas con el fin de interferir en el sistema endotelinérgico. Muchas de éstas han sido derivadas de investigaciones relacionadas a patologías cardiovasculares y al tratamiento del cáncer. Los mecanismos de acción de estos agentes comprenden la inhibición de enzimas convertidoras de endotelinas y el antagonismo de los ETRA y ETRB (Irani S. 2014). La mayoría de los antagonistas, desarrollados principalmente con el fin de inhibir los efectos mediados por la EDN1, son inhibidores específicos de los ETRA. Entre ellos, los más utilizados son el atrasentan (ABT-627), el zibotentan (ZD4054) y el BQ123. La efectividad de estos agentes sobre distintos tipos de cáncer ha sido demostrada en diferentes oportunidades (Irani S. 2014). Sin embargo, también existen antagonistas duales (capaces e inhibir simultáneamente a los

ETRA y a los ETRB). Ejemplos de estos últimos son el macitentan (ACT-064992) (Iglarz M. 2008) y el tezosentan (Ro 61-0612) (Clozel M. 1999; Andersson A. 2008). En particular, la administración conjunta de macitentan y TMZ está siendo evaluada en un ensayo clínico (fase I) en pacientes con GBM (Patel T. 2014). Por último, el BQ788 (Ishikawa K. 1994) es un antagonista específico de los ETRB. Si bien la combinación de estos agentes con drogas anti-neoplásicas convencionales ha mostrado buenos resultados pre-clínicos en líneas celulares y animales de laboratorio (Rosano L. 2007; Jiao W. 2007; Growcott J. 2009), los ensayos clínicos realizados hasta el momento no han arrojado datos alentadores (Kefford R. 2007; Carducci M. 2007; James N. 2010). Al parecer, aún no hay información suficiente para evaluar el alcance de estos antagonistas en las distintas terapias anti-tumorales y en la clínica oncológica (Irani S. 2014).

Modelos *in vitro* desarrollados a partir de muestras quirúrgicas de pacientes

Finalmente, es importante describir los distintos abordajes utilizados para desarrollar modelos *in vitro* derivados de muestras de gliomas de alto grado. En términos generales existen dos estrategias ampliamente utilizadas.

Una de ellas consiste en aislar subpoblaciones celulares definidas en base a la expresión de marcadores de CMT y mantenerlas en condiciones *in vitro* sólo por períodos breves, durante los cuales se realizan los distintos experimentos. De esta forma, no sólo se minimizan los posibles cambios genéticos y/o epigenéticos generados *in vitro*, sino que también se evita que las subpoblaciones pierdan su identidad por divisiones asimétricas o por presiones de selección dadas por las condiciones de cultivo. Además, se ha demostrado que cuando las CMT de glioma son inoculadas de manera inmediata, evitando su propagación en cultivo, no sólo es necesario un número de CMT considerablemente menor para producir tumores en ratones inmunodeficientes (Singh S. 2004; Pollard S. 2009; Reynolds B. 2009), sino que además la capacidad de estas células para originar un tumor con las características fenotípicas del tumor original es mucho mayor (Williams S. 2013).

La otra estrategia consiste en generar cultivos celulares en condiciones permisivas para el mantenimiento de las CMT de glioma presentes en las

muestras quirúrgicas. En estos casos, gracias al crecimiento estable de los cultivos durante largo períodos, es posible contar con grandes cantidades de material biológico, necesarias muchas veces para realizar trabajos de investigación que requieran un mayor grado de profundidad. Pese a las limitaciones descritas anteriormente, se ha demostrado que las líneas celulares propagadas en estas condiciones mantienen muchas de las características fenotípicas y genotípicas de los tumores originales (Lee J. 2006). Como se describió anteriormente en esta sección, inicialmente el cultivo de CMT fue realizado en suspensión ya que éstas, al ser incapaces de adherirse a las placas de cultivo, forman las denominadas NE. Las dificultades prácticas asociadas a esta metodología (Reynolds B. 2005) han estimulado a ciertos grupos de investigación a intentar propagar estas células en condiciones de adherencia. Recientemente ha sido reportado que el pre-tratamiento de placas de cultivo con laminina o con matrigel permite obtener cultivos adherentes sin que éstos pierdan su capacidad de auto-renovación *in vitro* (Pollard S. 2009; Gangemi R. 2009).

En este trabajo hemos optado por esta última estrategia (el establecimiento de líneas celulares en condiciones de adherencia). Como se discutirá a lo largo de este estudio, consideramos que la definición más apropiada para estos cultivos es la de *líneas de células madre/progenitoras tumorales* (CMPT).

OBJETIVOS

Desde hace años, el departamento de Neuropatología y Biología Molecular de FLENI se ha enfocado en el estudio de la biología de los gliomas. Además de los trabajos ya publicados en el campo de los oligodendrogliomas (Ferrer-Luna R. 2009; Ferrer-Luna R. 2011), actualmente se están desarrollando distintas líneas de investigación. Entre ellas se encuentra un clasificador de gliomas en base a los perfiles genómicos con la idea de disponer de una herramienta diagnóstica y pronóstica más precisa que el estándar histopatológico. También se está realizando, en colaboración con el departamento de Neuroimágenes de nuestra institución, un perfil metabólico de gliomas por espectroscopía de resonancia magnética de alto campo. Por último, se ha establecido una colaboración con los Dres. Daniel Monleón y Miguel Cerdá de la Universidad de Valencia (España) en la cual se está analizando, tanto el papel que desempeñan los microARNs en el desarrollo de los tumores gliales, como la interrelación entre microvasculatura, reprogramación metabólica y agresividad tumoral en gliomas de alto grado.

Hasta el momento hemos utilizado tejido tumoral obtenido en las cirugías como herramienta de trabajo. Si bien logramos buenos resultados, el uso de este tipo de muestras presenta varias limitaciones, entre las que fundamentalmente se encuentran la escasa cantidad de tejido disponible, la heterogeneidad de las muestras y la imposibilidad de evaluar el comportamiento celular en contextos experimentales. Con la puesta en marcha del Laboratorio de Investigaciones Aplicadas a las Neurociencias (LIAN), surgió la posibilidad de contar con un modelo experimental basado en líneas celulares derivadas de biopsias de pacientes. Este modelo nos permitirá abordar nuestros estudios de una forma sistemática y expandirá la gama de experimentos a desarrollar.

En base a estas consideraciones, el objetivo general de este trabajo consiste en desarrollar un modelo experimental *in vitro* basado en células madre/progenitores tumorales (CMPT) derivadas de muestras quirúrgicas de gliomas de alto grado mediante el cual sea posible, por un lado, realizar trabajos de investigación básica que permitan una mejor comprensión de la biología de estos tumores y, por el otro, contar con herramientas prácticas para evaluar la potencialidad de diferentes estrategias antineoplásicas.

Lo objetivos particulares son:

1. Establecer y caracterizar líneas de CMPT de gliomas de alto grado derivadas de biopsias de diferentes pacientes.
2. Estudiar el comportamiento de distintas líneas de CMPT en condiciones que promueven su diferenciación *in vitro*.
3. Caracterizar el perfil de expresión de los componentes del sistema endotelinérgico y determinar la relevancia de las señales transducidas a través éste en distintas líneas de CMPT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células utilizadas

Para la realización del presente trabajo se utilizaron líneas de CMPT, fibroblastos humanos derivados de prepucio (FH), fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, del inglés, *murine embryonic fibroblast*) y la línea de CMEH, WA09 (H9) adquirida del Insitituto WiCell de la Universidad de Wisconsin. A partir de esta última se generó la línea de progenitores neurales (PN) mediante un protocolo de diferenciación hacia el linaje neural.

Aislamiento de MEF

Ratones hembra preñados (día 12 o 13 de preñez) de la cepa CF1 fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Con el objetivo de obtener los embriones de ratón, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. En cabina de flujo vertical se procedió a limpiar el abdomen con etanol 70 % v/v, se abrió la cavidad peritoneal y se removieron los cuernos uterinos que contienen a los embriones. Los cuernos uterinos fueron colocados en una placa de Petri y lavados 3 veces con PBS (del inglés *phosphate buffered saline*) (NaCl 8 mg, KCl 200 mg, KH₂PO₄ 200 mg y Na₂HPO₄ 1,14 mg, por litro de solución, pH 7,4) con el objetivo de remover la sangre. Posteriormente, se separaron los embriones de las placentas y de sus membranas fetales y una vez libres de desiduas se colocaron en otra placa de Petri, lavando nuevamente 3 veces con PBS. Bajo lupa estereoscópica los embriones fueron decapitados y eviscerados, descartando luego este excedente. El remanente se colocó en una nueva placa de Petri y se lavó 2 veces con PBS. Los cuerpos de los embriones fueron homogeneizados mecánicamente utilizando hojas de bisturí; luego se agregó Tripsina/EDTA (0,25% v/v Tripsina 0,5mg/ml (Invitrogen) en PBS + 0,53 mM EDTA) y se continuó el tratamiento mecánico de los mismos hasta disgregar completamente el tejido. Se agregaron 5 ml de Tripsina/EDTA a la placa y se incubaron los preparados durante 30 minutos a 37° C. Luego se colocaron los embriones procesados en un tubo cónico de 50 ml y se agregaron aproximadamente 30 ml de medio DMEM (del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco) suplementado con aminoácidos no esenciales

(2mM concentración final) (Gibco), 50 U/ml Penicilina/Estreptomina (P/E) (Gibco) y 200 μ M L-Glutamina (Gibco). A este medio suplementado se le agregó además 10% v/v SFB (Gibco). Se dejó decantar la preparación recuperando luego el sobrenadante, el cual contiene a los MEF. El volumen obtenido de sobrenadante se dividió en X botellas de cultivo T75 (X = Número de Embriones Obtenidos/3), completando el volumen de las mismas a 20 ml con DMEM suplementado. Esta siembra de células fue considerada pasaje cero. Se mantuvieron las botellas T75 durante 2 ó 3 días en incubadora a 37° C y atmósfera al 5% CO₂. Luego de que la monocapa de fibroblastos alcanzó un 100% de confluencia se procedió a su amplificación o a su criopreservación.

Cultivo y criopreservación de MEF

Los MEF se cultivaron en medio DMEM con suplementos y con 10% v/v SFB. Para una botella de cultivo T75: se aspiró el medio de cultivo y se realizó un lavado con 5 ml PBS. Se agregó 1 ml de Tripsina/EDTA, y luego de que las células fueron desprendidas completamente de la superficie, se agregaron 4 ml de medio DMEM con 10% v/v SFB para inactivar la acción enzimática de la tripsina. Luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml. Se repitió este paso, lavando las paredes de la botella con 5 ml adicionales de medio y luego se transfirió el medio al tubo cónico en uso. Se centrifugó durante 5 minutos a 200 x g. Luego se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 6 ml de medio. Se transfirieron 2 ml de la suspensión de MEF a cada una de las 3 botellas T75 y se llevó a un volumen final de 10 ml con medio. Se mantuvieron los cultivos celulares 2 ó 3 días en incubadora a 37° C y atmósfera al 5% CO₂. Los pasajes sucesivos se realizaron cuando las células alcanzaron un 100% de confluencia. Para evitar los procesos biológicos asociados a la senescencia replicativa las células no fueron amplificadas por más de 3 pasajes.

Para la criopreservación de los MEF, la suspensión celular obtenida luego de desprender a las células con Tripsina/EDTA como se describió en el párrafo anterior, fue transferida a un tubo cónico con 9 ml de DMEM. Luego se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron

resuspendidas en 1ml de DMEM con suplementos y con 20% v/v SFB y 10% v/v dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich). El medio de criopreservación fue agregado a las células de forma lenta y mezclando suavemente. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo (Corning). Éstos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C , permitiendo un descenso de la temperatura a razón de $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C hasta observarse líquido el medio de criopreservación. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un tubo cónico con 10 ml de DMEM con suplementos y con 20% v/v SFB. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a $200 \times g$, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de DMEM con suplementos y con 20% v/v SFB, sembrándose las células en una botella T25.

Irradiación de MEF

Los MEF irradiados (MEFi) se utilizan como capa nutricia (o *feeder layer* por su denominación en inglés) capaz de mantener a las CMEH en estado indiferenciado. La irradiación de estas células permite inactivarlas mitóticamente sin afectar su viabilidad. Esto es importante para el manejo de los co-cultivos con las CMEH.

Para una botella T75: Se aspiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se agregó 1 ml de Tripsina/EDTA. Las células disociadas fueron transferidas a un tubo cónico con 9 ml de medio DMEM 10% v/v SFB. La suspensión celular se homogeneizó con pipeta para evitar la presencia de agregados celulares. Posteriormente las células fueron irradiadas con 40-80 Gy por el servicio ofrecido por la empresa CEBIRSA S.A. (Centro de Irradiación, Fitz Roy 2455, Ciudad de Buenos Aires, Argentina). La suspensión con MEFi se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 minutos y el pellet celular se resuspendió en DMEM con suplementos y con 10% v/v SFB en un volumen final tal que permita transferir $1,0 \times 10^6$ células/placa de cultivo adherente de 100 mm de diámetro (Corning), previamente tratadas durante

al menos 1 hora con una solución estéril de gelatina bovina (0,1% v/v en PBS) (Sigma). Las placas sembradas fueron colocadas sobre un agitador mecánico durante 5 minutos para lograr una distribución uniforme de las células y luego se colocaron en incubadora a 37° C y 5% CO₂.

Co-Cultivo de CMEH sobre MEFi:

Las CMEH fueron mantenidas en estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa nutricia de MEFi, en un medio de cultivo denominado HES (DMEM/F12 (Gibco) suplementado con 20% *Knock Out Serum Replacement* (KSR) (Gibco) aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), L-glutamina (2mM concentración final), 50 U/ml P/E, β-Mercaptoetanol 55mM (Gibco) y 4ng/ml bFGF (Invitrogen). El medio de cultivo fue renovado aproximadamente cada 24hs.

Los pasajes de las CMEH se realizaron cuando las colonias, observadas al microscopio con un aumento de 100X, alcanzaban aproximadamente el tamaño de un campo. Para ello, las células se lavaron con PBS y luego se incubaron durante aproximadamente 20 minutos con 1ml de una solución 1 mg/ml de Colagenasa Tipo IV (Gibco); al confirmar bajo el microscopio la separación parcial de las colonias de la capa nutricia se inactivó la colagenasa por dilución, agregando 5 ml de medio HES. Para separar totalmente las colonias de su sustrato se utilizó una espátula plástica estéril. Luego se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico de 15 ml. Luego de una centrifugación durante 5 minutos a 200 x g, se eliminó el sobrenadante, se agregó medio HES y se resuspendió suavemente de manera que las colonias se rompieran parcialmente. Este punto es de gran importancia ya que si las colonias resultantes son muy pequeñas, la cantidad de muerte celular resulta muy elevada.

Criopreservación de CMEH

Luego de desprender las colonias de CMEH como se describió en el inciso anterior, las células fueron resuspendidas en medio de criopreservación: HES suplementado con 20% v/v SFB y 10% v/v DMSO cuidando de no disgregar las colonias por exceso de manipulación mecánica. Para descongelarlas se procedió

como en el caso de MEF, resuspendiendo el pellet final en medio HES y transfiriéndose las colonias a una placa de cultivo de 100 mm de diámetro, previamente tratada con gelatina bovina y sembrada con la capa nutricia de MEFi.

Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina

Para corroborar el estado indiferenciado de las CMEH se realizaron ensayos de actividad de la fosfatasa alcalina (FA), la cual disminuye conforme las CMEH se diferencian.

Se utilizó el kit de actividad de la FA (Sigma). En primera instancia se realizó una solución conteniendo Fast Red Violet, Naftol y H₂O, en proporción 2:1:1, que vira a un color rojo violáceo en presencia de FA activa. Se dejó incubar la solución sobre una placa de CMEH durante 15 minutos y al cabo de este tiempo se lavó tres veces con PBS y se procedió a fotografiar los resultados utilizando una cámara digital Nikon.

Diferenciación de CMEH a PN

Las CMEH indiferenciadas cultivadas en co-cultivo con MEFi, fueron tratadas con colagenasa durante 30 minutos. Una vez que se desprendieron las colonias de CMEH, la enzima fue diluida con DMEMF/12, y éstas se dejaron decantar en un tubo cónico. Se descartó el sobrenadante y reemplazó por el medio de cultivo denominado *medio de inducción neural 1*: DMEM/F12 suplementado con 20 % de KSR, amino ácidos no esenciales (2mM concentración final), L-glutamina (2mM concentración final) y 0,1mM β-mercaptoetanol. Al resuspender las colonias en dicho medio de cultivo, éstas fueron disgregadas mecánicamente utilizando una pipeta y luego fueron transferidas a una T25. Los agregados celulares fueron mantenidos en flotación cambiando el 50% del medio de cultivo cada 24 horas. Luego de 4 días, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio de cultivo denominado *medio de inducción neural 2*: DMEM/F12, suplemento N2, amino ácidos no esenciales (2 mM concentración final) y 1ug/ml heparina. Los agregados celulares fueron cultivados en estas condiciones durante 2 días más. Durante el segundo día en flotación, una placa de 6 pocillos fue

tratada paralelamente con 300µl de *medio de inducción neural 2 por pocillo*, suplementado con 20 µg/ml de laminina (Sigma), obtenida a partir de membrana basal del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón. Posteriormente se transfirieron 20-30 agregados a cada pocillo con 300-400ul de *medio de inducción neural 2* y se permitió su adhesión durante 3-4 horas en estufa, para luego completar a 2ml de medio de cultivo por pocillo. Luego de 2 a 3 días de mantenerse adheridas, pudo observarse que algunas células se reorganizaron y adoptaron estructuras de neurorosetas. A los 15 días, dichas estructuras fueron seleccionadas mecánicamente con una espátula y transferidas a una T25 para ser cultivadas en suspensión en el *medio de inducción neural 2* suplementado además con B27 (Invitrogen). Las estructuras formaron esferas al cabo de 1 día en flotación. Las mismas fueron cultivadas cambiando el 50 % del medio cada 2-3 días, durante mínimamente 9 días y como máximo hasta 20 días. Luego se procedió a la disgregación mecánica y enzimática de éstas, utilizando 1:1 de Tripsina/EDTA y *Accutase* (Invitrogen). Por último, las células resultantes fueron transferidas placas de cultivo pre-tratadas con 10ug/ml laminina durante 3 horas a 37°C y mantenidas en el medio de cultivo TSM (ver composición en sección “Derivación de CMPT obtenidas a partir de muestras quirúrgicas”). Luego de algunas semanas fue posible detectar una población celular homogénea con características de PN.

Propagación y criopreservación de PN

Los pasajes fueron realizados cuando el cultivo de los PN presentaba una confluencia cercana al 90%. Para ello, se aspiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células en 500ul de *Accutase* durante unos 2-3 minutos a 37°C. Luego de que las células perdieran completamente la adherencia fueron transferidas a un tubo cónico, centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos y resuspendidas en el medio de cultivo TSM (ver composición en sección Derivación de CMPT obtenidas a partir de muestras quirúrgicas). Por último la suspensión celular se transfirió a placas de cultivo pre-tratadas con laminina. Las células fueron amplificadas en una proporción 1:3 y el tiempo transcurrido entre 2

pasajes fue aproximadamente de 5 días

Para la criopreservación de PN, la suspensión celular de una T25, obtenida luego de desprender a las células con *Accutase*, como se describió en el párrafo anterior, fue transferida a un tubo cónico conteniendo 9 ml de medio de cultivo TSM. Luego se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 2ml de TSM con 10% v/v DMSO. La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo para que luego del descongelamiento el contenido de cada criotubo fuera transferido a una botella de cultivo T25. Los criotubos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80 °C. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37 °C. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un tubo cónico con 10 ml de TSM. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 300 x g, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de TSM, sembrándose las células en una botella T25.

Aislamiento de fibroblastos de prepucio humano

Los cultivos primarios de FH fueron obtenidos de prepucios inmediatamente después de la cirugía. Luego de remover cuidadosamente el tejido adiposo y la fascia, la muestra de piel fue cortada en pedazos de 2 mm aproximadamente y se los colocó en una placa de cultivo de 100mm de diámetro, la cual fue pre-tratada durante una hora a temperatura ambiente con una solución estéril de gelatina bovina 0,1% v/v en PBS. Los explantes fueron cultivados con medio de cultivo DMEM alta glucosa, suplementado con 20% SFB, aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), 50 U/ml P/E y L-Glutamina (2mM concentración final). Éstos se mantuvieron a 37°C con una atmósfera al 5% CO₂ hasta que los fibroblastos provenientes de la dermis alcanzaron un crecimiento exponencial y cubrieron en un 80% la superficie de la placa. Luego, dichos explantes fueron removidos y se procedió a la amplificación y/o criopreservación de los fibroblastos.

Derivación de CMPT obtenidas a partir de muestras quirúrgicas

Este estudio fue realizado siguiendo los principios éticos para las investigaciones en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki (1964) y sus declaraciones consecutivas (29^a Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975; 35^a Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983; 41^a Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989; 48^a Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996; 52^a Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000 Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002 Nota de Clarificación, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004; 59^a Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008; 64^a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013) y aprobado por el Comité de Ética en Investigaciones Biomédicas de FLENI (Fundación para la Lucha contra Enfermedades Neurológicas de la Infancia). En todos los casos se contó con el consentimiento informado del paciente.

Inicialmente las muestras quirúrgicas fueron procesadas mecánicamente utilizando pinzas, tijeras y bisturíes, de modo tal de generar fragmentos de tejido de aproximadamente 1mm³. Éstos fueron incubados a 37°C y 5% CO₂ en presencia de la enzima *Acutase* durante 15 minutos. Luego de este período se diluyó la enzima con PBS, se transfirió toda la muestra a un tubo cónico y se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió en el medio de cultivo denominado TSM. Éste contiene: Neurobasal (Invitrogen), suplementos N2 y B27 (Invitrogen), 20ug/ml insulina bovina (Sigma), 75ug/ml seroalbúmina bovina baja en endotoxinas (Sigma), L-Glutamina (2mM concentración final), 50 U/ml P/E; aminoácidos no esenciales (2mM concentración final), 20ng/ml EGF (Invitrogen) y 20ng/ml bFGF. La suspensión celular y los fragmentos tisulares remanentes fueron transferidos a placas de cultivo pre-tratadas durante al menos 3 horas con laminina, permitiendo de esta forma la adherencia celular.

Propagación y criopreservación de CMPT derivadas de muestras quirúrgicas

Los pasajes fueron realizados cuando los cultivos exhibieron una confluencia del 100%. Para ello, se aspiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS y se incubaron las células en 500ul de *Accutase* durante unos 2-3 minutos a 37°C. Luego de que las células perdieran completamente la adherencia fueron transferidas a un tubo cónico, centrifugadas a 200 x g durante 5 minutos y resuspendidas en TSM. Por último la suspensión celular se transfirió a placas de cultivo pre-tratadas con laminina durante al menos 3 horas. El tiempo transcurrido entre 2 pasajes aproximadamente es cada 7 días (1:2 o 1:3 según la tasa de crecimiento de cada línea celular). El medio de cultivo fue renovado aproximadamente cada 2 o 3 días.

Para la criopreservación de CMPT, la suspensión celular, obtenida luego de desprender a las células con *Accutase* como se describió en el párrafo anterior, fue transferida a un tubo cónico conteniendo 9 ml de medio de cultivo TSM. Luego se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 1ml de TSM con 10% v/v DMSO (Sigma). La suspensión celular fue fraccionada a razón de 1ml por criotubo para que luego del descongelamiento el contenido de cada criotubo sea transferido a una botella de cultivo T25. Los criotubos fueron guardados rápidamente en un contenedor para congelamiento con isopropanol por 24 horas a -80°C. Finalmente se los almacenó en un tanque de nitrógeno líquido. Para su descongelación, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C. Inmediatamente se transfirió el contenido de cada criotubo a un a un tubo cónico con 10 ml de TSM. Se centrifugó la suspensión durante 5 minutos a 200 x g, se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de TSM, sembrándose las células en una botella T25.

Diferenciación de CMPT y de PN

Para inducir la diferenciación de las CMPT derivadas de muestras quirúrgicas y los PN obtenidos a partir de CMEH se realizaron diferentes protocolos de diferenciación, los cuales se describen a continuación:

Diferenciación inducida por la remoción de bFGF y EGF: las células fueron sembradas sobre placas pre-tratadas con laminina durante al menos 3 horas. Al día siguiente se aspiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se agregó el medio de cultivo TSM descrito anteriormente pero sin el agregado de bFGF y de EGF. Además éste fue suplementado con 50ng/ml BDNF (del inglés, *brain derived neurotrophic factor*) (R&D) y 50ng/ml GDNF (del inglés, *glial derived neurotrophic factor*) (R&D). El medio de cultivo fue renovado cada 3 o 4 días y las células fueron analizadas en los tiempos que se indican en la sección de Resultados.

Diferenciación inducida por el agregado de BMP4: las células fueron sembradas sobre placas pre-tratadas con laminina durante al menos 3 horas. Al día siguiente se aspiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se agregó el medio de cultivo TSM descrito anteriormente (con bFGF y EGF, ambos en una concentración de 20ng/ml) suplementado con 10ng/ml BMP4 (R&D). El medio de cultivo fue renovado cada 3 o 4 días y las células fueron analizadas en los tiempos que se indican en la sección de Resultados.

Protocolo de diferenciación astrogliar (inducida por la remoción de bFGF y EGF y por el agregado de BMP4): las células fueron sembradas sobre placas pre-tratadas con laminina durante al menos 3 horas. Al día siguiente se aspiró el medio de cultivo, se realizó un lavado con PBS y se agregó el medio de cultivo TSM descrito anteriormente pero sin el agregado de bFGF y de EGF. Además éste fue suplementado con 10ng/ml BMP4, 50ng/ml BDNF y 50ng/ml GDNF. El medio de cultivo fue renovado cada 3 o 4 días y las células fueron analizadas en los tiempos que se indican en la sección de Resultados.

Protocolo de diferenciación neuronal (inducida por la remoción de bFGF y EGF y la falta de adherencia a sustrato): las células fueron disociadas con *Accutase* como se describió anteriormente. Luego, éstas fueron resuspendidas en el medio de cultivo TSM y mantenidas durante 3 días en flotación (en placas sin pre-tratar con laminina). Posteriormente, el medio de cultivo TSM fue reemplazado por el *medio de inducción neural 2* suplementado con B27. Para este estadio las células individuales forman NE, las cuales fueron mantenidas en estas

condiciones durante 10 días más, cambiando el 50% del volumen del medio de cultivo cada 48 horas. Luego de este período en flotación, las NE fueron adheridas en una placa de cultivo pre-tratada durante al menos 3 horas con 10ug/ml laminina en presencia del medio de cultivo denominado *neuro-diferenciación*, el cual está compuesto por Neurobasal, suplementos N2 y B27, 200ug/ml Ácido Ascórbico, 10ng/ml BDNF, 10ng/ml GDNF, 0,1μM cAMP y 20μg/ml de laminina. Los cambios de medio de cultivo se realizaron cada 48 horas. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 10 días. Las células fueron analizadas en los tiempos que se indican en la sección de Resultados.

Xenotrasplantes ortotópicos en ratones inmunodeficientes

Para realizar los xenotrasplantes se utilizaron ratones desnudos (*nude*) de entre 5 y 8 semanas de edad, obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Las cirugías se realizaron en condiciones de esterilidad en un flujo laminar horizontal del bioterio perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Las CMPT a inyectar se disociaron con la enzima *Accutase* y se resuspendieron en PBS estéril. Se cuantificó la viabilidad celular con Azul Tripán y se procedió a realizar una suspensión de células viables en una concentración de 100.000 células/ul en PBS estéril. Los animales fueron anestesiados utilizando una mezcla 4:1 de 50mg/ml Ketamina (Broower) y 20mg/ml Xilazina (Alfasan), administrando 25ul del anestésico cada 10g de peso del animal. Todo el procedimiento fue realizado bajo el control del personal competente de dicho bioterio.

El procedimiento para realizar la estereotaxia fue adaptado de Cetin A. et. al. *Stereotaxic gene delivery in the rodent brain*. Nature Protocols 2006. Utilizando un marco estereotáxico para pequeños animales, se inocularon 10^5 CMPT en el putámen del hemisferio cerebral derecho del ratón (coordenadas utilizadas: 1mm rostral a Bregma, 2mm lateral y 2,5mm en profundidad). Para la inyección de la suspensión celular (2ul) se utilizó una micro-jeringa Hamilton (10ul) con aguja 30g

conectada a una bomba de inyección, realizando un flujo de inyección controlado de a razón de 1ul/minuto. Una vez realizado el inóculo, con el fin de asegurar el mínimo reflujo posible, se mantuvo la aguja inmóvil en el lugar de la inyección durante 5 minutos. Luego, ésta fue retirada muy lentamente y la herida fue suturada. Los ratones fueron sacrificados luego de 5 meses o cuando evidenciaron signos de enfermedad. Inmediatamente los cerebros fueron fijados con una solución de 4% PFA.

Imágenes moleculares y estructurales pre-clínicas

Las imágenes moleculares y estructurales pre-clínicas fueron adquiridas y analizadas por el Bioingeniero Germán Falasco y el Doctor Leandro Urrutia del Centro de Imágenes Moleculares (CIM) de FLENI.

El análisis de los modelos tumorales *in-vivo* se realizó mediante imágenes de origen molecular en un PET (de inglés: *positrón emission tomography*) pre-clínico para animales pequeños (LABpet 4, GE Healthcare): PET con cristales LYSO y GYSO, 1536 detectores APD, resolución aproximada de 1,2mm (FWHM), 3.7 cm FOV axial, FOV transversal de 11cm. Previo a las adquisiciones se realizaron los controles de calidad que garantizan normalización y cuantificación de los datos. Como radiotrazador se utilizó F18-FDG (18F-fluorodesoxiglucosa), el radiofármaco más utilizado en imágenes PET.

Protocolo de adquisición PET pre-clínico: Se utilizó un protocolo genérico sujeto a optimización en función del radiofármaco utilizado. Protocolo genérico: ayuno previo a la inyección de 6 horas mínimo, inyección de una dosis aproximada de 0.6 mCi de F18-FDG, incorporación en un ambiente controlado en temperatura y luz durante 30 minutos post inyección, adquisición de datos por 20 minutos bajo anestesia (Isoflurano) salvando la información en modo lista. La reconstrucción de las imágenes se realizó mediante el método iterativo OSEM (entre 30 y 50 iteraciones).

Las imágenes de información estructural fueron adquiridas en un equipo de resonancia magnética nuclear (RMN) 3Teslas clínico (Signa HDx; GE Healthcare, Milwaukee) para la adquisición de todas las secuencias de resonancia se utilizó

una bobina de muñeca. Protocolos de adquisición de RMN: Secuencias anatómicas convencionales cerebro: Sagital T1, Difusión (EPI-SE con gradientes de difusión), Axial T1 y T2 Flair, Axial T2 Propeller, Axial T2 GRE o Hacker.

Co-registro y fusión: Las imágenes de origen molecular (PET) se co-registraron al dominio espacial de las imágenes estructurales (RMN) ya que las imágenes moleculares carecen de información espacial.

Tinciones e inmunohistoquímica de muestras tumorales

Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra Naomi Arakaki y Marcelo Schultz en el Departamento de Neuropatología de FLENI, dirigido por el Doctor Gustavo Sevlever.

Las muestras provenientes de tumores de pacientes y de tumores obtenidos luego de los xenotrasplantes en ratones inmunodeficientes fueron fijadas en formol zinc e incluidas en parafina según los métodos convencionales. Sobre los tacos de parafina se realizaron cortes de 3 micrones (μ) y éstos fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina.

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizaron a partir de cortes de los tacos de parafina de 4 μ , siendo luego marcados con anticuerpos específicos para GFAP (1/200 DAKO), Ki67 (1/200 Novocastra-LEICA) y Nestina (1/200 Chemicon). El revelado se realizó utilizando el sistema de detección *ABC complex* (Vector laboratorios).

Los tumores fueron clasificados según los criterios de la OMS (*2007 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System*).

Extracción de ADN genómico

Se realizó una extracción de ADN genómico, utilizando el kit *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega). Las células a controlar fueron cosechadas removiendo el medio de cultivo, agregando 500ul de PBS y levantándolas de la placa con una espátula plástica. Las muestras fueron transferidas luego a un tubo de 1,5 ml. Se centrifugó a 14000 x *g* durante 10 segundos y se realizó un lavado con PBS. Finalmente las células fueron resuspendidas en 600 μ l de Solución de

Lisis Nuclear, mezclando con pipeta automática. Luego se agregaron 3 µl de Solución ARNasa al lisado y se mezcló nuevamente con pipeta automática. Se incubó a 37°C durante 30 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación se agregaron 200 µl de Solución de Precipitación de Proteínas, mezclando en vórtex. Se dejó enfriar en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 14000 x g durante 4 minutos. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo conteniendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante, agregando luego 600 µl de etanol 70% v/v a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14000 x g durante 1 minuto. Se removió el sobrenadante y se dejó secar el pellet al aire a temperatura ambiente por 30 minutos. Al cabo de este tiempo se rehidrató el ADN en 100 µl de Solución de Rehidratación de ADN, incubando 1 hora a 65°C.

Detección de Micoplasma

Semanalmente se controló que todas las líneas celulares y cultivos primarios utilizados se encuentren libres de *Mycoplasma* sp. Para ello se realizó una extracción de ADN genómico de las células a analizar, seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos (*primers*) que hibridan con secuencias presentes en el genoma de distintas especies del género *Mycoplasma* (*Mycoplasma hominis*; *Mycoplasma orale*; *Mycoplasma salivarium* y *Mycoplasma pneumoniae*).

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. Se colocaron los siguientes componentes por tubo de PCR: 2,5 µl de Buffer de PCR (Tris-HCl 200mM [pH 8.4], KCl 500mM), 1 µl de MgCl₂ 50mM, 0,5 µl de una mezcla de los 4 deoxi-nucleótidos trifosfato (dNTPs) 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen), 2,5 µl de oligonucleótido sentido (*primer forward*) 20µM, 2.5 µl de oligonucleótido anti-sentido (*primer reverse*) 20µM, 0,2 µl de la ADN polimerasa *PlatinumTaq DNA Polimerasa* 5U/µl (Invitrogen) y 2 µl de ADN genómico, y completando el volumen a 25 µl con agua libre de DNasas. Los *primers* degenerados para la detección de Micoplasma se detallan a continuación:

- **Sentido** (5' → 3'): ACACCATGGGAGYTGGTAAT
- **Anti-sentido** (5' → 3'): CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT

El programa de PCR utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 94°C
 2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
 3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
 4. Extensión: 40 segundos a 72 °C
 5. Extensión Final: 5 minutos a 72 °C
- Los pasos 2 a 4 se realizaron 35 ciclos

Al finalizar las reacciones de PCR, los productos de la amplificación fueron visualizados luego de una corrida electroforética en gel de agarosa 1,5% m/v en buffer TAE 1X (Tris-acético 0,04 M, EDTA 1mM) a 100V por 35 minutos. Cada muestra contenía 18 µl del producto de la reacción de PCR y 2 µl de buffer de carga 10X Orange G (para 50 ml: 30% v/v glicerol, 100 µM EDTA, 10% v/v SDS y 2mg/ml Orange G). El gel fue teñido en una solución 0,5µg/ml de Bromuro de Etidio durante 30 minutos en oscuridad, visualizado y fotografiado en un transiluminador con luz UV *Fotodyne* Modelo 602107CE acoplado a PC, controlado por software *Foto/Analyst PC Image v5.00*, buscando la presencia o ausencia de bandas correspondientes a genes de *Mycoplasma* sp en las muestras analizadas. En el gel se sembraron además los productos de amplificación de las muestras de ADN provistas por el Kit (controles positivos).

Determinación de alteraciones genéticas

Estas determinaciones fueron realizadas por el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Neuropatología de FLENI, dirigido por el Doctor Horacio Martinetto.

Las diferentes alteraciones genéticas fueron detectadas según métodos ya descriptos (Ferrer-Luna R. 2009; Ferrer-Luna R. 2011).

Brevemente, las pérdidas de heterocigosidad se realizaron siguiendo un protocolo (Nigro J. 2001) que permite cuantificar microsatélites; se utilizó una

sonda Taqman que reconoce la secuencia repetitiva de los microsatélites y diferentes pares de oligonucleótidos para amplificar cada marcador en reacciones de PCR en tiempo real. Los marcadores analizados fueron D1S468, D1S214 y D1S2736 para determinar delección de 1p, D19S867, D19S596 y D19S408 para 19q. Para detectar delección de 10q se estudiaron los marcadores D10S536 y D10S1683. La amplificación del gen EGFR y la delección del gen CDKN2A se estudiaron mediante reacciones PCR multiplex en tiempo real usando sondas Taqman y pares de *primers* específicos para ambos genes y para el gen GAPDH (del inglés, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) que se usó como referencia alélica normal (Berggren P. 2003). Para detectar mutaciones en TP53, se llevó a cabo el método de PCR-SSCP (del inglés, *single strand conformation polymorphism-polymerase chain reaction*) y en caso de haber conformaciones anómalas la mutación se confirmó por secuenciación directa (Macrogen Co, Corea del Sur). Las mutaciones en IDH1 e IDH2 se analizaron por secuenciación directa mientras que el estado de metilación del promotor del gen MGMT se estudió por el método MS-PCR (del inglés, *Methylation specific polymerase chain reaction*) (Palmisano W. 2000).

Preparación de ARN total

Para preparar ARN total se partió de células crecidas hasta confluencia, a excepción de los fibroblastos humanos derivados de prepucio, los cuales fueron cultivadas siempre sub-confluentes para evitar la salida del ciclo celular. La extracción del ARN se llevó a cabo utilizando el reactivo *Trizol* (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, las células fueron colectadas en *Trizol*, y luego de extraer con cloroformo (Merck), se precipitó el ARN con isopropanol (Merck), se lavó con etanol 75% y se resuspendió en agua deionizada libre de ribonucleasas. La concentración del ARN aislado (ng de ARN/ μ l de solución) se determinó utilizando un espectrofotómetro automático NanoDrop 1000 controlado por el software ND-1000. Se verificó también que la relación OD_{260}/OD_{280} fuese de entre 1,7 y 2 para asegurar una elevada pureza del ARN total obtenido.

Retrotranscripción

Para efectuar la transcripción reversa se utilizaron 500ng de ARN total, 10 ng/ml de oligonucleótidos al azar (*random primers*) (Invitrogen), dNTPs 1mM y 200U de la transcriptasa reversa MMLV (Promega). Se siguió el protocolo indicado por el fabricante de dicha enzima. Brevemente, se llevó el ARN de las distintas muestras a 10 µl finales con agua deionizada libre de ARNasas y se desnaturalizó por calentamiento a 65°C durante 5 minutos en termocicladora. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y se las incubó durante al menos un minuto. Finalmente, en cada tubo se agregaron 10 µl de la mezcla conteniendo el resto de los reactivos mencionados anteriormente y se llevó a cabo la reacción utilizando el siguiente programa en termocicladora: 60 minutos a 37°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70 °C con el fin de inactivar a la enzima. Finalmente, las muestras fueron diluidas 1/5 utilizando agua deionizada libre de ARNasas y almacenadas a -20 °C hasta su utilización en RT-PCR en tiempo real.

RT-PCR en tiempo real

Los pares de oligonucleótidos específicos (*primers*) utilizados en este trabajo fueron diseñados con el programa *Beacon Designer (Premier Biosoft internacional)*, definiendo como T_m para los mismos una temperatura de 60° C. Para evitar la amplificación espuria de posible ADN geonómico contaminante en las muestras, los *primers* fueron diseñados de manera tal que cada miembro del par sentido y anti-sentido hibridara en un exón diferente del gen blanco correspondiente. En los casos en los que esto no fue posible, luego de la extracción de ARN se incluyó un paso de digestión de ADN, incubando las muestras con ADNasa 1 durante 30 minutos a 37°C. Los *primers* fueron sintetizados por el servicio de la empresa *Invitrogen* en una escala de síntesis 25N. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se indican en la tabla 1.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20µl. Se colocaron los siguientes reactivos por tubo de PCR: 10µl de *SYBR-Green master mix*

(Invitrogen); 0,4µl de ROX (Invitrogen); 3,6µl de *primer* sentido (5µM); 3,6µl de *primer* anti-sentido (5µM); 0.4µl de H₂O y 2µl de ADNc. Se utilizó el termociclador *Step One Plus (Applied Biosystems)*. Cada muestra a analizar fue determinada por triplicado. En todos los casos el programa utilizado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 10 minutos a 94°C
 2. Apareamiento y extensión: 30 segundos a 60 °C
 3. Desnaturalización: 40 segundos a 94 °C
- Se realizaron 40 ciclos de los pasos 2-4. La lectura de la fluorescencia fue realizada al finalizar el paso 2 de cada ciclo.
 - Para cada uno de los ADNc analizados se realizaron curvas de temperatura de apareamiento para verificar la presencia de un único producto de amplificación. Esto fue confirmado al sembrar los productos de la reacción en geles de agarosa (2%) teñidos con bromuro de etidio, evidenciando una única banda.

Para el análisis de los datos se utilizó el método del $\Delta\Delta C_t$ (Livak K. 2001).

BLANCO	SENTIDO (5' → 3')	ANTI-SENTIDO (5' → 3')
BMI-1	AGCAGAAATGCATCGAACAA	ATCAACCAGAAGAAGTTGCTGA
BMP2	GGAGAAGGAGGAGGCAAAG	CCGCAGTCCGTCTAAGAAG
BMP4	TAGCAAGAGTGCCGTCATTCC	GCGCTCAGGATACTCAAGACC
BMPR1A	AGATGACCAGGGAGAAACCAC	CAACATTCTATTGTCCGGCGTA
BMPR1B	GGAGCAGTGATGAGTGTCTAAGG	TGCCCACAAACAGAAGAGTACC
BMPR2	TTCTTTGCCCTCCTGATTCTTGG	CACATAGCCGTTCTTGATTCTGC
CD44	CTGCCGCTTTGCAGGTGTA	CATTGTGGGCAAGGTGCTATT
CD133	ACAACACTACCAAGGACAAGG	GGACTTAATCTCATCAAGAACAGG
CHI3L	ACACCTGGATTTCATTAGCAT	CCACAGCATAGTCAGTGTT
DCX	TCCCGGATGAATGGGTTGC	GCGTACACAATCCCCTTGAAGTA
ECE	CTAATGGAGTTGATTGAGAG	ACATAGACAGAGAAGAAGG
EDN1	GGAACACCTAAGACAAACC	GGCTATGGCTTCAGACAG
EDN2	AAGGAGTGCGTCTACTTCTGC	GGCGTCTTGGCGGGTTTC
EDN3	CTGTGAGTGTGGAGATGTTATC	CTCTGTGACTGGGTTGGG
EGFR	CAAGTGTAAGAAGTGCGAAGG	GAGGAGGAGTATGTGTGAAGG
ETRA	GAGCAGCCATAAGGACAG	GGAGTGAATTAAGGAAGAAGG

ETRB	CGAAACGGTCCCAATATC	TCAATACTCAGAGCACATAG
GAPDH	ACAGCCTCAAGATCATCAG	GAGTCCTTCCACGATACC
GFAP	AGGAAGATTGAGTCGCTGGAG	CGGTGAGGTCTGGCTTGG
GLI2	CTGCCTCCGAGAAGCAAGAAG	GCATGGAATGGTGGCAAGAG
GUSB	TCCAATACCTGACTGACACC	AGTCCAGCGTAGTTGAAAAAG
JAG1	GCAGAAGTAAGAGTTCAGAGG	GCAGGCACCAGTAGAAGG
MAP2	CAGGAGACAGAGATGAGAATTCCTT	GTAGTGGGTGTTGAGGTACCACTCTT
MGMT	AATGCCTATTTCCACCAG	AATTTACAACCTTCAGC
NEFL	CCGTGGAGATGGACGTGAC	AACCATTCTCAGCGTTCTGC
Nestina	CAGCTGGCGCACCTCAAGATG	AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG
NFIA	ATCCGACCCGAATATCGAGAG	AGTCAATTCTTCGCATCTTGCC
Noggin	GCCAGCACTATCTCCACATC	CAGCAGCGTCTCGTTCAG
Oct4	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	CACAGAACTCATACGGCGGG
Olig2	GCTCCTCAAATCGCATCCA	AGATAGTCGTCCGAGCTTT
PDGFRA	TTGAAGGCAGGCACATTTACA	GCGACAAGGTATAATGGCAGAAT
RPL7	AAGATCAAGCGCCTGAGAAAG	TGCAGGTACATAGAAGTTGCCA
SLC12A5	AGGAAAGCAGTCCCTTCATCA	GCCTCTTCATGCTCCCTACTT
SOX2	AATCCCATCCCACTCAC	ATCTATAAAGGTCCATTCC
SYT1	AAAGTCCACCGAAAAACCCTT	CCACCCAATTCCGAGTATGGT
Tuj-1	TGGATTCGGTCTGGATGTG	ACCTTGCTGATGAGCAACGT
VEGF	CATCTTCAAGCCATCCTGTGTG	CCGCATAATCTGCATGGTGAT

Tabla 1: secuencias de *primers* utilizadas en este trabajo.

Inmunomarcaciones y microscopía de fluorescencia

Para las inmunomarcaciones las células fueron transferidas un día antes a portaobjetos *Lab-Tek* de 8 pocillos (Nunc). Luego de la remoción del medio de cultivo y de un lavado con PBS, las células fueron fijadas con una solución 4% m/v de paraformaldehído (PFA) (Sigma) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. A posteriori, se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con albúmina sérica bovina (ASB) 0,1% v/v (Gibco) en PBS. La permeabilización y el bloqueo se realizó con una solución compuesta por 0,1% v/v Triton X-100 (Sigma); 0,1% v/v ASB; 10% v/v Suero de Cabra Normal (SCN) (Gibco) en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego de remover la solución de permeabilización y bloqueo se realizaron 3 lavados durante 5 minutos cada uno,

con 0,1% v/v ASB en PBS. Las inmunomarcaciones se realizaron incubando las células con el o los anticuerpos primarios específicos en una solución de dilución de anticuerpos compuesta por: 0,1% v/v ASB, 10% v/v SCN en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente en agitador mecánico o durante una noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, 0,1% v/v ASB. Posteriormente se realizó una incubación de 2 horas en agitación de los preparados con el o los anticuerpos secundarios conjugados a los fluoróforos, en una dilución 1:400 (en la misma solución de dilución empleada para los anticuerpos primarios). Para la tinción de los núcleos se utilizó el 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI) (Sigma) en una concentración final de 200ng/ml, el cual fue agregado simultáneamente con los anticuerpos secundarios. Se realizaron nuevamente 3 lavados durante 5 minutos cada uno, con 0,1% v/v ASB en PBS y finalmente se agregó un volumen apropiado de PBS. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se detallan en las tablas 2 y 3 respectivamente.

Anticuerpo	Especie-Tipo	Empresa	N°Catálogo	Dilución
α-CD44	Ratón-Monoclonal	Abcam	AB19657	1:100
α-GFAP	Conejo-Policlonal	Millipore	AB5804	1:500
α-Ki67	Ratón-Monoclonal	Novocastra	NCL-LKi67-MM1	1:100
α-MAP2	Ratón-Monoclonal	Sigma	M1406	1:500
α-MAP5	Ratón-Monoclonal	Sigma	M4528	1:500
α-Nanog	Conejo- Monoclonal	Cell Signaling	4903	1:100
α-Nestina	Conejo- Policlonal	Chemicon	AB5922	1:200
α-Oct4	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-5279	1:500
α-Olig2	Conejo-Policlonal	Millipore	AB9610	1:200
α-Sox2	Conejo-Policlonal	Abcam	AB59776	1:200
α-SSEA-4	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21704	1:200
α-TRA-1-60	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21705	1:200
α-TRA-1-81 (80)	Raton-Monoclonal	Santa Cruz	SC-21706	1:200
α-Tuj1	Raton-Monoclonal	Covance	MMS-435P	1:500
α-Vimentina	Raton-Monoclonal	Dako	M0725	1:200

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en las inmunomarcaciones

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo	Empresa	N°Catálogo	Dilución
α-IgG de ratón	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 568	Invitrogen	A-11031	1:400
α-IgG de conejo	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-11008	1:400
α-IgG de ratón	Pollo-Policlonal	Alexa Fluor 488	Invitrogen	A-21200	1:400
α-IgG de conejo	Cabra-Policlonal	Alexa Fluor 555	Invitrogen	A-21429	1:400

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en las inmunomarcaciones

El análisis de las imágenes se realizó observando los preparados en un microscopio invertido de fluorescencia con lámpara de mercurio (*Nikon Eclipse TE2000-S*), fotografiando los resultados observados. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital *Nikon DXN1200F* acoplada al microscopio y controlada por el software *EclipseNet versión 1.20.0 Build 61*.

Citometría de flujo

Inmunomarcación de CD133: las células fueron disgregadas utilizando la enzima *Accutase*, transferidas a tubos de hemólisis (aproximadamente 1×10^6 células por tubo) y centrifugadas a 200 x g durante 5 minutos. Éstas fueron luego resuspendidas en 80ul de una solución compuesta por PBS; 0,5% ASB y 2mM EDTA. La inmunomarcación fue realizada agregando 10ul del anticuerpo anti-CD133 conjugado a ficoeritrina (PE) (Miltenyi Biotec, número de catálogo: 130-080-801) por tubo. Para el control negativo se agregaron 10ul de inmunoglobulinas de ratón acopladas a PE (R&D) en la muestra correspondiente. Todas las muestras fueron incubadas a 4°C durante 10 minutos en oscuridad. Luego se realizó un lavado agregando 2ml de PBS en cada tubo, centrifugando a 200 x g, aspirando completamente el sobrenadante y resuspendiendo las células en 500ul de PBS. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACS Aria II (Becton Dickinson) y los resultados fueron analizados con el *software* WinMDI 2.9.

Determinación de apoptosis (fragmentación del ADN)

Se utilizó el kit de detección de muerte celular *Cell Death Detection ELISA^{Plus}* (Roche Mannheim, Alemania). Este ensayo colorimétrico de ELISA (del inglés, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) permite detectar de manera

cuantitativa los mono u oligonucleosomas (fragmentos de ADN-histonas) liberados al citoplasma durante el proceso apoptótico. El ensayo utiliza dos anticuerpos monoclonales dirigidos: uno contra el ADN (conjugado con peroxidasa) y otro contra las histonas (conjugado con biotina). El anticuerpo anti-histona-biotina se une a las histonas de los nucleosomas y captura simultáneamente el inmunocomplejo al pocillo de la microplaca que está revestido de estreptavidina, la cual es reconocida por la biotina. Adicionalmente, el anticuerpo anti-ADN-peroxidasa reacciona con el ADN de los nucleosomas. Por último, la reacción es revelada usando ácido benzotiazolidina como sustrato de la peroxidasa.

En placas de cultivo de 96 pocillos se sembraron 3×10^4 células por pocillo en 100ul de medio de cultivo. Las células fueron tratadas según se indica en la sección de Resultados. Una vez finalizados los tratamientos, éstas fueron sometidas a una lisis suave que mantiene la integridad de los núcleos. Luego los lisados fueron centrifugados en la misma placa de cultivo (200 x g, 5 min). El sobrenadante, conteniendo la fracción citoplasmática, fue transferido a los pocillos tratados con estreptavidina y en éstos se realizó la incubación con los anticuerpos correspondientes. Para el revelado se lavó el exceso de anticuerpos y en cada pocillo se agregaron 100ul de la solución de ABTS. Luego se realizó una incubación en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos. Inmediatamente en cada pocillo se agregaron 100ul de una solución que detiene la reacción. Finalmente, el producto coloreado obtenido fue cuantificado en un lector de microplacas (BioRad-Benchmark) a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados se expresan como porcentajes de oligómeros de ADN, calculados a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control correspondiente multiplicado por 100. Los experimentos fueron realizados 3 veces por triplicado.

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada midiendo los cambios colorimétricos en el ensayo de 2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT). Este ensayo se basa en la actividad mitocondrial que exhiben las células

viabiles mediante la cual se produce la reducci3n de la sal de tetrazolio XTT de color amarillo, a una tinci3n de formaz3n, de color naranja. Las c3lulas se sembraron (2×10^5 c3lulas/pocillo) en placas de 48 pocillos conteniendo 200 μ l de medio de cultivo. Transcurridos los tratamientos se procedi3 a la determinaci3n de la viabilidad. Para ello, en condiciones de esterilidad, se reemplaz3 el medio de cultivo por 50 μ g/pocillo de XTT (Sigma) disuelto en PBS conteniendo 0,3 μ g/pocillo del catalizador N-metildibenzopirazina metil-sulfato (PMS) en un volumen final de 100 μ l, e incubando las c3lulas durante 2-4 horas a 37°C y 5% de CO₂. La actividad metab3lica fue determinada midiendo la absorbancia de las muestras con un lector de microplacas BioRad-Benchmark a una longitud de onda de 450nm y substrayendo la absorbancia a 650nm. Los resultados se expresan como porcentaje de viabilidad celular, calculado a partir del cociente entre la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control correspondiente multiplicado por 100. Los experimentos fueron realizados 3 veces por quintuplicado.

An3lisis estad3stico

Las significancias de las diferencias observadas fueron analizadas mediante an3lisis estad3stico (*test t de Student*), utilizando el software GraphPad PRISM versi3n 6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

PARTE 1: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CMPT DEL SISTEMA NERVIOSO

Establecimiento y propagación de CMPT del sistema nervioso derivadas de muestras quirúrgicas de pacientes

Inicialmente, con el fin de contar con un sistema experimental que nos permitiera estudiar la biología de los gliomas de alto grado, en nuestro laboratorio intentamos obtener líneas celulares de CMPT en suspensión siguiendo el protocolo clásico de cultivo en NE (Reynolds B. 1992; Singh S. 2003; Singh S. 2004). En concordancia con las dificultades inherentes al cultivo de NE derivadas de gliomas descritas por distintos investigadores (por ejemplo: elevado grado de apoptosis y diferenciación espontánea) (Reynolds B. 2005; Pollard S. 2009), si bien logramos con éxito generar NE viables, no fuimos capaces de propagarlas durante más de unos pocos pasajes.

Por estas razones, el protocolo empleado en el presente trabajo para derivar y expandir CMPT a partir de biopsias de gliomas corresponde al descrito por Peter Dirks y colaboradores (Pollard S. 2009). En esta publicación se describe en detalle un método similar al clásico protocolo de formación de NE en el que se agrega un pre-tratamiento de las placas de cultivo con laminina como sustrato, permitiendo de esta forma el cultivo y expansión de las CMPT en adherencia. De manera similar a lo reportado en dicho trabajo, en nuestro laboratorio se obtuvo una mayor eficiencia tanto en el establecimiento como en la propagación de las líneas de CMPT cuando éstas fueron cultivadas en adherencia.

Para la expansión y la propagación de los cultivos celulares se utilizó un medio libre de suero y de composición definida que hemos denominado TSM (del inglés, *tumor stem cell media*), el cual ha sido descrito en detalle en la sección de Materiales y Métodos. Los pasajes se realizaron aproximadamente cada 7-10 días (1:2 o 1:3 según la tasa de crecimiento de cada línea celular). En el panel superior de la figura 10 se muestran fotomicrografías de 3 cultivos luego de 24 horas de su derivación a partir de las biopsias correspondientes. Estos cultivos tienen un aspecto heterogéneo en los cuales es posible observar cúmulos celulares, células

diferenciadas y un elevado grado de muerte celular. Luego de 2 o 3 pasajes los cultivos muestran un crecimiento estable y un aspecto homogéneo (Figura 10, panel inferior). En la figura 11 se pueden observar NE cultivadas en suspensión y transferidas luego a placas de Petri tratadas con laminina. Hemos comprobado que la totalidad de las líneas celulares aisladas pueden ser cultivadas tanto en suspensión como en adherencia de manera reversible, según se utilice o no laminina como sustrato.

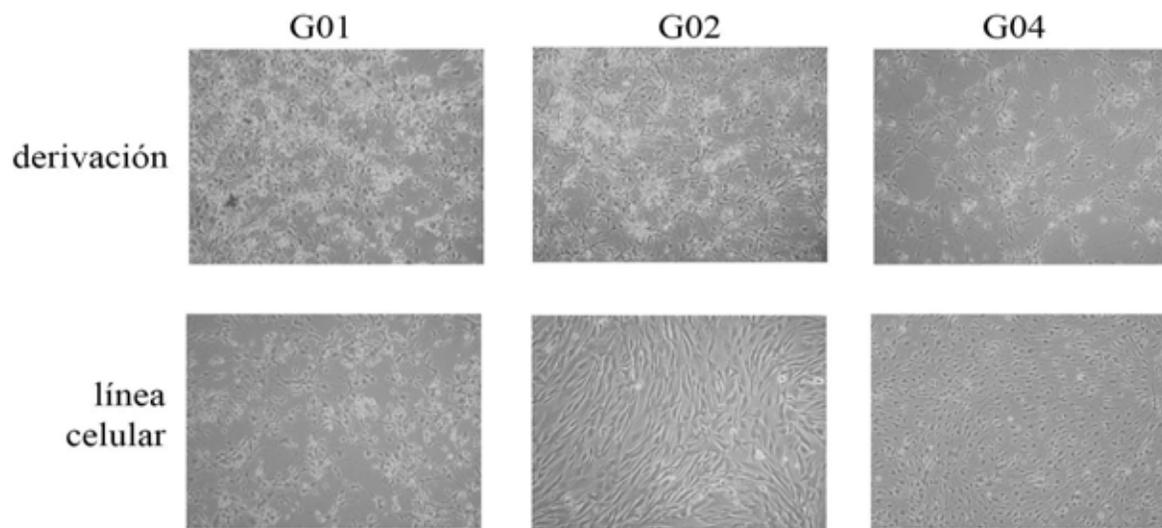


Figura 10. Panel superior: Fotomicrografías de cultivos en adherencia luego de 24hs de ser derivados a partir de biopsias quirúrgicas (magnificación 100x). **Panel inferior:** Fotomicrografías de los mismos cultivos luego de su propagación *in vitro* (2-3 pasajes). G01, G02 y G04 son las designaciones de las líneas celulares correspondientes (magnificación 100x).

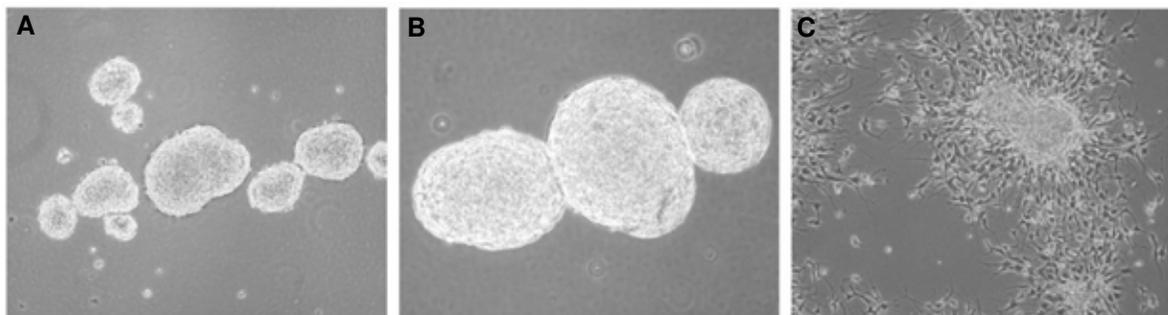


Figura 11. A y B: Fotomicrografías de NE en suspensión obtenidas a partir de una muestra quirúrgica de un glioma de alto grado (magnificación 100x y 200x respectivamente). **C:** Fotomicrografía de una NE 24 horas después de ser adherida en una placa tratada con laminina (magnificación 100x).

De esta manera, en este trabajo hemos logrado establecer y criopreservar con éxito 9 líneas celulares derivadas de biopsias de gliomas de alto grado (Tabla 4). Éstas mostraron un crecimiento estable (durante más de 12 pasajes en todos los casos) y como se indica más adelante, todas ellas se caracterizaron por exhibir un fenotipo indiferenciado. Sin embargo, también existieron casos en donde no logramos generar líneas celulares con capacidad de auto-renovación. Por ejemplo, las células derivadas de tumores de grado III, al menos en estas condiciones experimentales, no fueron capaces de proliferar por largos períodos (Figura 12 A). En otras oportunidades, luego de propagar cultivos derivados de GBM (grado IV) durante 3 o 4 pasajes, pudimos observar un elevado porcentaje de células diferenciadas y una marcada disminución de la tasa de proliferación (Figura 12 B, C y D). En todos estos casos es posible que las muestras quirúrgicas utilizadas no hayan contenido el número suficiente de CMPT necesario para el establecimiento de líneas celulares. Alternativamente, las células derivadas pudieron no ser capaces de mantener su auto-renovación debido a la falta de señales propias del nicho tumoral. Se ha reportado que la delección del gen PTEN resulta crucial para la derivación de líneas de CMT (Chen R. 2010). Como se describe más adelante, todas las líneas obtenidas exitosamente en este trabajo presentaron delección del fragmento cromosómico que contiene a dicho gen.

Código del tumor	Diagnóstico del tumor de origen	Localización del tumor	Sexo del paciente	Edad del paciente	Línea celular
21028	GMA	Frontal	Masculino	26	G01
21489	GBM	Parietal	Femenino	61	G02
21501	GBM	Temporal	Masculino	52	G03
21821	GBM	Frontal	Masculino	60	G04
22547	GBM	Temporal	Masculino	52	G05
22776	GS	Temporal	Masculino	56	G06
22877	GBM	Temporal	Femenino	72	G07
23034	GBM	Occipital	Femenino	62	G08
24114	GMA	Fronto-temporal	Femenino	59	G09

Tabla 4. Características relacionadas a los tumores de origen y designación de las líneas de CMPT correspondientes.

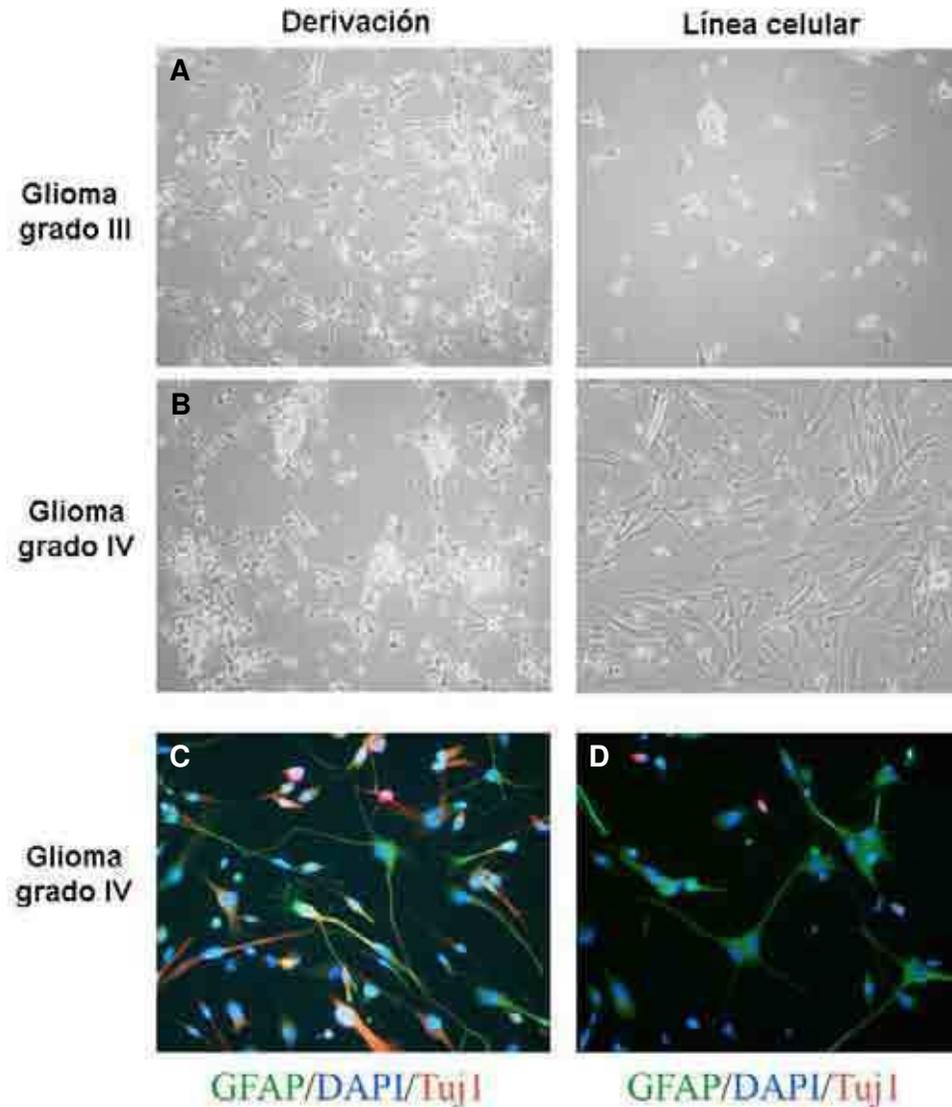


Figura 12. Panel superior: Fotomicrografías de cultivos en adherencia derivados de gliomas de grado III (A) o IV (B) obtenidas 24hs luego de su derivación a partir de las biopsias correspondientes (panel izquierdo) y de los mismos cultivos luego de ser propagados *in vitro* durante 3 o 4 pasajes (panel derecho) (magnificación 100x). **Panel inferior:** Inmunomarcaciones del marcador de linaje astrogliar GFAP y del marcador de linaje neuronal Tuj1 en células derivadas de dos tumores diferentes, propagadas *in vitro* durante 3 o 4 pasajes (C y D) (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Es importante mencionar que si bien todas las líneas celulares derivadas con éxito se obtuvieron a partir de gliomas de alto grado, cada una de ellas exhibió una morfología celular característica (Figura 13). Esta observación ya ha sido documentada (Pollard S. 2009) y podría guardar relación con el origen celular de

cada tumor. De este modo, el aislamiento y caracterización de CMPT permite establecer diferencias entre muestras tumorales que resultan similares desde un punto de vista histopatológico y clínico.

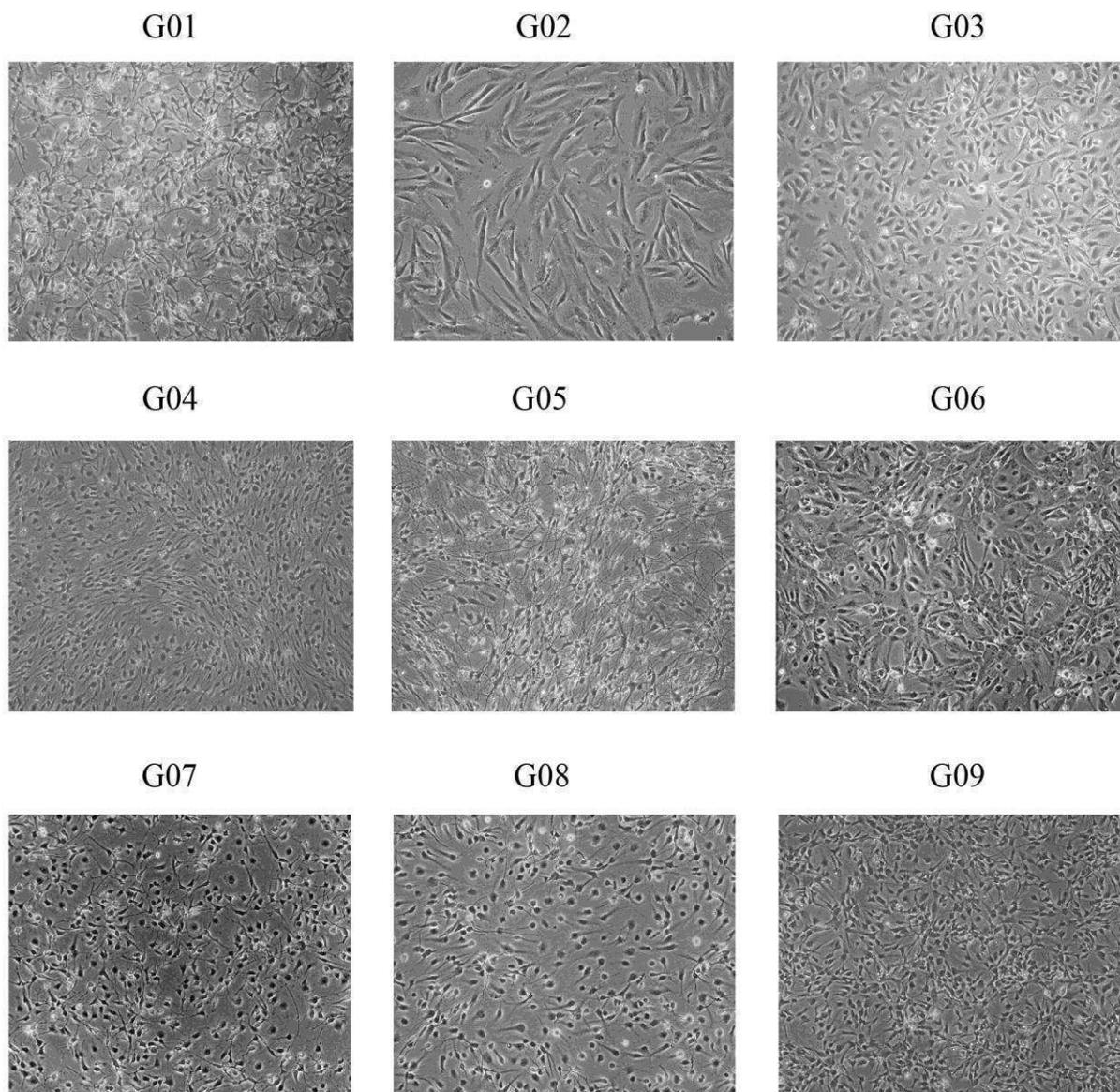


Figura 13: Fotomicrografías de cultivos de CMPT luego de su propagación *in vitro* durante 2 o 3 pasajes (magnificación: 100x).

Por último, es importante considerar que el desarrollo de este modelo ofrece la posibilidad de generar un banco de células derivadas de gliomas de alto grado, en donde cada línea celular podrá estar asociada a la historia clínica del paciente correspondiente. Teniendo en cuenta que el establecimiento de una línea celular puede lograrse en el término de un mes, potencialmente esto podría permitir el desarrollo de protocolos terapéuticos más apropiados basados en el concepto emergente de medicina personalizada (Rahman M. 2012)

Obtención de PN normales a partir de la diferenciación de CMEH

En nuestro laboratorio también se desarrollan trabajos de investigación en CMEH. Estas células se caracterizan por sus propiedades de auto-renovación y pluripotencia, siendo capaces de dar origen a todos los tipos celulares de las tres capas germinales. Mediante la aplicación de protocolos dirigidos, las CMEH tienen la capacidad de dar origen a tipos celulares específicos (Hochedlinger K. 2006). En particular, la generación de células del linaje neural a partir de CMEH ha demostrado recapitular muchos de los procesos que ocurren *in vivo* durante el desarrollo neural (Zhang X. 2010).

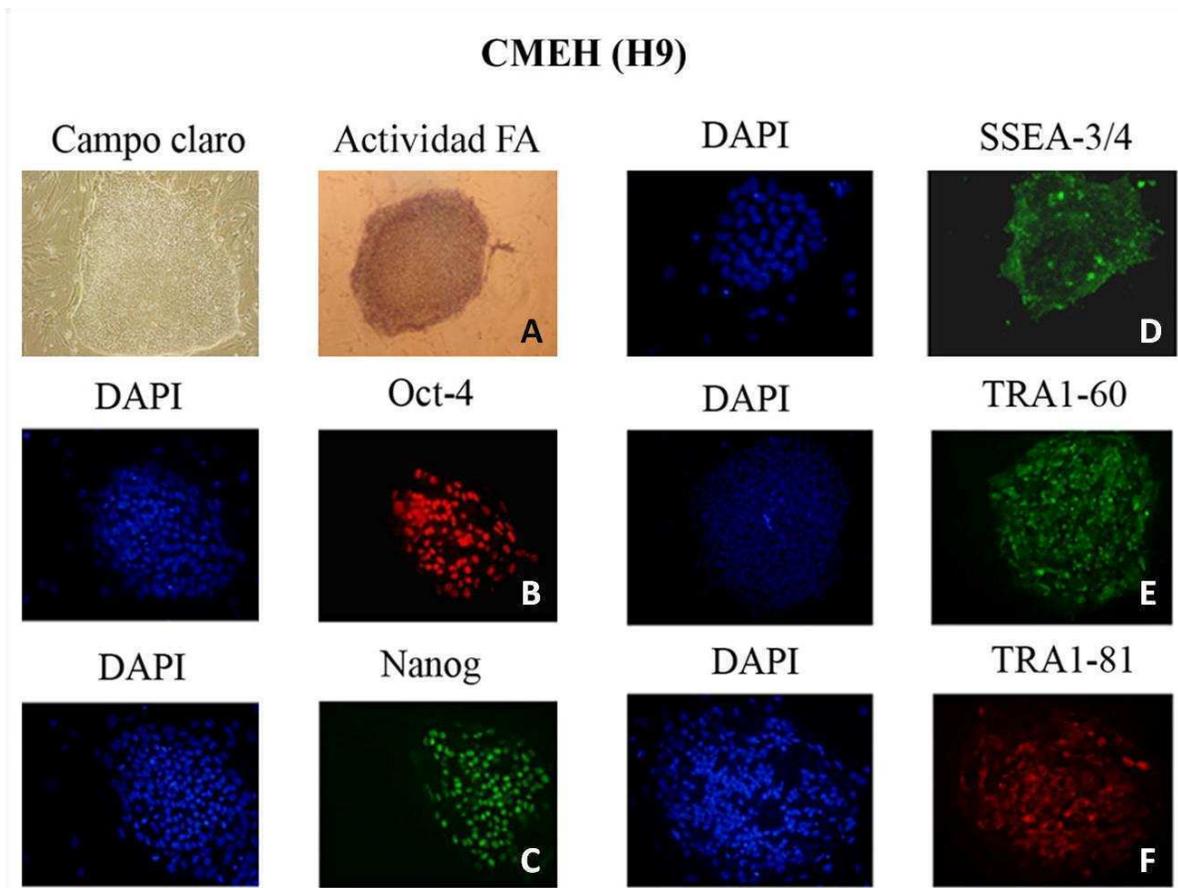


Figura 14: Validación de la naturaleza pluripotente de la línea de CMEH, H9. **A:** Morfología de una colonia crecida sobre capa nutricia de MEF y tinción de la actividad de fosfatasa alcalina (**FA**) (magnificación 200x). **B, C, D, E y F:** Inmunomarcaciones de los marcadores de pluripotencia: Oct-4, Nanog, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-80 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Con la intención de contar con líneas celulares normales, fenotípicamente similares a las líneas tumorales, se llevó a cabo un protocolo de diferenciación neural mediante el cual fue posible generar PN a partir de CMEH. Estos PN son capaces de proliferar *in vitro* y mantener cierto grado de multipotencia (Zhang X. 2010). El estadio del protocolo en el que estos PN fueron aislados corresponde al de crecimiento en adherencia, durante la formación de neurosetas (para más detalles véase Materiales y Métodos y Zhang X. 2010). Para mantener estos progenitores en un estadio indiferenciado, éstos fueron cultivados en el mismo medio de cultivo empleado para la propagación de las líneas tumorales, utilizando también placas pre-tratadas con laminina para favorecer su adherencia. En la figura 15 puede observarse la morfología de estas células cultivadas en

adherencia y su capacidad para formar NE en suspensión al ser cultivadas en ausencia de laminina.

Actualmente contamos con una línea de PN derivada de CMEH sobre la cual se realizó, como se indica más adelante, la caracterización inmunofenotípica (Figura 20) y el análisis genético (Tabla 5).

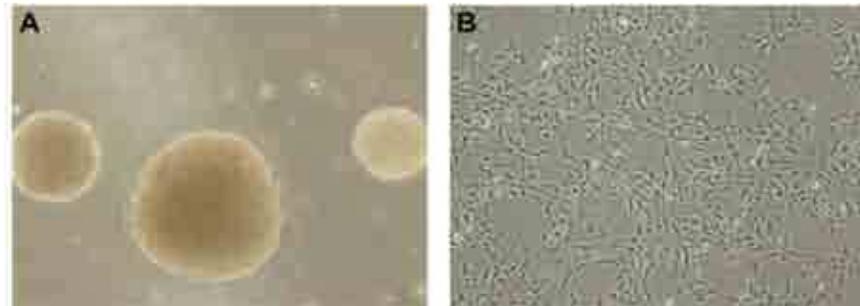


Figura 15. Fotomicrografías de la línea PN derivada de CMEH crecida en suspensión (A) y en adherencia (B) (magnificación 200x y 100x respectivamente).

Determinación de las alteraciones genéticas y epigenéticas presentes en CMPT y en PN

Los distintos tipos de gliomas presentan alteraciones genéticas y epigenéticas características (McLendon R. 2008). Hace relativamente poco tiempo se identificaron mutaciones en el gen *IDH1* (Isocitrato deshidrogenasa), extendidas luego, aunque con mucha menor frecuencia, al gen *IDH2*. Estas mutaciones constituyen un evento temprano en la iniciación de estos tumores y permiten clasificar a los gliomas de alto grado en dos grandes grupos: el primero de ellos (con mutaciones *IDH1/2*) corresponde a los denominados gliomas secundarios de alto grado, los cuales progresan a partir de gliomas de bajo grado. Los gliomas de este grupo suelen presentar otras alteraciones, las cuales incluyen pérdida de heterocigosidad en 1p y 19q (también denominadas delección de 1p y 19q), mutaciones en el gen *TP53*, pérdida de heterocigosidad en 10q y delección del gen *CDKN2A*. El segundo grupo (sin mutaciones *IDH1/2*) incluye a los gliomas primarios de alto grado (gliomas de alto grado *de novo*). Éstos presentan

frecuentemente la amplificación del gen EGFR, que suele ocurrir junto con las deleciones de 10q y de CDKN2A. En este grupo las mutaciones en el gen TP53 son mucho menos habituales. Por otra parte, la modificación epigenética más frecuente es la metilación de algunos promotores, en particular la de los genes CDKN2A y MGMT. Este último codifica la enzima metil-guanina metil transferasa, que participa en la quimioresistencia gracias a su capacidad para eliminar las guaninas alquiladas (O^6 -metil guanina) del ADN, contrarrestando así el efecto de los agentes alquilantes utilizados en los tratamientos más difundidos.

Con el fin de determinar si las líneas de CMPT establecidas exhiben las alteraciones genéticas y epigenéticas detectadas en la masa tumoral de las que fueron aisladas se realizaron diferentes análisis de PCR (Ferrer-Luna R. 2009; Ferrer-Luna 2011). En la tabla 5 se muestran los resultados de estos ensayos, los cuales fueron realizados en 9 tumores, en las respectivas líneas celulares de CMPT y en los PN. Los marcadores genéticos analizados fueron: deleción en 10q, en 1p y 19q, deleción del locus CDKN2A/ARF, amplificación de del locus EGFR (incluyendo presencia o ausencia de la versión mutada EGFRvIII), mutaciones del gen TP53, metilación del promotor del gen MGMT y mutaciones del gen IDH1.

Como puede observarse, todas las muestras resultaron normales para las regiones analizadas en el gen p53. Por otra parte, en todos los casos en los que se detectaron amplificaciones del locus EGFR, el número de copias encontrado en las líneas celulares fue considerablemente menor al encontrado en las biopsias. Este fenómeno ha sido descrito en líneas de cáncer de mama y de cáncer epidermoideo (Gill G. 1981) y recientemente también ha sido documentado para líneas aisladas de GBM (Chen R. 2010; Schulte A. 2012). En estos casos, la presencia de EGF en el medio de cultivo conllevaría a una inhibición del crecimiento en las células con alto número de copias del EGFR. En la muestra G02 la amplificación observada se debe a una trisomía del cromosoma 7 y es por ello que en la línea celular correspondiente no se observa dicha disminución.

Estos resultados indican que las células crecidas *in vitro* poseen un perfil similar al encontrado en los tumores originales, confirmando así la naturaleza tumoral de los cultivos.

MUESTRA	10q	1p	19q	CDKN2	EGFR	EGFR VIII	p53	Metilación MGMT	IDH1
PN 01	No del	No del	No del	Normal	Normal	NO	Normal	No met	Normal
G01 (biopsia)	Del	No del	No del	Del	Normal	NO	Normal	No met	R132H
G01 (células)	Del	No del	No del	Del	Normal	NO	Normal	No met	R132H
G02 (biopsia)	Del	No del	No del	Del	Amp (x3)	NO	Normal	Metilado	Normal
G02 (células)	Del	No del	No del	Del	Amp (x3)	NO	Normal	Metilado	Normal
G03 (biopsia)	Del	Del parcial	No del	Del	Amp (x55)	NO	Normal	No met	Normal
G03 (células)	Del	Del parcial	No del	Del	Amp (x4)	NO	Normal	No met	Normal
G04 (biopsia)	Del	No del	No del	Del	Amp (x170)	SI	Normal	No met	Normal
G04 (células)	Del	No del	No del	Del	Amp (x18)	SI	Normal	No met	Normal
G05 (biopsia)	Del	No del	No del	Del	Amp (x128)	SI	Normal	No met	Normal
G05 (células)	Del	No del	No del	Del	Amp (x44)	SI	Normal	No met	Normal
G06 (biopsia)	Del	No del	No del	No del	Amp (x112)	SI	Normal	No met	Normal
G06 (células)	Del	No del	No del	No del	Amp (x9)	SI	Normal	No met	Normal
G07 (biopsia)	Del	No del	No del	Del	Amp (x82)	NO	Normal	Met (trazas)	Normal
G07 (células)	Del	No del	No del	Del	Amp (x4)	NO	Normal	No met	Normal
G08 (biopsia)	Del	Del	Del parcial	Del	Amp (x244)	NO	Normal	Metilado	Normal
G08 (células)	Del	Del	Del parcial	Del	Amp (x20)	NO	Normal	Metilado	Normal
G09 (biopsia)	Del	Del parcial	No del	Normal	Normal	NO	Normal	No met	Normal
G09 (células)	Del	Del parcial	No del	Del	Normal	NO	Normal	No met	Normal

Tabla 5. Alteraciones genéticas y epigenéticas en biopsias de tumores, en las líneas de CMPT correspondientes y en PN. Del: deleción; No del: no deleción; Met: metilado; No met: no metilado. R132H es el tipo de mutación encontrada.

Caracterización inmunofenotípica de CMPT y PN derivados de CMEH

Para continuar con la caracterización de las líneas de CMPT y de los PN se determinó en éstas la expresión de distintos marcadores de CMN, de progenitores tempranos y de CMT de glioma.

En primer lugar, dada la gran relevancia de la proteína CD133 como marcador de CMT de glioma, se evaluaron los niveles de expresión del ARNm en 6 líneas de CMPT, en PN y en CMEH. Como control negativo se utilizaron FH. Como puede observarse en la figura 16, la abundancia relativa de este transcrito resultó muy variable dentro de las líneas de CMPT. Además, en concordancia con resultados publicados previamente por otros grupos de investigación (Pfenninger, C. 2007; Peh G. 2009), en las CMEH y en los PN se detectaron elevados niveles de expresión de este ARNm.

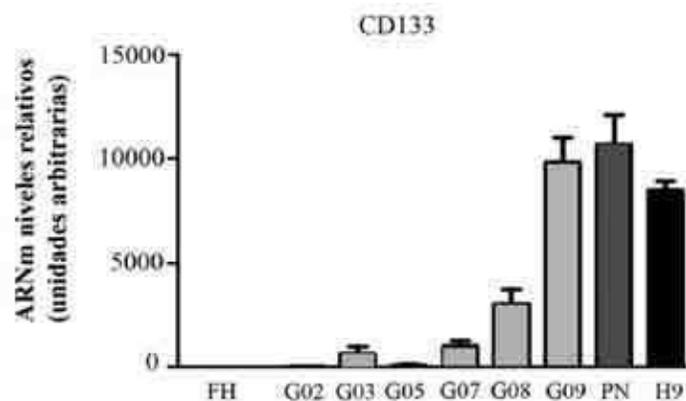


Figura 16. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para CD133. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión de FH, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes.

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión proteica de CD133 mediante citometría de flujo, tanto en las 6 líneas de CMPT como en los PN. Pudo determinarse, como se indica en la figura 17, que la variabilidad observada entre las distintas líneas de CMPT fue similar a la observada para los ARNm. Además, se evidenció una fuerte correlación entre el grado de expresión del transcrito y de

la proteína en cada una de las líneas ensayadas. Nótese que de las 6 líneas analizadas, 2 resultaron ser negativas (G02 y G05), 2 mostraron una baja expresión (G03 y G07) y las 2 restantes (G08 y G09), al igual que los PN, resultaron fuertemente positivas.

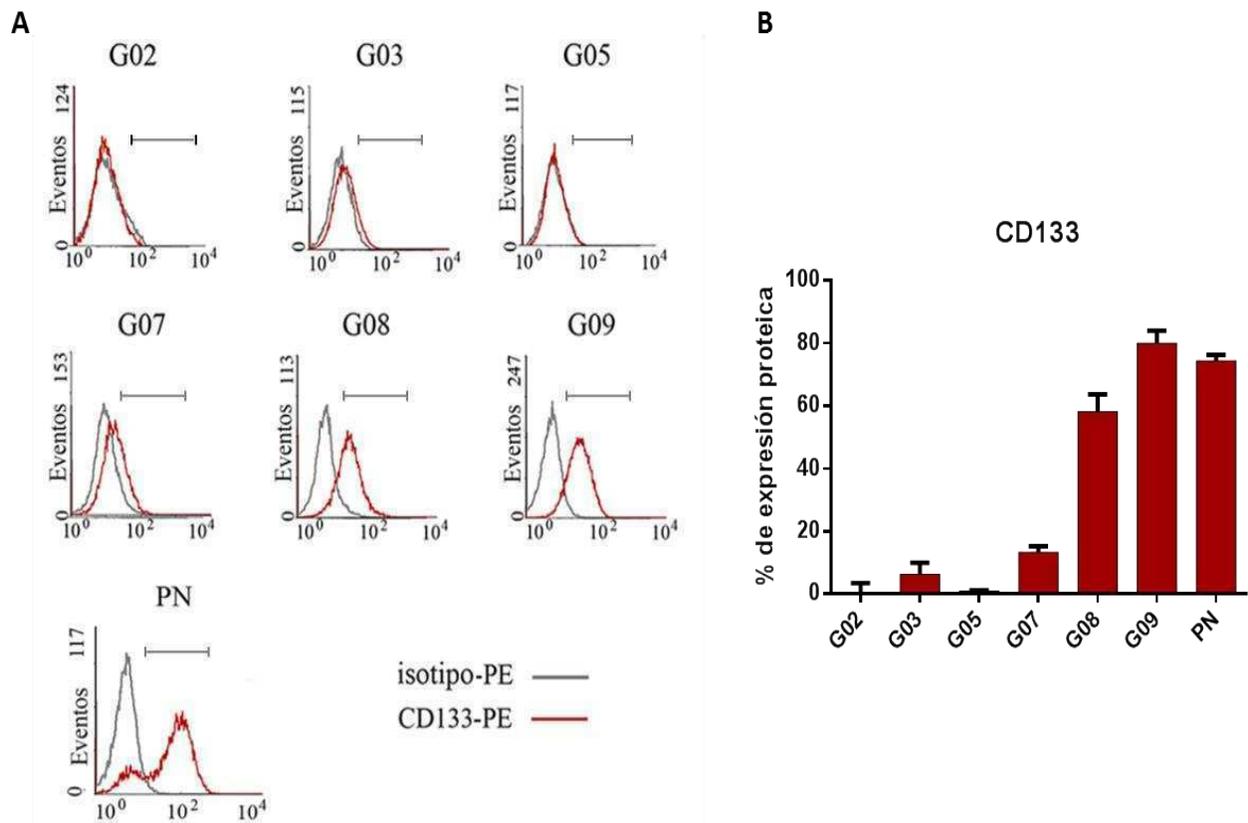
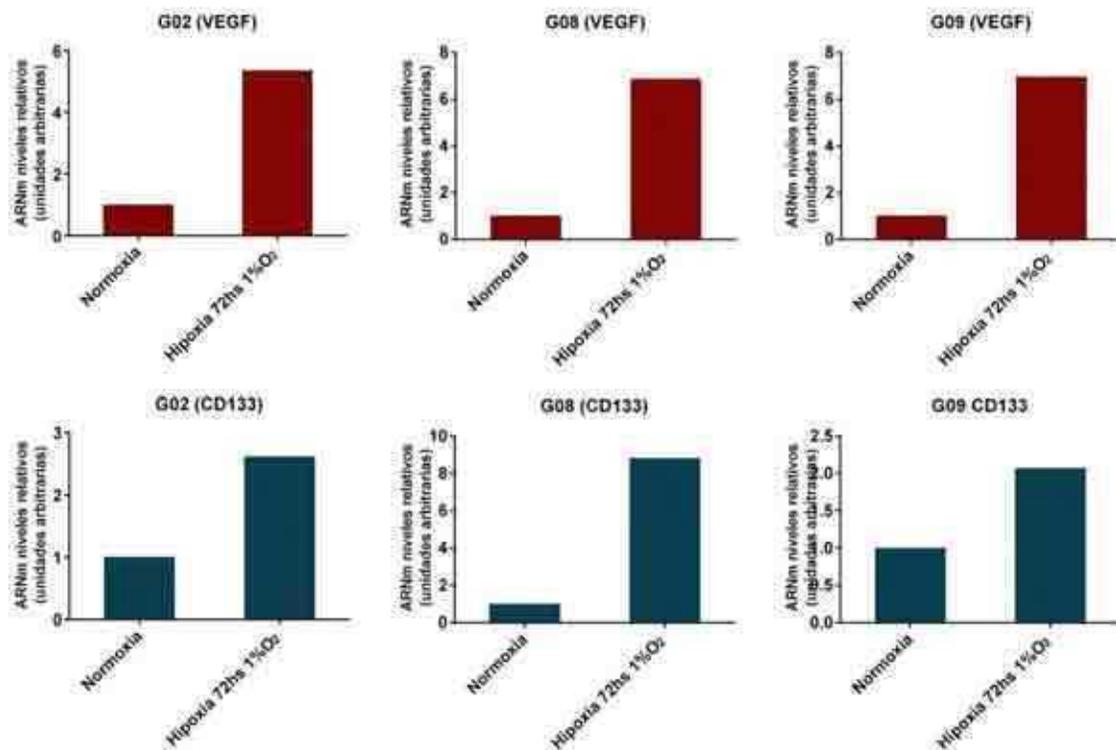


Figura 17. A. Histogramas representativos de los niveles de expresión proteica de CD133 determinados por citometría de flujo en las respectivas líneas de CMPT y de PN empleando anticuerpos primarios específicos anti-CD133 acoplados a PE (ficoeritina). **B.** Cuantificación de los niveles de expresión proteica determinados por duplicado mediante citometría de flujo.

En cada línea celular evaluada, los niveles de expresión de CD133, tanto a nivel del ARNm como de la proteína, fueron estables a lo largo de diferentes pasajes (en todos los casos entre el pasaje 5 y el pasaje 15). Por otra parte, dado que fue reportado que la hipoxia induce la expresión de CD133 en CMT de gliomas (Heddleston J. 2009; Li Z. 2009), decidimos evaluar si esta inducción ocurría también en las líneas de CMPT presentadas en este trabajo.

A



B

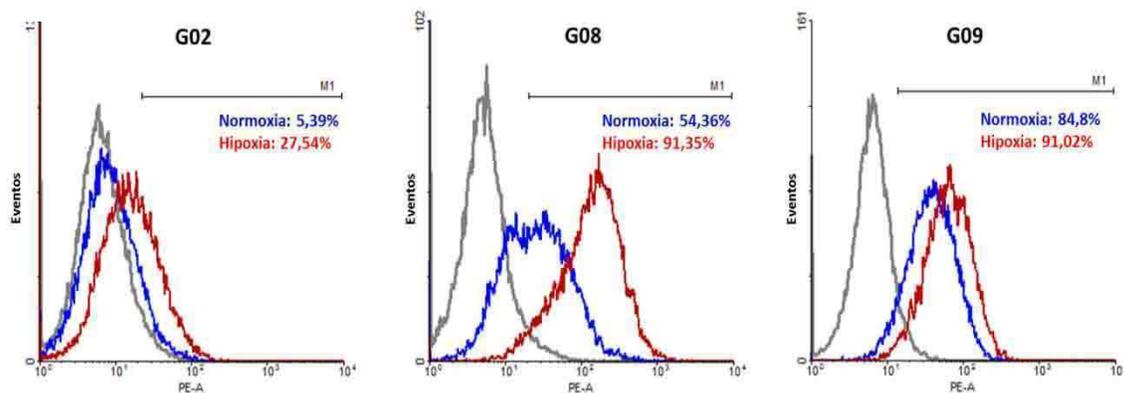


Figura 18. A. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando primers específicos para VEGF y CD133. Los valores fueron normalizados contra RPL7. En cada caso los valores son relativos a la expresión en normoxia, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias de un único experimento realizado por triplicado. **B.** Histogramas representativos de los niveles de expresión proteica de CD133 en normoxia e hipoxia (1% O₂ durante 72hs) determinados por citometría de flujo en las respectivas líneas de CMPT empleando un anticuerpo primario específico anti-CD133 acoplado a PE (ficoeritrina). Se indican los porcentajes de células consideradas positivas para CD133 tanto en normoxia (azul) como en hipoxia (rojo).

En primer lugar, y teniendo en cuenta que cambios en la tensión del O₂ resultan críticos para la regulación transcripcional del VEGF, evaluamos los niveles del ARNm por RT-PCR en tiempo real de este factor en tres líneas de CMPT (G02, G08 y G09) tras cultivarlas en hipoxia (1% O₂) durante 72 horas. Como se observa en la figura 18 A (panel superior) en todos los casos la hipoxia indujo marcadamente los niveles del transcripto (aproximadamente 6 veces). Posteriormente, tanto mediante RT-PCR en tiempo real como por citometría de flujo detectamos, en todos los casos, un aumento de CD133 (Figura 18 A, panel inferior y B). Este resultado sugiere que las condiciones de cultivo podrían modular sustancialmente la abundancia de este marcador de CMT.

Dado que la utilización de un único marcador resulta insuficiente para definir la naturaleza de una población celular, mediante inmunofluorescencia evaluamos la presencia de diferentes marcadores de CMN, de progenitores en tránsito y de CMT de gliomas. Como se observa en la figura 19, en las 6 líneas evaluadas se observó una marcada expresión de los filamentos intermedios Nestina y Vimentina, del factor de transcripción Sox2 y de la proteína transmembrana CD44. Estos resultados concuerdan con los exhibidos por las líneas de CMT obtenidas por el grupo de investigación de Peter Dirks (Pollard S. 2009).

Para caracterizar el fenotipo de la línea de PN realizamos inmunomarcaciones para detectar, no sólo la presencia de los filamentos intermedios mencionadas anteriormente, sino también la de ciertos marcadores de linaje del sistema nervioso. Pudimos determinar que esta línea celular expresa los marcadores de linaje neuronal β III-tubulina (Tuj-1) y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2). Por otra parte, en su gran mayoría estas células resultaron negativas para el marcador de linaje astrogial GFAP (Figura 20). Estos resultados indican que esta línea de PN tendría cierto grado de compromiso hacia el linaje neuronal.

De este modo, el inmunofenotipo observado en las líneas de CMPT evidencia el elevado grado de indiferenciación de estos cultivos y confirma similitudes fenotípicas entre éstas y la línea de PN.

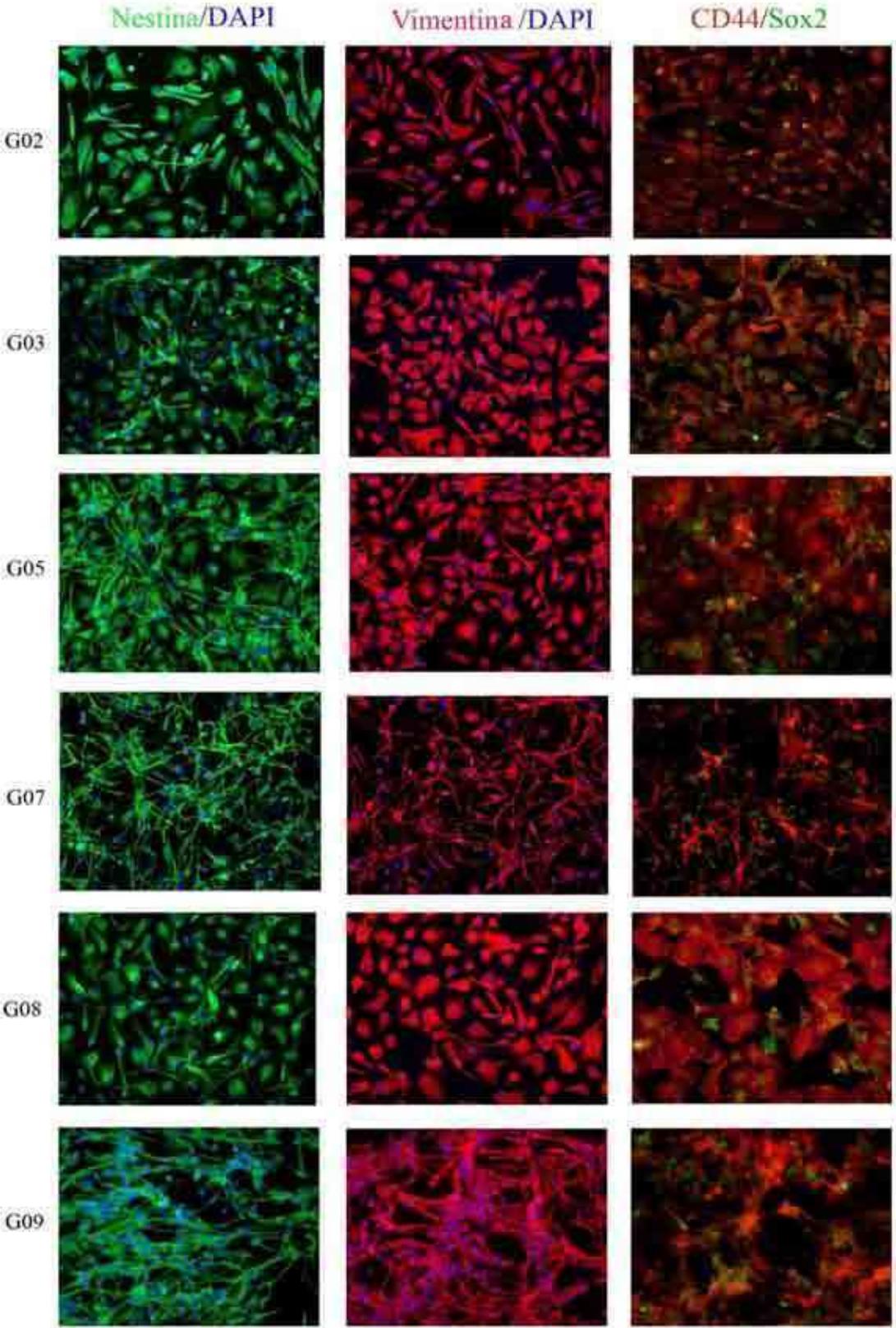


Figura 19. Inmunofenotipo de líneas de CMPT determinado por inmunofluorescencia empleando anticuerpos primarios específicos para Nestina, Vimentina, CD44 y Sox2 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

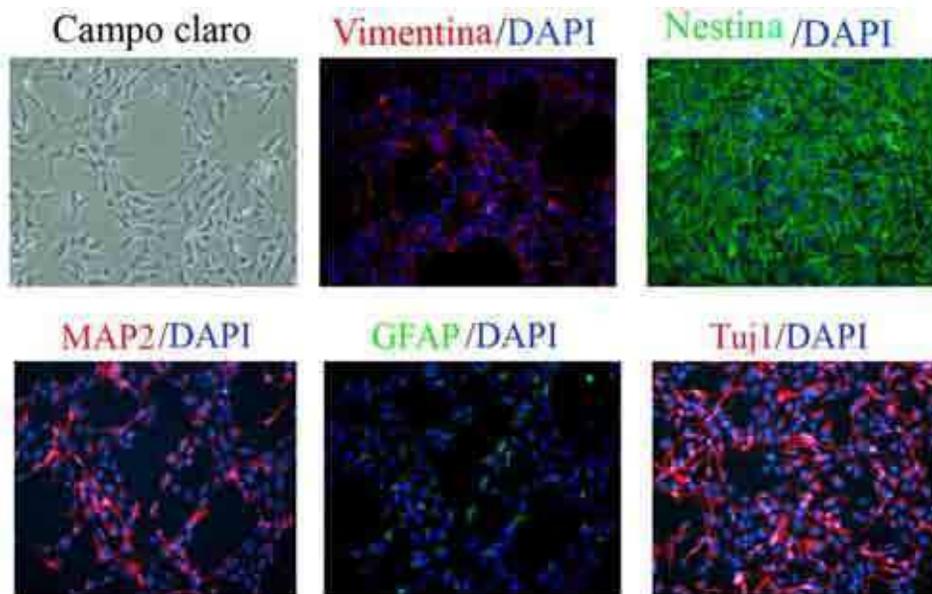


Figura 20. Inmunofenotipo de PN derivados de CMEH determinado por inmunofluorescencia empleando anticuerpos primarios específicos para Nestina, Vimentina, MAP2, GFAP y Tuj1 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Xenotransplantes de CMPT en ratones inmunodeficientes

Para verificar si las líneas de CMPT mantienen su capacidad tumorigénica luego de ser cultivadas *in vitro* por largos períodos (más de 10 pasajes), se realizaron xenotrasplantes ortotópicos en ratones inmunodeficientes (*nude*) utilizando células de las líneas G02 y G07. Para ello, en cada ratón se inocularon por estereotaxia 10^5 células en el putamen del hemisferio derecho del cerebro (se utilizaron 5 ratones para cada línea de CMPT). Luego de tiempos variables (de 2 a 5 meses) se analizaron los cerebros de los ratones sacrificados. En 2 de los 5 ratones inoculados con células de la línea G02 y en 3 de los 5 inoculados con células de la línea G07 se detectaron tumores que mostraron características de gliomas de alto grado. La capacidad tumorigénica de estas líneas resultó ser similar a la reportada en trabajos realizados por otros grupos de investigación (Gangemi R. 2009; Pollard S. 2009). Llamativamente, en el cerebro de uno de los ratones inoculados con células de la línea G02, fue posible observar alteraciones estructurales macroscópicas debidas a lesiones quísticas asociadas al crecimiento de la masa tumoral (Figura 21).

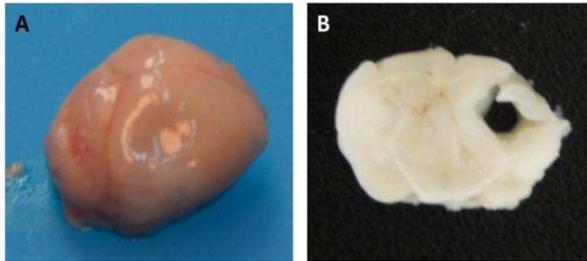


Figura 21. **A.** Alteraciones estructurales macroscópicas en el cerebro de un ratón al que se le trasplantaron células de la línea G02 **B.** Corte coronal del cerebro mostrado en (A) en donde se observa la presencia de un quiste.

Como se observa en las figuras 22 y 24 las muestras obtenidas a partir de los tumores de los pacientes, luego de ser teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), presentaron las características típicas de los GBM: necrosis en “empalizada”, hiperplasia microvascular, pleomorfismo nuclear e incremento del número de mitosis. Las inmunomarcaciones positivas para GFAP, y el índice cinético elevado (Ki67) confirmaron los hallazgos morfológicos. Por otra parte, los tumores obtenidos a partir de los xenotrasplantes, mostraron ciertas características de los gliomas de alto grado (pleomorfismo nuclear e incremento del número de mitosis); sin embargo, no fue posible observar necrosis en “empalizada” ni hiperplasia microvascular (Figuras 23 y 24). En estos tumores también fue posible detectar, mediante técnicas de inmunohistoquímica, un índice cinético moderado (Ki67) y la presencia de GFAP de origen humano, confirmando que éstos fueron originados a partir de las CMPT inoculadas (Figura 23).

Esta menor complejidad en la organización de los tumores generados por xenotrasplantes de células mantenidas en cultivo ha sido descrita previamente en la literatura (Tveit K. 1981; Williams S. 2013). Aunque sea por períodos breves, las condiciones de cultivo, entre ellas, la composición del medio de cultivo, la elevada tensión de O_2 y la falta de señalización mediada por el estroma tumoral, son suficientes para producir cambios epigenéticos irreversibles en las células (Daniel V. 2009). Además, estas mismas condiciones artificiales, pueden fácilmente promover la selección de las subpoblaciones celulares que posean una mayor tasa de crecimiento, disminuyendo así cierto grado de la heterogeneidad propia de los tumores. Por último, el nicho existente en los ratones, probablemente diste de ser equivalente al presente en los tumores originales. Por estas razones, no

resulta sorprendente que las células tumorales humanas, que han sido cultivadas *in vitro* y luego trasplantadas en animales de otra especie, no sean capaces de regenerar la complejidad existente en el tumor del cual derivan. Sin embargo, es importante tener presente que aunque una de las propiedades características de las CMT es la de ser capaces de recapitular la heterogeneidad y las características fenotípicas del tumor de origen, esto sólo se verifica en los casos en donde una subpoblación de CMT es aislada y las células son trasplantadas inmediatamente (o luego de unas pocas horas) en animales de laboratorio (Williams S. 2013).

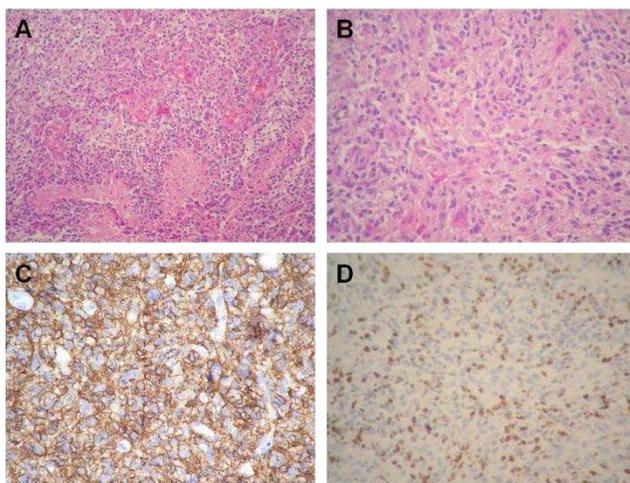


Figura 22. **A.** H&E correspondiente al tumor 21489 del cual se derivó la línea de CMPT G02. El examen microscópico reveló la presencia de necrosis en empalizada, hiperplasia microvascular y proliferación de células con núcleos esféricos a ovales, hiper cromáticos y de moderado pleomorfismo (magnificación 200x). **B.** H&E que evidencia la presencia de mitosis de células multinucleadas y pleomorfas (magnificación 400x). **C.** Inmunomarcación positiva para GFAP (magnificación 400x). **D.** Inmunomarcación de Ki67 evidenciando un elevado porcentaje de núcleos positivos (magnificación 400x).

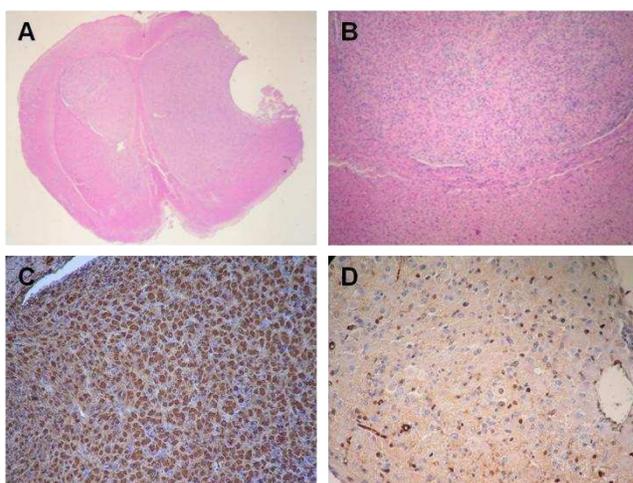


Figura 23. **A y B.** H&E en un corte coronal de un tumor originado a partir del xenotrasplante de células de la línea de CMPT G02. Nótese la ausencia de necrosis e hiperplasia microvascular (magnificaciones: 20x y 200x respectivamente). **C.** Inmunomarcación positiva para GFAP (magnificación 400x). **D.** Inmunomarcación de Ki67 evidenciando un moderado porcentaje de núcleos positivos (magnificación 400x).

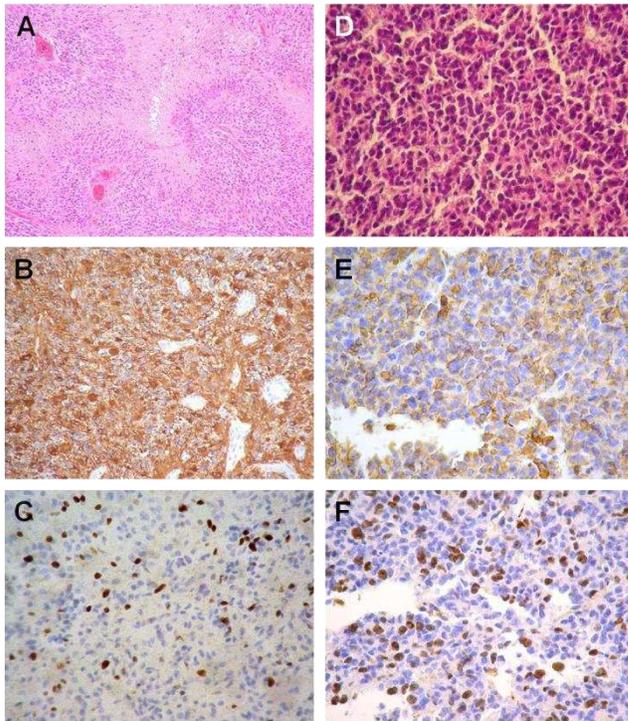


Figura 24. Panel izquierdo (tinciones correspondientes al tumor 22877 del cual se derivó la línea de CMPT G07): A. H&E en donde se observan necrosis e hiperplasia microvascular (magnificación 200x). **B.** Inmunomarcación positiva para GFAP (magnificación 200x). **C.** Inmunomarcación de Ki67 evidenciando un moderado porcentaje de núcleos positivos (magnificación 400x). **Panel derecho (tinciones correspondientes a un tumor originado a partir del xenotrasplante de células de la línea de CMPT G07): D.** H&E en donde se observan células con núcleos hiper cromáticos de moderado pleomorfismo y con un citoplasma acidófilo (magnificación 400x). **E** Inmunomarcación positiva de GFAP (magnificación 400x). **F.** Inmunomarcación de Ki67 con moderado porcentaje de núcleos positivos (magnificación 400x).

Imágenes moleculares y estructurales pre-clínicas de gliomas desarrollados a partir de xenotrasplantes ortotópicos

La 2-[^{18}F]fluoro-2-desoxi-D-glucosa (^{18}F -FDG) es un radiofármaco constituido por un análogo de la glucosa unido al isótopo radiactivo ^{18}F -flúor (emisor de positrones). La ^{18}F -FDG permite el estudio del metabolismo celular de la glucosa y es el radiofármaco más utilizado en PET gracias a su mayor disponibilidad. La incorporación de ^{18}F -FDG en tumores es atribuida al hipermetabolismo de las células tumorales. Por el contrario, el hipometabolismo detectado en ciertas regiones, caracterizado por una disminución en la captación del radiotrazador, indica la presencia de necrosis tumoral. La ^{18}F -FDG es utilizada en el diagnóstico diferencial de lesiones con imágenes de RMN realizadas en casos de linfomas, metástasis y gliomas de alto grado (Leskinen-Kallio S. 1994). Las imágenes de ^{18}F -FDG PET han mostrado capacidad pronóstica en la progresión de gliomas de bajo grado a gliomas más agresivos y en la recurrencia de gliomas de alto grado. Sin embargo, el alcance de la ^{18}F -FDG para la detección

de lesiones del SNC es limitado debido al alto nivel de captación de este radiotrazador por parte del tejido cerebral normal (Chen W. 2007).

En colaboración con el centro de imágenes moleculares de la institución fue posible realizar técnicas de resonancia magnética nuclear RMN y de ^{18}F -FDG PET. Como se observa en la figura 25 (A y B), la imagen de resonancia (T1) resalta un incremento de la señal en las regiones quísticas, desplazamiento de masa y de línea media cerebral. Esta imagen brinda además, un reparo anatómico para la imagen metabólica. Por otra parte, en la imagen de PET se observa un incremento en la captación de ^{18}F -FDG asociado a un metabolismo elevado coincidente con la extensión del tumor en el corte histológico (Figuras 25 C y D y Figura 23 A respectivamente). El hipometabolismo en este caso es debido a la ausencia de tejido como consecuencia de la lesión quística observada en la resonancia (Figuras 25 C y D).

Estos resultados no sólo confirman la tumorigenicidad de las líneas de CMPT analizadas, sino que además demuestran la factibilidad de utilizar a futuro imágenes pre-clínicas moleculares y estructurales de gliomas desarrollados a partir de xenotrasplantes ortotópicos para evaluar los efectos de diferentes tratamientos antineoplásicos.

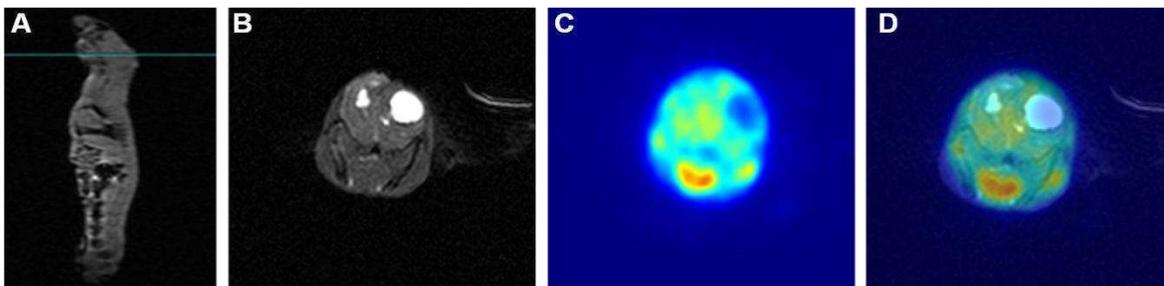


Figura 25. Imágenes de RMN y de F18-FDG en ratones *nude* xenotransplantados con la línea celular G02. **A.** Imagen de localización por RMN en equipo GE 3T HDx, adquirida con bobina de muñeca. **B.** RMN, corte coronal flair ponderado en T1. **C.** Imagen de PET de cerebro con ^{18}F -FDG, co-registrada al reparo anatómico de la RMN. **D.** Fusión de imágenes entre PET y RMN (B+C).

Subtipificación de tumores y de CMPT

Como se describió en la Introducción, los gliomas de alto grado pueden ser clasificados en base a sus perfiles de expresión. Este tipo de clasificación se

realiza por medio de estudios de microarreglos, y como también se vio, los distintos grupos presentan diferencias en cuanto a su pronóstico. Sin embargo, recientemente fue reportado que es posible agrupar a los tumores en estas categorías según el perfil de expresión de un número acotado de genes e incluso mediante el análisis inmunohistoquímico de un número también acotado de proteínas (Siebzehnruhl F. 2013).

Con el fin de clasificar a los tumores y para comprobar si existe una correlación entre los perfiles de expresión de éstos y de las líneas de CMPT correspondientes, decidimos analizar la expresión de distintos genes que caracterizan a cada una de dichas categorías (Tabla 6).

Gen	Grupo
Olig 2 (del inglés, <i>oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>)	Proneural
PDGFRA (del inglés, <i>platelet-derived growth factor receptor α</i>)	
DCX (del inglés, <i>doublecortin</i>)	
SYT1 (del inglés, <i>synaptotagmin-1</i>)	Neural
NEFL (del inglés, <i>neurofilament, light polypeptide</i>)	
SLC12A5 (del inglés, <i>solute carrier family 12 member 5</i>)	
EGFR (del inglés, <i>epidermal growth factor receptor</i>)	Clásico
GLI2 (del inglés, <i>GLI family zinc finger 2</i>)	
JAG1 (del inglés, <i>jagged 1</i>)	
CD44 (del inglés, <i>cluster of differentiation 44</i>)	Mesenquimático
CHI3L (del inglés, <i>chitinase 3-like 1</i>)	
VEGF (del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>)	

Tabla 6. Genes empleados para realizar la subtipificación de tumores y líneas de CMPT.

Como se observa en la figura 26 A, el tumor que originó la línea G09 presentó un perfil de expresión correspondiente al grupo Neural; el tumor que originó la línea G02 mostró un perfil mesenquimático, mientras que el perfil de los que originaron las líneas G03 y G08 fue clásico. Sin embargo, como ha sido propuesto previamente (Phillips H. 2006; Colman H. 2010), estos últimos podrían considerarse como híbridos entre los grupos clásico y mesenquimático. Si bien la clasificación realizada por microarreglos resulta más consistente, los datos

observados en estos cuatro tumores, analizando sólo tres genes de cada grupo, muestran buenas diferencias que además correlacionan con el patrón de alteraciones genéticas observado. Es importante considerar que en este caso, los valores obtenidos reflejan el perfil de expresión exhibido por las células que conforman la masa tumoral (altamente heterogénea), como también por las células del estroma presentes en el nicho tumoral.

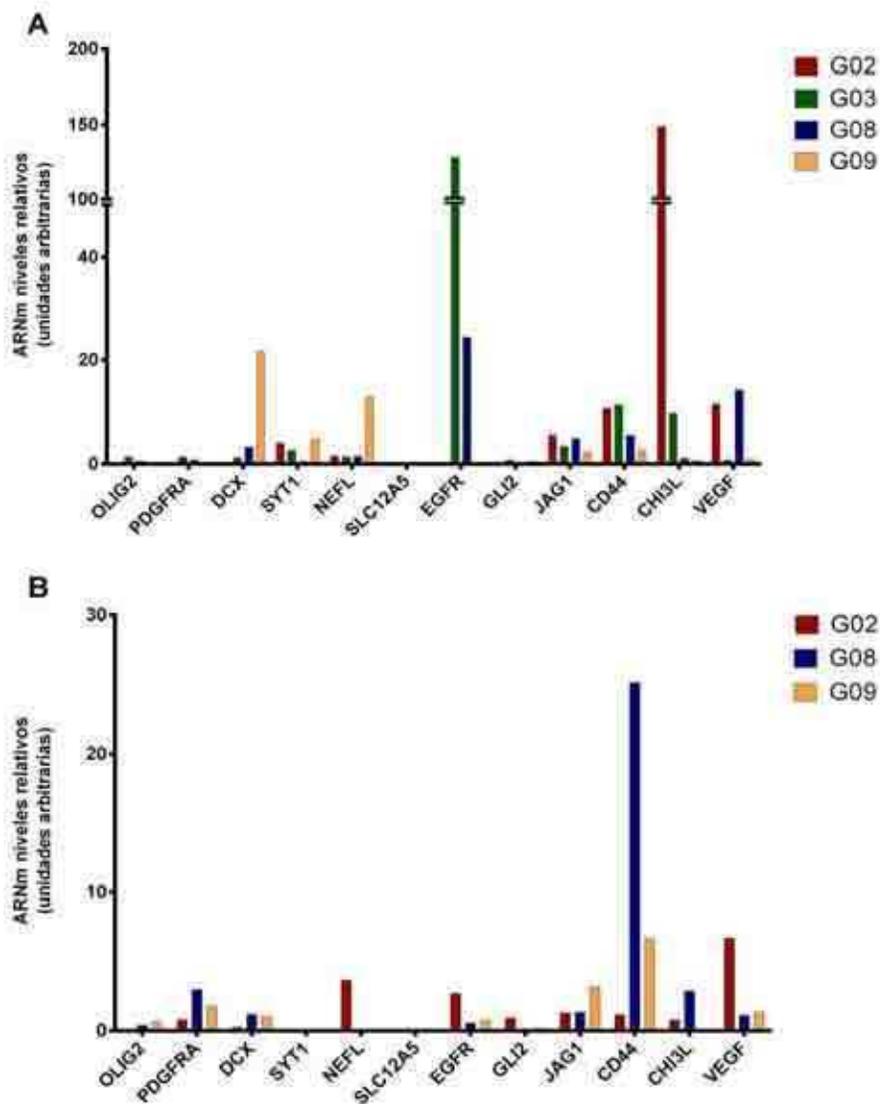


Figura 26. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para los genes indicados. Los valores fueron normalizados contra GUSB. Los resultados representan los valores de $2^{-(\Delta Ct)}$. **A.** Muestras quirúrgicas de los tumores correspondientes **B.** Líneas de CMPT respectivas.

El mismo análisis, realizado con las líneas de CMPT G02, G08 y G09, mostró resultados diferentes (figura 26 B). En los tres casos el patrón observado correspondió a un perfil mesenquimático. Este resultado sugiere que las CMPT tendrían un perfil asociado al subtipo de peor pronóstico y es coherente con la hipótesis de que estas células son más primitivas y más resistentes a las terapias anti-neoplásicas.

Por último, en concordancia con resultados previos (Chen R. 2010), hemos observado que la línea de CMPT derivada de un tumor del grupo mesenquimático (G02) muestra una muy baja expresión del marcador CD133.

PARTE 2: DIFERENCIACIÓN DE CMPT DEL SISTEMA NERVIOSO

La mayoría de los gliomas de alto grado corresponden a astrocitomas, los cuales se caracterizan por exhibir una expresión predominante del marcador de astrocitos GFAP. Sin embargo, estos tumores también suelen presentar, en forma variable, componentes neuronales y oligodendrogiales. Este fenómeno contribuye tanto a la heterogeneidad intra-tumoral como a la heterogeneidad inter-tumoral observada en estos tipos de cáncer. Por lo tanto, es concebible pensar que cada una de las líneas de CMPT derivadas de muestras de pacientes pueda presentar un patrón específico de diferenciación y un nivel particular de multipotencia, pudiendo esto tener o no relación con el origen celular de cada tumor. Como se mencionó anteriormente, comprender los mecanismos involucrados en la diferenciación de estas células ofrece potencialmente una oportunidad para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Niveles de expresión del ARNm de marcadores de linaje en CMPT y PN

Inicialmente, decidimos analizar los niveles de expresión de diferentes marcadores de linaje en distintas líneas de CMPT, en los PN y en FH, utilizando a estos últimos como una referencia no relacionada al sistema nervioso. Para ello, realizamos un análisis por RT-PCR en tiempo real de dos marcadores astrogiales: GFAP y NFIA (del inglés, *nuclear factor IA*) y de dos marcadores neuronales: Tuj-1 y MAP2. Estas determinaciones fueron realizadas en condiciones de cultivo que favorecen la propagación de estas células y el mantenimiento de su fenotipo indiferenciado. Como se observa en la figura 27, las distintas líneas de CMPT exhibieron una elevada variabilidad en los niveles de los transcritos analizados.

Notablemente, las diferencias en el grado de expresión de los ARNm de marcadores astrogiales fueron mucho mayores que las observadas para los marcadores neuronales. En el caso de GFAP se observó, entre la línea celular de menor expresión (G02) y la de mayor expresión (G08), una diferencia de aproximadamente 400 veces. Por otra parte, los niveles de expresión de NFIA, un factor de transcripción involucrado en la diferenciación astrogial (Song H. 2010),

resultaron ser mucho mayores en dos líneas de CMPT (G03 y G05) que en el resto de las células analizadas. En cuanto a los marcadores del linaje neuronal, si bien se observó una baja variabilidad, el grado de expresión del ARNm de Tuj-1 en la línea celular G09, resultó ser aproximadamente el doble respecto a la observada en el resto de líneas analizadas. Interesantemente, como se indicó en resultados anteriores (Figura 26), la línea G09 derivó de un tumor perteneciente al grupo “Neural” dentro de los gliomas de alto grado. Por su parte, en concordancia con lo observado previamente mediante inmunotinciones (Figura 20), los PN mostraron, además del elevado nivel del transcrito de Tuj-1, una muy baja expresión del ARNm de GFAP.

Como se verá más adelante, esta variabilidad en la expresión de marcadores de linaje a nivel del ARNm en las distintas líneas de CMPT, fue confirmada también a nivel proteico (Figuras 29 y 30). Así, estos resultados, junto con las distintas alteraciones genéticas y las diferentes morfologías celulares observadas en cada línea de CMPT, dan cuenta de la elevada heterogeneidad inter-tumoral presente en los gliomas de alto grado.

Niveles de expresión del ARNm de marcadores de linaje en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogliol

Con el fin de evaluar posibles cambios en la expresión génica de marcadores de linaje a lo largo de la diferenciación de las CMPT, sometimos a diferentes líneas (G02, G03, G08 y G09) a un protocolo de diferenciación astrogliol que ha sido descrito con anterioridad (Lee J. 2008). Éste consiste en la remoción de los factores de crecimiento involucrados en la auto-renovación y en la proliferación de estas células (bFGF y EGF) y en el agregado de BMP4 (10ng/ml) al medio de cultivo, siendo este último un conocido inductor de la diferenciación astrocitaria. Las líneas celulares utilizadas fueron mantenidas en estas condiciones durante 21 días, a lo largo de los cuales se tomaron muestras para evaluar la expresión de los ARNm de los marcadores de linaje analizados previamente (Figura 28).

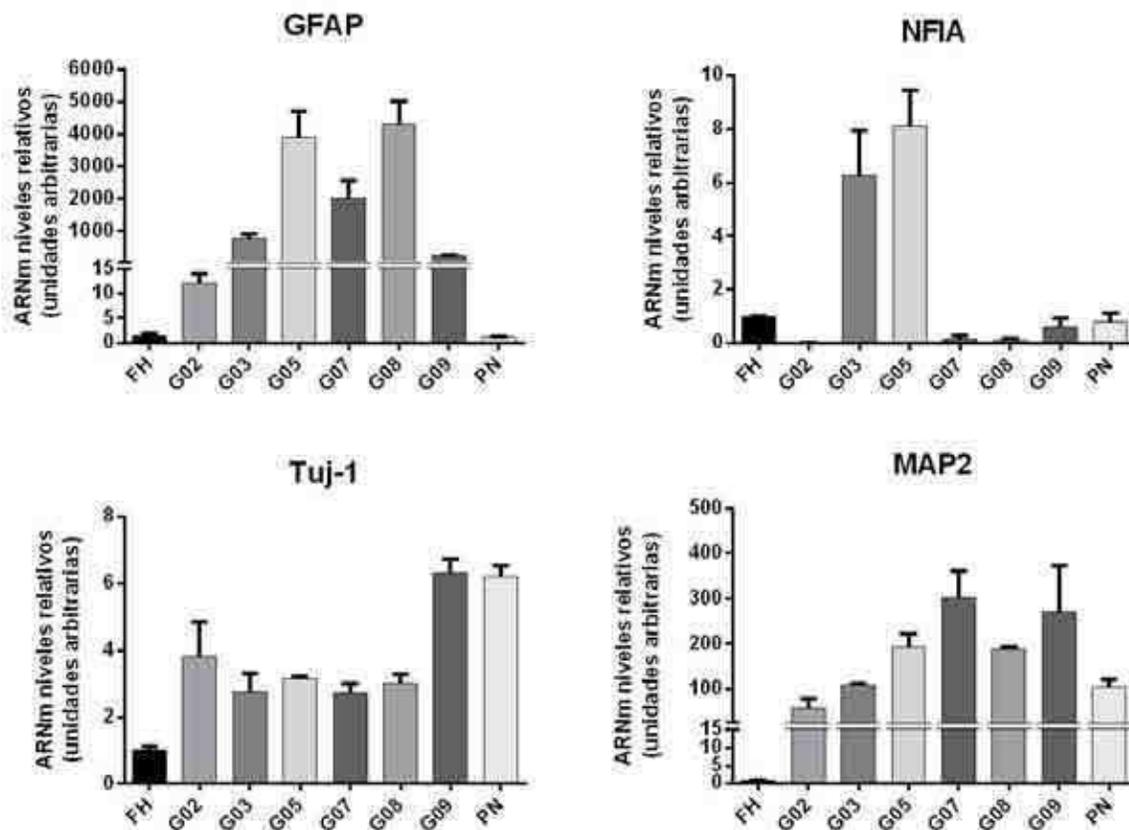


Figura 27. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para GFAP, NFIA, Tuj-1 y MAP2. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión de FH, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes.

En relación a los marcadores astrogliales, pudo observarse un marcado aumento de la expresión del transcrito de GFAP en las cuatro líneas de CMPT analizadas. Esta inducción resultó ser mucho mayor (aproximadamente de un orden de magnitud) en las líneas que mostraron una menor expresión de este gen en condiciones que mantienen su indiferenciación (G02 y G09 en la figura 27). Por el contrario, los cambios en los niveles de expresión del ARNm de NFIA variaron diferencialmente entre las distintas líneas tumorales. Mientras que en las líneas G02 y G09 se observó un aumento significativo de este transcrito, en G08 no se detectaron variaciones apreciables. En la línea G03 en cambio, los niveles de este ARNm mostraron un descenso considerable. Estos resultados sugieren que la expresión de NFIA, al menos en estas condiciones, no sería crítica para la

diferenciación astrogliar de las CMPT de gliomas. Por otra parte, las variaciones de los transcritos de los marcadores neuronales fueron leves. En términos generales, durante la diferenciación astrogliar pudo observarse un aumento del ARNm de Tuj-1 en las líneas G08 y G09 y un descenso del ARNm de MAP2 en las líneas G03 y G08. En el resto de los casos no hubo cambios significativos.

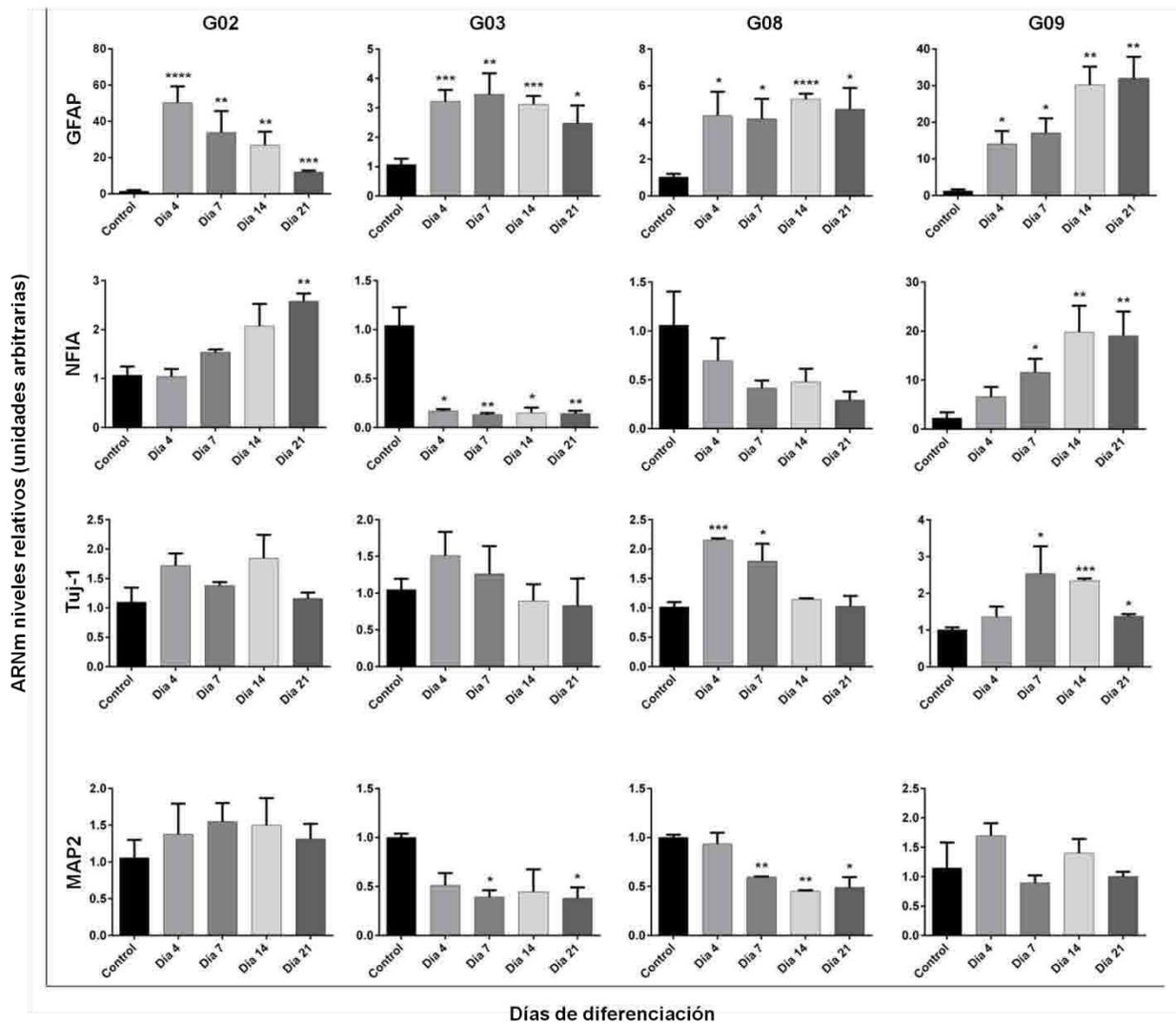


Figura 28. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para GFAP, NFIA, Tuj-1 y MAP2. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión del control (día 0) fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de CMPT a lo largo de la diferenciación astrogial

Durante los protocolos de diferenciación mencionados también fue posible observar y registrar, mediante microscopía de contraste de fases, cambios dramáticos en la morfología celular de todas las líneas de CMPT estudiadas. Por lo tanto, para evaluar si en cada caso éstos reflejaban efectivamente la diferenciación hacia un linaje en particular, decidimos además determinar la expresión proteica de GFAP, MAP2 y Tuj-1 mediante ensayos de inmunofluorescencia (Figuras 29 y 30). Dado que las CMPT fueron derivadas a partir de gliomas que poseen un componente astrocitario preponderante, resultaba esperable que durante el transcurso de este protocolo, las células adquiriesen, principalmente, un fenotipo similar al de los astrocitos maduros.

En concordancia con los resultados obtenidos por RT-PCR en tiempo real, en todos los casos pudo determinarse un aumento marcado en la expresión de GFAP. Sin embargo, los cambios morfológicos producidos en las diferentes líneas de CMPT resultaron ser sorprendentemente variables. En las líneas G05, G08, G09, y en menor medida en G07, pudo observarse una mayoría de células con un evidente fenotipo astrogial (apariencia estrellada con múltiples prolongaciones ramificadas). Sin embargo, en las líneas G02 y G03 no fue posible distinguir una morfología celular predominante, aunque algunas células aisladas mostraron procesos celulares similares a los presentes en los astrocitos. En cuanto a las líneas de CMPT que efectivamente adoptaron un claro fenotipo astrogial, es interesante observar que las morfologías halladas en las líneas G05 y G07 mostraron ciertas semejanzas con la de los astrocitos fibrosos (procesos largos, delgados y no muy ramificados; presentes típicamente en la sustancia blanca), mientras que las líneas G08 y G09 mostraron una morfología similar a la de los astrocitos protoplasmáticos (prolongaciones gruesas, cortas y muy ramificadas; presentes principalmente en la sustancia gris) (Snell R. *Neuroanatomía Clínica*. Editorial Panamericana. Tercera Edición).

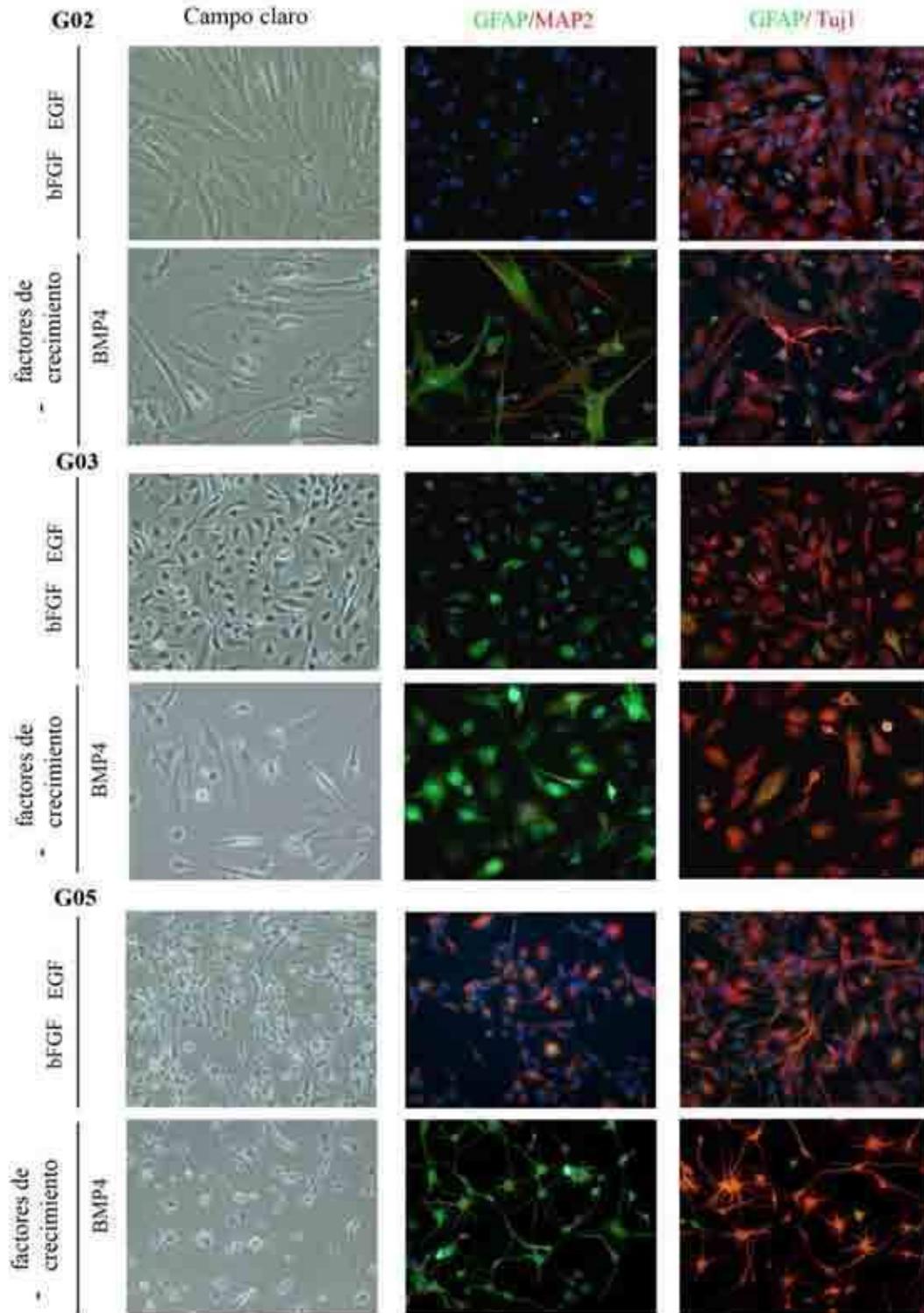


Figura 29. Fotomicrografías de contraste de fases y de fluorescencia representativas de las líneas de CMPT G02, G03 y G05. En cada caso en el panel superior se muestran CMPT indiferenciadas (en presencia de bFGF y EGF) y en el panel inferior CMPT luego de 21 días de cultivo en presencia de BMP4 y ausencia de bFGF y EGF. Las inmunomarcaciones fueron realizadas empleando anticuerpos primarios específicos para GFAP, MAP2 y Tuj-1 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

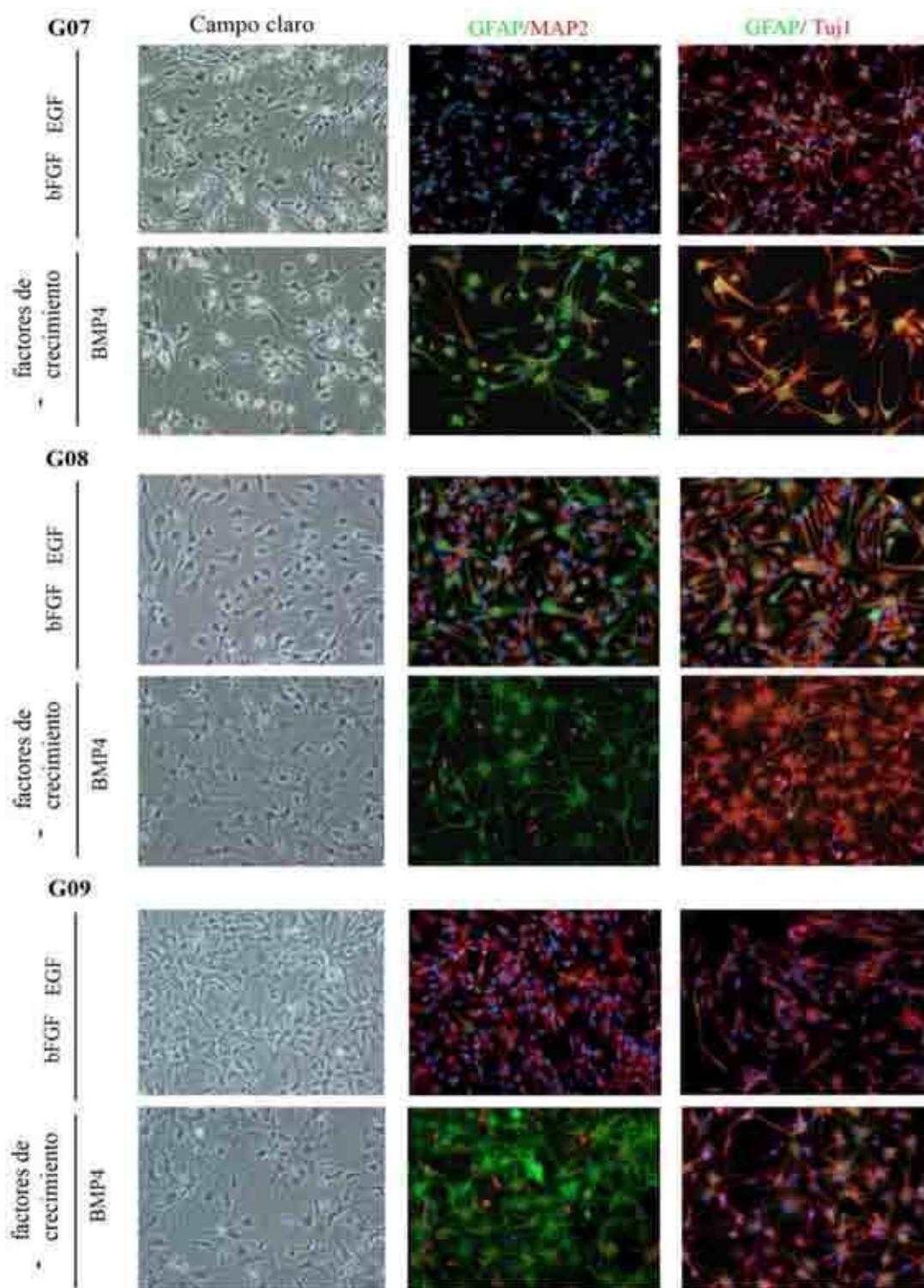


Figura 30. Fotomicrografías de contraste de fases y de fluorescencia representativas de las líneas de CMPT G07, G08 y G09. En cada caso en el panel superior se muestran CMPT indiferenciadas (en presencia de bFGF y EGF) y en el panel inferior CMPT luego de 21 días de cultivo en presencia de BMP4 y ausencia de bFGF y EGF. Las inmunomarcaciones fueron realizadas empleando anticuerpos primarios específicos para GFAP, MAP2 y Tuj-1 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Con respecto a los marcadores de linaje neuronal, la expresión de Tuj-1 fue detectada en la gran mayoría de las células en todas líneas de CMPT analizadas, aunque no se observaron cambios evidentes en sus niveles de expresión luego de que los cultivos fueran diferenciados. Llamativamente, este marcador fue detectado incluso, en células que presentaron una clara morfología astrocitaria. Esta expresión aberrante de Tuj-1 en células derivadas de gliomas de alto grado ha sido documentada previamente (Piccirillo S. 2006; Katsetos C. 2001). Por otra parte, la expresión de MAP2 fue detectada en un gran porcentaje de células indiferenciadas de las líneas G05, G07, G08 y G09 (paneles superiores de cada línea de CMPT en las figuras 29 y 30). Sin embargo, tras la diferenciación con BMP4 su expresión se limitó a células aisladas (minoritarias) que mostraron una morfología similar a la neuronal, no siendo detectada en células con morfología astrocitaria. De este modo, consideramos que en estas líneas celulares, MAP2, pero no Tuj-1, constituye un marcador apropiado para determinar el compromiso en la diferenciación hacia el linaje neuronal.

A continuación analizaremos los cambios fenotípicos ocurridos en cada una de estas líneas de CMPT luego de la diferenciación, ya que todas ellas presentaron características únicas (Figuras 29 y 30).

La línea G02 en estado indiferenciado presenta un aspecto homogéneo, con células que poseen una morfología reminiscente a la de fibroblastos (células fusiformes con un citoplasma amplio y aplanado). Además, éstas muestran una muy baja expresión de GFAP y de MAP2. Luego de la diferenciación, la morfología adoptada por estas células resultó ser muy variable, aunque en algunas de ellas fue posible observar la aparición de procesos celulares y una evidente expresión de GFAP, características típicamente presentes en células astrocitarias. Además, la expresión de MAP2 fue detectada sólo en unas pocas células diferenciadas.

La línea G03, también de aspecto homogéneo, se encuentra formada por células más pequeñas y de mayor contraste que las células presentes en la línea G02. En estado indiferenciado, muchas resultan positivas para la expresión de GFAP, aunque sólo en algunas células aisladas es posible detectar una baja expresión de MAP2. Tras ser diferenciadas, estas células, al igual que las de la

línea G02, presentaron morfologías variadas. En muchos casos fue posible observar también, células con un citoplasma aplanado del cual se originaron unos pocos procesos celulares. En la gran mayoría de las células se pudo observar un aumento en los niveles de expresión de GFAP en relación a las células en estado indiferenciado, pero no se detectaron cambios en cuanto a la expresión de MAP2.

La línea G05, a diferencia de las dos líneas anteriores, muestra cierto grado de heterogeneidad en condiciones de indiferenciación. Las células poseen un aspecto más diferenciado, exhibiendo largos y finos procesos celulares. Pese a estas características morfológicas, estas células han sido propagadas de manera estable durante más de 20 pasajes. Si bien en estas condiciones los niveles de expresión de GFAP son bajos, la mayoría de estas células resultan positivas para la expresión de MAP2. Luego de su diferenciación, estas células mostraron un profundo cambio, tanto en la morfología celular como en la expresión de los marcadores de linaje analizados. A nivel morfológico, la gran mayoría de las células adoptaron las características propias de los astrocitos. El nivel de expresión de GFAP aumentó considerablemente, siendo detectada en prácticamente todas las células observadas. Por el contrario, la expresión de MAP2, elevada y ampliamente distribuida en condiciones de indiferenciación, sólo se observó en muy pocas células con escaso citoplasma.

La línea G07 exhibe, en condiciones de indiferenciación, un grado de heterogeneidad similar al de la línea G05. Sus células son pequeñas y poseen procesos celulares evidentes. Los niveles de expresión detectados, tanto de GFAP como de MAP2, son moderados. Notablemente, no suelen encontrarse células que expresen ambos marcadores, sugiriendo la coexistencia de al menos dos subpoblaciones celulares diferentes. Esta línea de CMPT luego de ser diferenciada mantuvo una apariencia heterogénea, en donde algunas células mostraron cierta morfología astrocitaria, algunas presentaron procesos celulares únicos y otras mantuvieron un aspecto indiferenciado. Los niveles de expresión de GFAP aumentaron de manera evidente, mientras que los de MAP2 no presentaron una variación clara respecto a lo observado en las células mantenidas en condiciones de indiferenciación. Sin embargo, tras la diferenciación fue posible

detectar un número importante de células que mostraron una co-expresión de estos marcadores (GFAP y MAP2), aunque las que mostraron una morfología semejante a la astrocitaria expresaron principalmente GFAP.

La línea G08 en condiciones de indiferenciación posee un grado de heterogeneidad moderado. De manera similar a lo descrito para la línea G07, es posible identificar fácilmente al menos dos subpoblaciones celulares diferentes. Una de ellas se encuentra representada por células de mayor tamaño que expresan altos niveles de GFAP; la otra está constituida por células pequeñas positivas para MAP2. Al igual que en la línea G07, no resulta frecuente observar células que co-expresen ambos marcadores. Luego de la diferenciación pudieron observarse cambios similares a los ocurridos en la línea G05. Prácticamente todas las células adoptaron una morfología claramente astrocitaria acompañada por una elevada expresión de GFAP, aunque los niveles de expresión de esta proteína en las células individuales no resultaron distinguibles de los observados en las células GFAP⁺ mantenidas en condiciones de indiferenciación. Otra similitud con la línea G05 consistió en que la expresión de MAP2, abundante y frecuente en condiciones de indiferenciación, sólo se detectó en muy pocas células diferenciadas, las cuales se caracterizaron por poseer un escaso citoplasma.

Finalmente la línea G09, de aspecto homogéneo, se encuentra constituida por células que expresan altos niveles de MAP2 y niveles prácticamente indetectables de GFAP. Tras la diferenciación, muchas células adoptaron una morfología astrocitaria con elevada expresión de GFAP, aunque los procesos celulares resultaron, en general, más cortos que los presentes en las líneas G05, G07 y G08. Llamativamente, en este caso pudo determinarse un mayor porcentaje de células pequeñas MAP2⁺ respecto a lo observado en el resto de las líneas de CMPT.

Estas observaciones ponen de manifiesto la enorme variabilidad, no sólo en los fenotipos de las distintas líneas de CMPT, sino también en los patrones de diferenciación exhibidos por cada una de ellas.

Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de PN a lo largo de la diferenciación astrogliol

Con el fin de evaluar la capacidad de los PN para diferenciarse hacia el linaje astrogliol sometimos a estos al mismo protocolo de diferenciación aplicado en las líneas de CMPT. Como se mencionó anteriormente, el perfil de expresión de los distintos marcadores analizados en los PN (Figuras 20 y 27), sugería que éstos poseían cierto grado de compromiso dentro del linaje neuronal. En concordancia con estos resultados, pese a haber sido diferenciadas con un protocolo de diferenciación astrogliol, estas células mostraron un claro fenotipo neuronal, tanto a nivel de expresión de marcadores de linaje como a nivel morfológico (nótese la intrincada organización celular generada a partir de largos procesos compatibles con axones). Sin embargo, también fue posible detectar en estas células cierto aumento en el grado de expresión de GFAP en relación al exhibido por los PN cultivados en condiciones de indiferenciación (Figura 31).

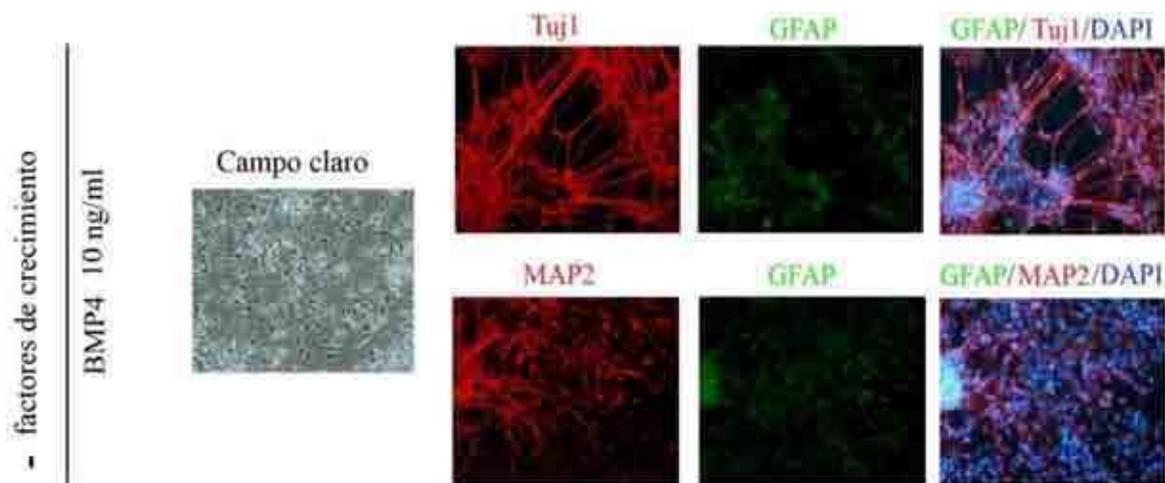


Figura 31. Fotomicrografías de fluorescencia de la línea de PN luego de 21 días de cultivo en presencia de BMP4 y ausencia de bFGF y EGF. Para la inmunomarcación fueron empleados anticuerpos primarios específicos para GFAP, Tuj-1 y MAP2 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Estos resultados avalan la idea de que estos progenitores, a diferencia de las CMPT, las cuales muestran un fenotipo preponderantemente astrocitario, tendrían una fuerte tendencia para diferenciarse hacia el linaje neuronal.

Niveles de expresión proteica de marcadores de CMN y CMT en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogial

Luego de haber observado cambios en la morfología celular y en la expresión de marcadores de linaje en distintas líneas de CMPT durante su diferenciación, decidimos evaluar qué ocurría en estas condiciones con la expresión de marcadores asociados al estado indiferenciado de estas células. Sorprendentemente, tras analizar la expresión de Nestina, Vimentina y CD44 mediante inmunofluorescencia, luego de 21 días de diferenciación observamos que todas las líneas de CMPT mantuvieron la expresión de estos marcadores en niveles comparables a los presentes en las células indiferenciadas (Figura 32).

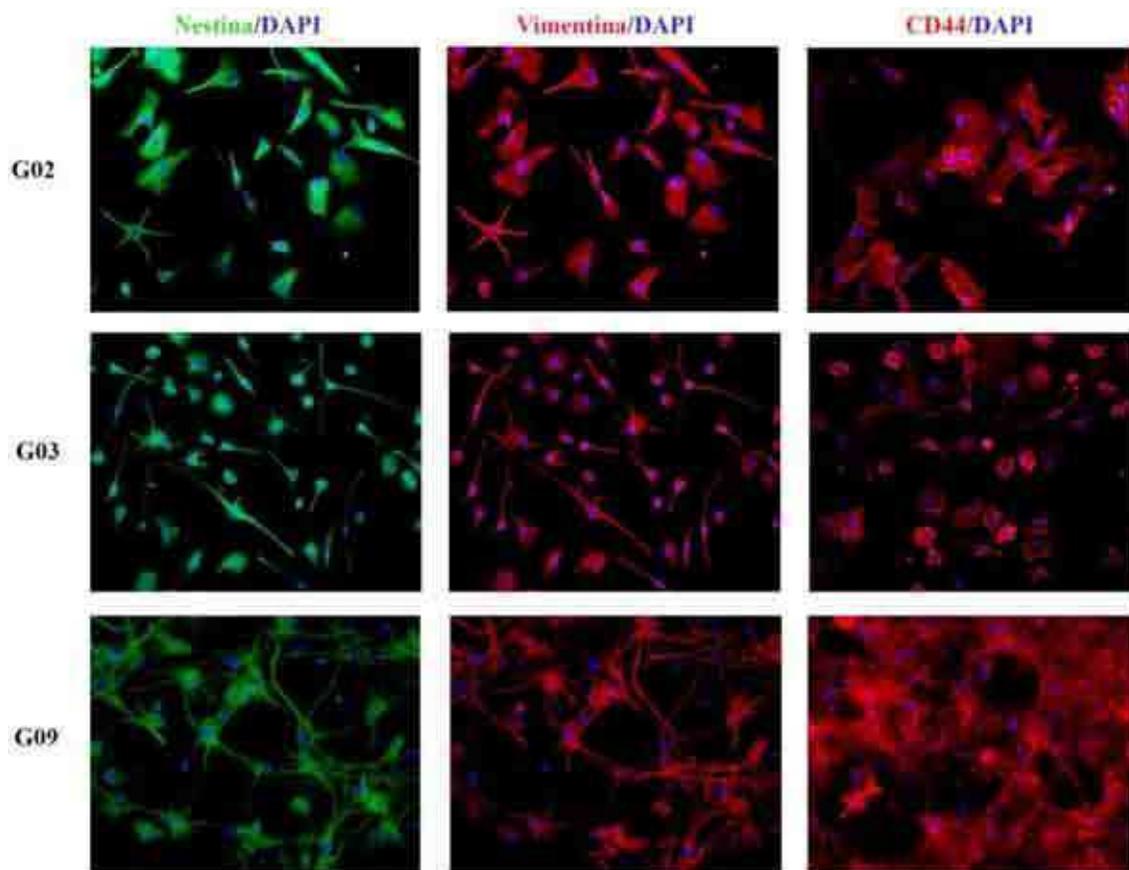


Figura 32. Fotomicrográficas de fluorescencia de las líneas de CMPT G02, G03 y G09, luego de 21 días de cultivo en presencia de BMP4 y ausencia de bFGF y EGF. Para la inmunomarcación fueron empleados anticuerpos primarios específicos para Nestina, Vimentina y CD44 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Previamente ha sido reportado que la expresión de algunos de estos marcadores depende de la actividad del EGFR (Kim S. 2011; Gao W. 2014). El hecho de que este receptor con frecuencia se encuentra activado constitutivamente en células de gliomas de alto grado podría explicar, al menos en parte, que en estas condiciones de diferenciación no se produzca un descenso de dichos marcadores. Por otra parte, mediante citometría de flujo evaluamos la expresión de CD133 a lo largo de la diferenciación de la línea G09. En este caso, a diferencia de los marcadores descritos anteriormente, fue posible detectar una significativa disminución de la expresión de esta proteína a lo largo de la diferenciación astrogial (Figura 33). Esta observación se encuentra en concordancia con resultados publicados con anterioridad (Piccirillo S. 2006).

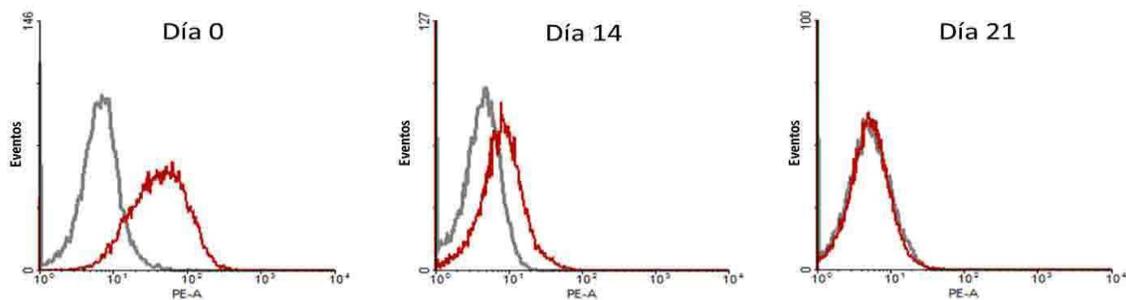


Figura 33. Histogramas representativos de los niveles de expresión proteica de CD133 en la línea G09 a lo largo de la diferenciación astrogial determinados por citometría de flujo empleando un anticuerpo primario específico anti-CD133 acoplado a PE (ficoeritrina).

Modulación de las vías de señalización mediadas por miembros de la familia BMP

Dado que la diferenciación celular observada en los experimentos anteriores ocurrió, no sólo debido a la remoción del bFGF y del EGF exógenos, sino también al agregado de BMP4 recombinante, decidimos realizar variantes del protocolo astrogial que nos permitieran evaluar los efectos individuales de cada estímulo diferenciante (condiciones 2 y 3 de la tabla 7). Para ello, analizamos los cambios en la morfología celular y en el grado de expresión de GFAP y de MAP2 luego de 21 días de cultivo en 4 condiciones experimentales diferentes, las cuales

son definidas en la tabla 7 y detalladas más adelante. Nótese que de las 4 condiciones mencionadas, 2 de ellas han sido descritas previamente. La condición 1 corresponde a la utilizada para propagar a las CMPT en un estado indiferenciado (empleando el medio de cultivo TSM) y la condición 4 coincide con el protocolo de diferenciación astroglial. Los cambios en la morfología celular y en la expresión de marcadores de linaje producidos en esta última condición han sido analizados con anterioridad en esta sección (Figura 30). Por lo tanto, sólo las condiciones 2 y 3 corresponden a variantes del protocolo astroglial.

Para este análisis hemos elegido las líneas de CMPT G08 y G09 dado que ambas fueron capaces de originar células con un claro fenotipo astroglial. Siempre que en el texto se mencione “presencia” o “ausencia” de algún factor (bFGF, EGF o BMP4) en el medio de cultivo se estará haciendo referencia a su forma recombinante (exógena).

CONDICIÓN	bFGF y EGF	BMP4
1	+	-
2	+	+
3	-	-
4	-	+

Tabla 7. Representación de 4 condiciones experimentales utilizadas para analizar la contribución de la presencia o ausencia de distintos factores solubles en la diferenciación de las CMPT. Los signos “+” y “-“ hacen referencia a la presencia o ausencia de los factores (**exógenos**) correspondientes en el medio de cultivo.

Comenzaremos detallando las condiciones experimentales 2 y 3 y los efectos a nivel celular producidos por cada una de ellas respecto a las condiciones en las que estas líneas de CMPT han sido propagadas en estado indiferenciado (condición 1). Luego de esto, con el objetivo de profundizar el rol de BMP4 en la diferenciación astroglial, describiremos los efectos generados por el agregado de Nogina (un antagonista de ciertos miembros de la familia BMP, incluido BMP4) dentro de cada una de las 4 condiciones experimentales mencionadas.

En la condición 2 (Figuras 34 y 35 en ausencia de Nogina recombinante) se agregó BMP4 (10ng/ml) al medio de cultivo manteniendo la presencia del bFGF y

del EGF. La adición de este morfógeno produjo, respecto a lo observado en condiciones de indiferenciación, una disminución en los niveles de expresión de MAP2, tanto en la línea G08 como en la línea G09, aunque esto no estuvo acompañado de cambios morfológicos importantes en ninguno de los dos casos. En la línea G09, se produjo además un claro aumento en el nivel de expresión de GFAP.

La condición 3 corresponde a la remoción del EGF y del bFGF (exógenos) del medio de cultivo (Figuras 34 y 35 en ausencia de Nogina recombinante). En esta oportunidad, las líneas G08 y G09 sufrieron importantes cambios en la morfología celular. Éstos, más profundos en la línea G08, fueron similares a los ocurridos en estas células luego de ser sometidas al protocolo de diferenciación astrogliar (adquisición de un aspecto típicamente astrocitario en la gran mayoría de las células). En esta condición también se observó un aumento en los niveles de expresión de GFAP en la línea G09. Por otra parte, similarmente a lo ocurrido con el protocolo de diferenciación astrogliar (Figura 30), en las dos líneas analizadas la expresión de MAP2 sólo fue detectada en unas pocas células que no exhibieron una morfología astrocitaria; aunque en esta condición, éstas resultaron ser más frecuentes. Además, en la línea G08 estas células mostraron una morfología con cierto aspecto neuronal. Es importante tener presente que, como se comentó anteriormente, en ambos casos la expresión de cada uno de estos marcadores se encontró asociada a una morfología particular (GFAP⁺ en células con fenotipo astrocitario y MAP2⁺ en células con cierto aspecto neuronal), mientras que sólo en muy pocas oportunidades pudieron detectarse células que coexpresen ambas proteínas.

➤ *Efectos generados por el agregado de Nogina recombinante al medio de cultivo*

Habiendo descripto tanto la morfología celular como la expresión de ciertos marcadores de linaje en las 4 condiciones experimentales mencionadas en la tabla 7, a continuación describiremos los efectos del agregado de Nogina en cada una de ellas (Figuras 34 y 35). Es importante considerar que la presencia de Nogina recombinante (250ng/ml) permite bloquear, no sólo la acción de BMP4 exógena,

sino también la de otros miembros de la familia BMP que puedan estar siendo secretados por las células (BMP 2, 4, 5, 6 y 7 endógenos entre otros).

En las condiciones que mantienen el estado indiferenciado de las CMPT (condición 1) pudimos determinar, tanto en la línea G08 como en la línea G09, que el agregado de Nogina produjo un aumento de la expresión de MAP2 sin que se generen cambios notorios en la morfología celular. En la línea G09 pudo observarse además un descenso en los niveles de GFAP.

El agregado de Nogina en la condición 2 produjo, en ambas líneas, no sólo un aumento en la expresión de MAP2, sino también una disminución de los niveles de expresión de GFAP. Sin embargo, al igual que en la condición 1, en este caso no se observaron cambios importantes en la morfología celular de estas líneas.

La presencia de Nogina en la condición 3 produjo efectos notables en las dos líneas de CMPT analizadas. En primer lugar impidió, de manera parcial, que en ausencia de bFGF y EGF las células GFAP⁺ adquirieran las características típicas presentes en los astrocitos (nótese la disminución de los niveles de expresión de GFAP y la ausencia de procesos celulares bien definidos). Por otra parte, pudo observarse un aumento en el porcentaje de las células MAP2⁺, las cuales en la línea G09 adoptaron además cierto aspecto neuronal, similar al descrito previamente para la línea G08 (en la condición 3 en ausencia de Nogina). Es importante advertir que los cambios producidos por Nogina en esta condición (ausencia de BMP4 exógeno), sugieren la posibilidad de que la remoción del bFGF y del EGF del medio de cultivo conlleve a la desrepresión de las vías de señalización mediadas por BMP (endógenas).

Finalmente en la condición 4 (protocolo astroglial), tras el agregado de Nogina se observaron cambios similares a los mencionados para la condición 3, aunque en este caso, éstos fueron aún más evidentes. Esto se debe a que en esta situación se comparan 2 condiciones opuestas. En ausencia de Nogina (y de bFGF y EGF) el BMP4 recombinante conlleva a que estas células se comprometan en la diferenciación astroglial; en cambio, en presencia de Nogina, el bloqueo de las acciones del BMP4 exógeno y de las posibles BMP endógenas impide dicho compromiso y favorece la adquisición de características neuronales.

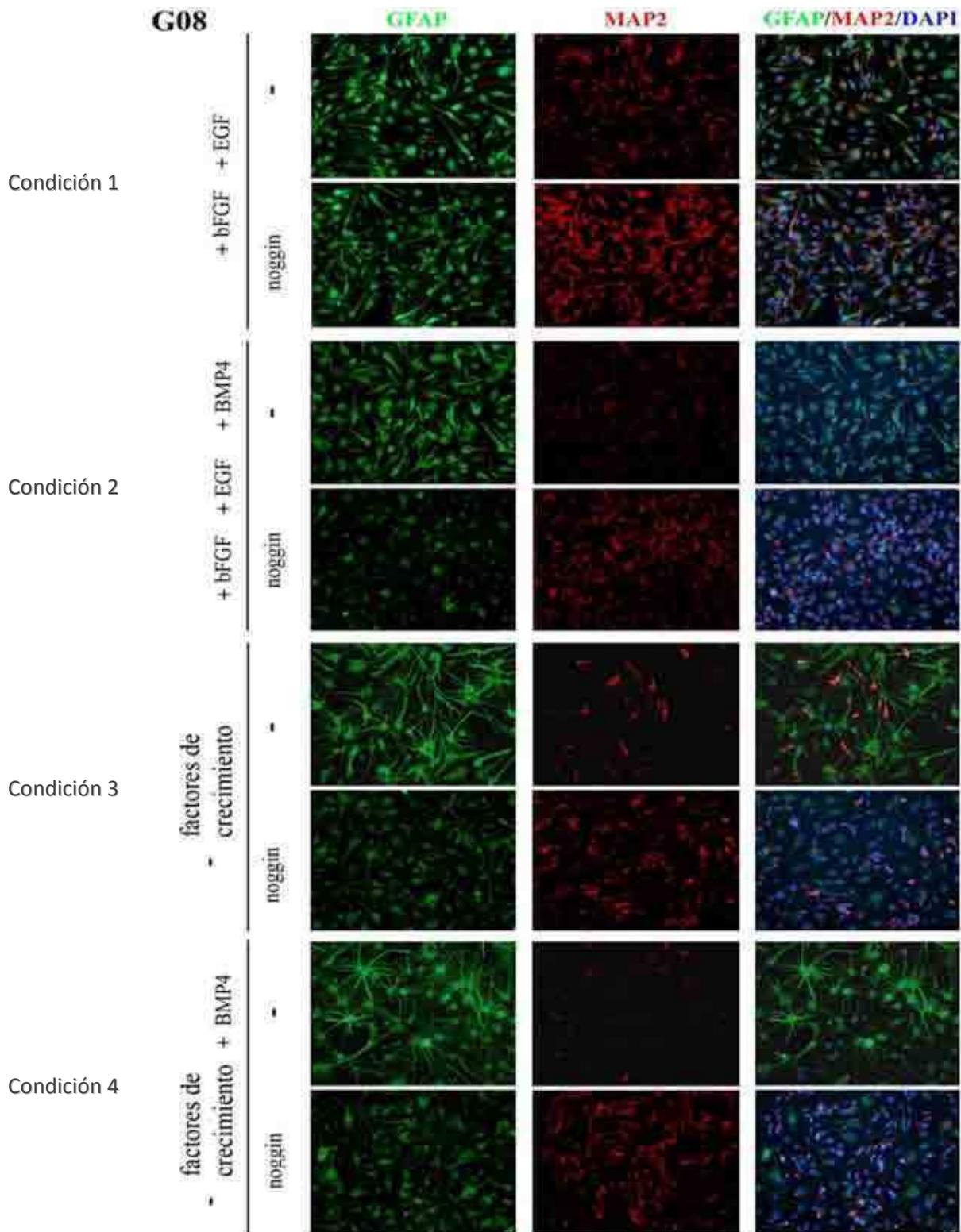


Figura 34. Fotomicrografías de fluorescencia de la línea de CMPT **G08** luego de 21 días de cultivo en tanto en condiciones de indiferenciación (1) como en tres condiciones diferentes de diferenciación (2, 3 y 4); cada una de ellas en presencia o ausencia de Nogina (*Noggin*). Para la inmunomarcación fueron empleados anticuerpos primarios específicos para GFAP y MAP2 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

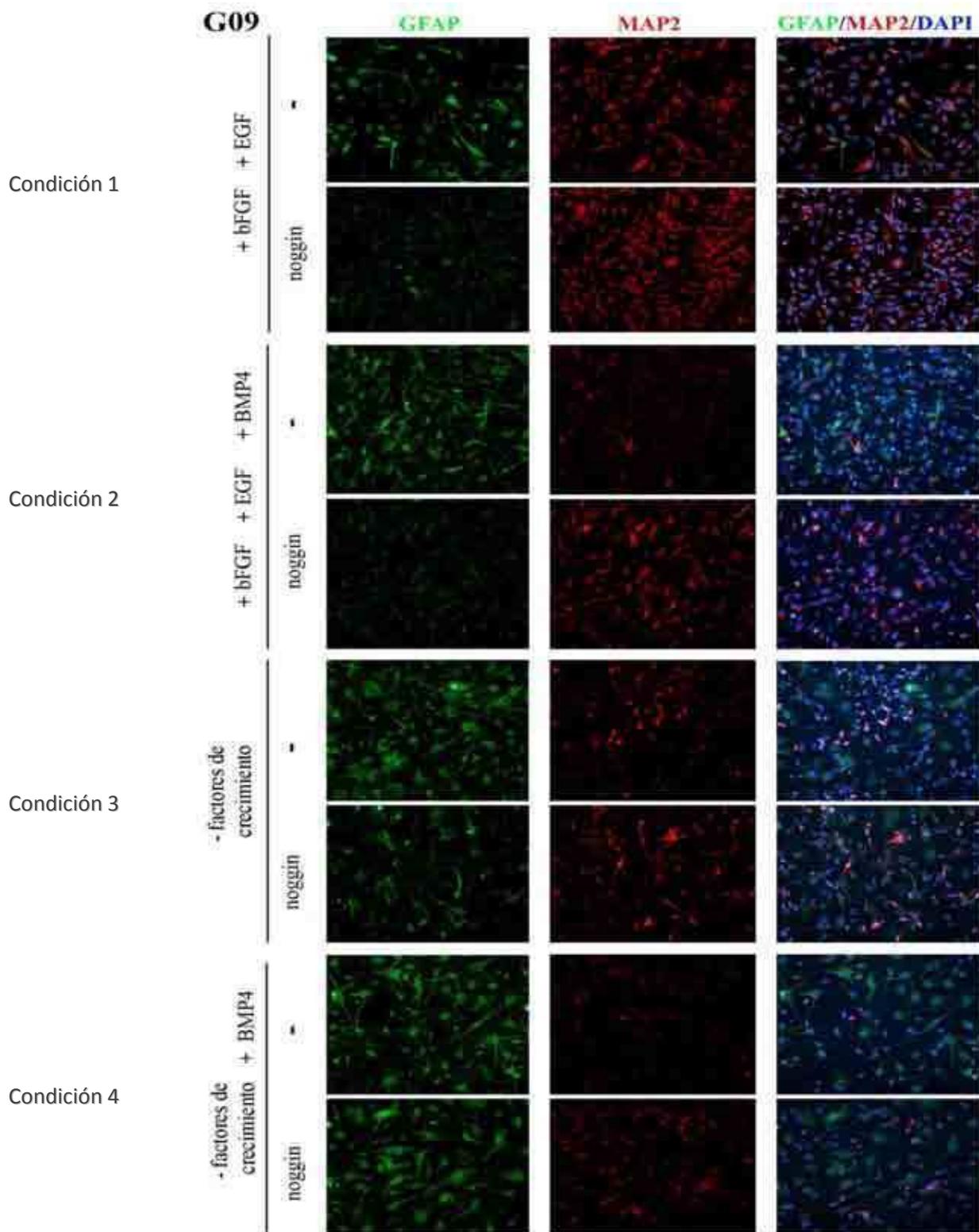


Figura 35. Fotomicrografías de fluorescencia de la línea de CMPT **G09** luego de 21 días de cultivo en tanto en condiciones de indiferenciación (1) como en tres condiciones diferentes de diferenciación (2, 3 y 4); cada una de ellas en presencia o ausencia de Nogina (*Noggin*). Para la inmunomarcación fueron empleados anticuerpos primarios específicos para GFAP y MAP2 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

En términos generales es posible concluir que tanto el agregado de BMP4 recombinante como la remoción del bFGF y del EGF del medio de cultivo favorecen *per se* la diferenciación astrogial (condiciones 2 y 3). Si bien el agregado de BMP4 al medio de cultivo en presencia de bFGF y EGF (condición 2) induce la expresión de GFAP y reprime la de MAP2, es la ausencia del EGF y del bFGF (condición 3) lo que permite que las células adopten características astrocitarias claras. En este último caso, no sólo se observa un aumento de la expresión de GFAP y una disminución de la de MAP2, sino que además la mayoría de las células adoptan una morfología típicamente astrogial. Sin embargo, si a la ausencia del EGF y del bFGF se agrega la presencia exógena de BMP4, la adquisición del fenotipo astrocitario se hace aún más evidente; en otras palabras, la presencia del bFGF y del EGF interfiere en la diferenciación astrogial dirigida por BMP4. Este antagonismo entre las vías del bFGF y EGF y las de BMP4 ha sido descrito con anterioridad en otros tipos celulares (Bond A. 2011). Por otra parte, el efecto de Nogina en las 4 condiciones ensayadas consistió por un lado en impedir parcialmente la diferenciación astrogial (mediante la disminución en la expresión de GFAP y la suspensión de ciertos cambios morfológicos), y por el otro, en favorecer la adquisición de ciertas características neuronales en algunas células (mediante el aumento de la frecuencia de células MAP2⁺ y la adquisición de un aspecto neuronal por parte de éstas).

Esta plasticidad en el destino celular de las CMPT de gliomas durante la diferenciación permite sugerir que las señales presentes en el nicho de los gliomas podrían ser capaces de determinar, al menos parcialmente, las características fenotípicas del tumor, contribuyendo así a la heterogeneidad observada en estos tipos de cáncer.

Cambios de la expresión proteica de marcadores de linaje y de la morfología celular de CMPT y de PN a lo largo de la diferenciación neuronal

Debido a que pudimos observar la adquisición de características típicamente neuronales en células que fueron expuestas a distintos entornos diferenciadores, decidimos analizar cuáles serían las consecuencias de someter a

las mismas seis líneas de CMPT empleadas anteriormente y a los PN a condiciones que favorezcan la diferenciación hacia el linaje neuronal. Para ello utilizamos un protocolo de diferenciación descrito originalmente para obtener neuronas a partir de PN derivados de CMEH (Zhang X. 2010). Éste consiste, en términos generales, en mantener a las células en un medio sin bFGF y EGF durante 10 días en suspensión, permitiendo que éstas formen NE. Luego de este período, las NE resultantes son adheridas en placas pre-tratadas con laminina y cultivadas por 11 días más, también en ausencia de bFGF y EGF. Es importante advertir que si bien luego de la adhesión de las NE la mayoría de las células son capaces de migrar y formar una monocapa, para el final del protocolo aún se observan NE remanentes. Por este motivo en algunas fotomicrografías de la figura 36 es posible observar NE circundadas por células dispuestas en monocapa.

De manera similar a lo observado tras la diferenciación astrogial, luego de emplear este protocolo pudo determinarse que cada una de estas líneas de CMPT sufrió cambios fenotípicos particulares; sin embargo, en todos los casos pudo advertirse un mayor componente neuronal (definido por morfología celular o por expresión de marcadores de linaje). De hecho, en estas condiciones pudieron detectarse, en distintas líneas de CMPT, células con fenotipo neuronal que mostraron un mayor nivel de expresión de Tuj-1 respecto al observado en células indiferenciadas o en células diferenciadas mediante el protocolo astrogial. En base a esto último, cabe aclarar que si bien hemos determinado que los niveles bajos o moderados de expresión de Tuj-1 no resultan ser específicos del linaje neuronal en estas líneas de CMPT, su expresión elevada sí parece estar asociada a células de dicho linaje. A continuación se describen los aspectos más sobresalientes observados en cada una de las diferentes líneas de CMPT luego de ser diferenciadas mediante este protocolo de diferenciación neuronal (Figura 36).

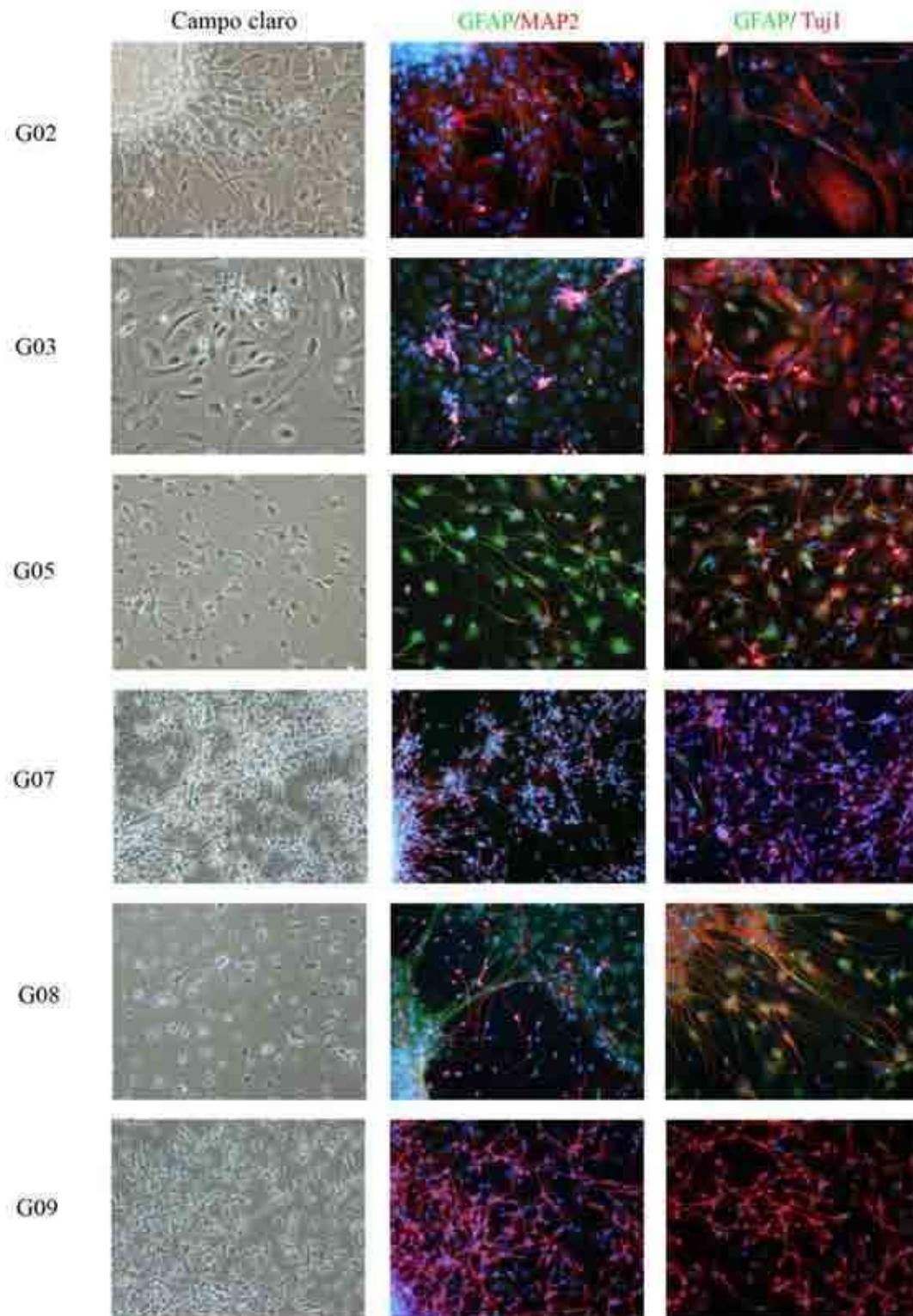


Figura 36. Fotomicrográficas de contraste de fases y de fluorescencia representativas de las líneas de CMPT G02, G03, G05, G07, G08 y G09 luego de ser sometidas 21 días a un protocolo de diferenciación neuronal. Las inmunomarcaciones fueron realizadas empleando anticuerpos primarios específicos para GFAP, MAP2 y Tuj-1 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

En las líneas G02 y G03, de manera equivalente a lo ocurrido tras la diferenciación astrogliol, no se advirtieron poblaciones celulares homogéneas; sin embargo, en ambos casos pudo detectarse un mayor número de células MAP2⁺, algunas de las cuales presentaron además ciertas características morfológicas típicas de neuronas (somas pequeños con largos y delgados procesos celulares). En el caso de la línea G05, contrariamente a lo esperado, la mayoría de las células presentó una morfología astrocitaria y resultaron positivas para GFAP. Por su parte, la expresión de MAP2 fue detectada sólo en unas pocas células aisladas que mostraron un aspecto típicamente neuronal. En la línea G07, en cambio, prácticamente todas las células adoptaron un marcado fenotipo neuronal, mostrando somas pequeños y refringentes con largas prolongaciones celulares. A excepción de unas pocas células que expresaron bajos niveles de GFAP, el resto mostró niveles de expresión elevados de MAP2 y de Tuj-1. En cuanto a la línea G08, resultó notable observar la coexistencia de dos poblaciones claramente definidas; una de ellas conformada por células GFAP⁺ que exhibieron una morfología astrogliol y otra, constituida por células MAP2⁺ con un evidente aspecto neuronal. Finalmente, en la línea G09, al igual que en la línea G07, pudo observarse una mayoría de células con morfología neuronal y elevados niveles de expresión de MAP2 y Tuj-1. Sin embargo, en este caso fue posible detectar una mayor proporción de células con características astrocitarias respecto a la observada en la línea G07.

De acuerdo con lo esperado, los PN, tras ser diferenciados con este protocolo, sólo dieron lugar a células con un evidente fenotipo neuronal, tanto a nivel morfológico como a nivel de expresión de marcadores de linaje (Figura 37). Llamativamente, tanto el largo de los procesos celulares como la organización de éstos resultaron ser mucho mayores respecto a lo observado en las líneas de CMPT. Este resultado, junto con los anteriores (Figuras 20, 27 y 31), apoya fuertemente la idea de que estos PN muestran un marcado compromiso con el linaje neuronal.

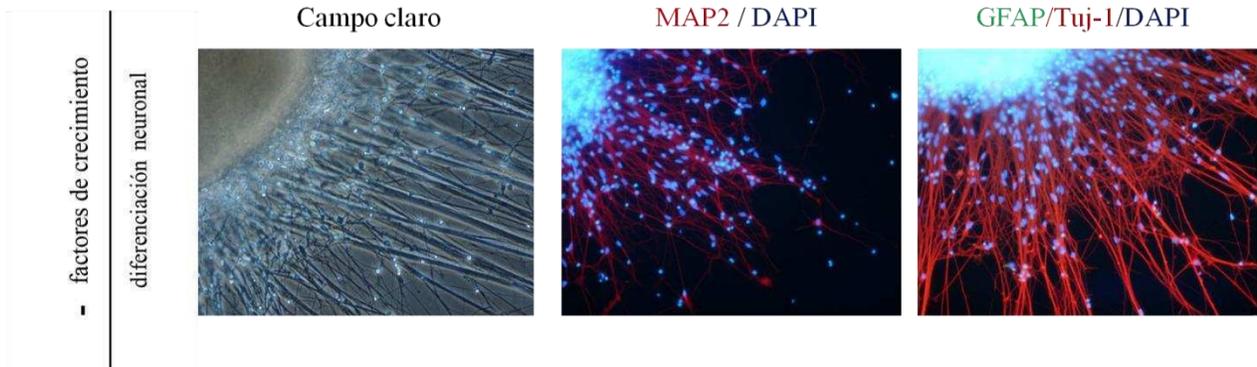


Figura 37. Fotomicrografías de fluorescencia de la línea de PN luego de ser sometida a un protocolo de diferenciación neuronal. Para la inmunomarcación fueron empleados anticuerpos primarios específicos para GFAP, Tuj-1 y MAP2 (magnificación 200x). Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

Como se mencionó anteriormente, en las seis líneas de CMPT fue posible apreciar un elevado grado de variabilidad en cuanto a la capacidad de cada una de ellas para dar origen a células con características neuronales. El hecho de que cada una de estas líneas de CMPT pueda tener un origen celular diferente podría explicar parcialmente este fenómeno. Además, dado que luego de la diferenciación neuronal, los PN fueron capaces de dar origen a poblaciones mucho más homogéneas y organizadas que las generadas por las líneas de CMPT, la naturaleza tumoral de estas últimas podría ser también un factor a tener en cuenta en la existencia de dicha variabilidad.

Los resultados obtenidos, tanto luego de la diferenciación astrogial como de la diferenciación neuronal, nos permiten concluir que si bien estas líneas de CMPT exhiben cierta capacidad para diferenciarse, el grado de eficiencia de este proceso y la capacidad para comprometerse a un linaje en particular varía dramáticamente entre ellas.

Multipotencia de las distintas líneas de CMPT y de los PN

En la Introducción se ha mencionado que si bien la multipotencia es una propiedad que suele estar asociada a las CMT, ésta no debe ser considerada una característica fundamental que defina a dichas células. Para analizar la multipotencia de las distintas líneas de CMPT, resulta conveniente primero realizar

algunas consideraciones relacionadas a esta propiedad. En primer lugar, es importante tener presente que aunque se utilice un protocolo específico para inducir la diferenciación hacia un tipo celular en particular, en la mayoría de los casos, las poblaciones diferenciadas contendrán una combinación de células de distintos linajes. En otras palabras, los protocolos de diferenciación *in vitro* disponibles actualmente difícilmente permiten obtener cultivos puros de un único linaje, incluso en CMN normales y en CMEH (Sun Y. 2008; Zhang X. 2010). En CMT la eficiencia lograda por estos protocolos suele ser baja ya que como se comentó con anterioridad, las células tumorales frecuentemente muestran algún tipo de alteración en las vías que controlan la diferenciación (Pollard S. 2009). Además, para un tipo de célula madre o progenitora determinada, cada protocolo de diferenciación tendrá asociado cierto grado de eficiencia en la diferenciación hacia un linaje en particular (por ejemplo, en estos casos, los protocolos basados en el uso de SFB suelen mostrar eficiencias muy bajas). En segundo lugar, es importante tener en cuenta que a la hora de asignar la propiedad de multipotencia a una población celular definida por algún criterio (por ejemplo expresión de determinados marcadores de superficie), deberá comprobarse mediante diluciones límite, que las células individualizadas de dicha población puedan generar una progenie que a su vez sea capaz de originar células de distintos linajes. Si esto no es verificado, existirá la posibilidad de que la población en cuestión esté conformada en realidad por diferentes subpoblaciones celulares, en donde cada una de ellas podría tener una capacidad de diferenciación distinta. Teniendo esto en mente es posible, en base a los resultados obtenidos luego de inducir la diferenciación de las líneas de CMPT mediante el uso de distintos protocolos, clasificar a éstas en base a su capacidad para originar células con fenotipos astrogliar y/o neuronal. En este caso el término multipotencia está asociado a las líneas celulares y no a las células individuales (Tabla 8).

En conclusión, luego de caracterizar la capacidad de diferenciación de distintas líneas de CMPT, fue posible demostrar que éstas, pese a su naturaleza tumoral, conservan cierta capacidad para responder a diferentes estímulos diferenciadores.

	Fenotipo astrocitario (protocolo astrogliar)	Fenotipo neuronal (protocolo neuronal)	Multipotencia observada de la línea celular
G02	+	+	Baja
G03	+	+	Baja
G05	+++	+	Baja
G07	++	+++	Alta
G08	+++	++	Alta
G09	++	+++	Alta
PN	-	+++	Nula

Tabla 8. Grado de diferenciación alcanzado en cada uno de los protocolos ensayados.

Proliferación de CMPT en distintas condiciones *in vitro*

Para analizar el índice de proliferación de las líneas de CMPT determinamos, mediante inmunofluorescencia, el porcentaje de núcleos positivos para el antígeno nuclear Ki67. Debido a que el Servicio de Neuropatología de nuestra institución evalúa el “índice cinético” (o índice de proliferación) de cada tumor diagnosticado de manera sistemática mediante la misma metodología, decidimos en primera instancia, evaluar si existía una correspondencia entre el grado de proliferación de los tumores y el de las respectivas líneas de CMPT cuando éstas son mantenidas en condiciones de indiferenciación. Sorprendentemente, encontramos que en todos los casos, a excepción de un tumor y su respectiva línea de CMPT (G03), existió una muy buena correlación entre ambos índices de proliferación (Figura 38 A). Este resultado sugiere que las poblaciones celulares establecidas *in vitro* serían, al menos en lo referente a la proliferación, representativas del tumor original.

Por otra parte, luego de diferenciar a estas líneas de CMPT mediante el protocolo la diferenciación astrogliar, pudimos determinar que en todos los casos se produjo un marcado descenso en el porcentaje de núcleos positivos para Ki67; sin embargo, el grado de disminución observado no fue el mismo en todas las líneas de CMPT analizadas (Figura 38 B y tabla 9). Es interesante remarcar que para cada línea de CMPT, un mayor grado de proliferación en condiciones de indiferenciación correlacionó con un mayor descenso en la tasa de proliferación al finalizar el protocolo de diferenciación astrogliar (Tabla 9).

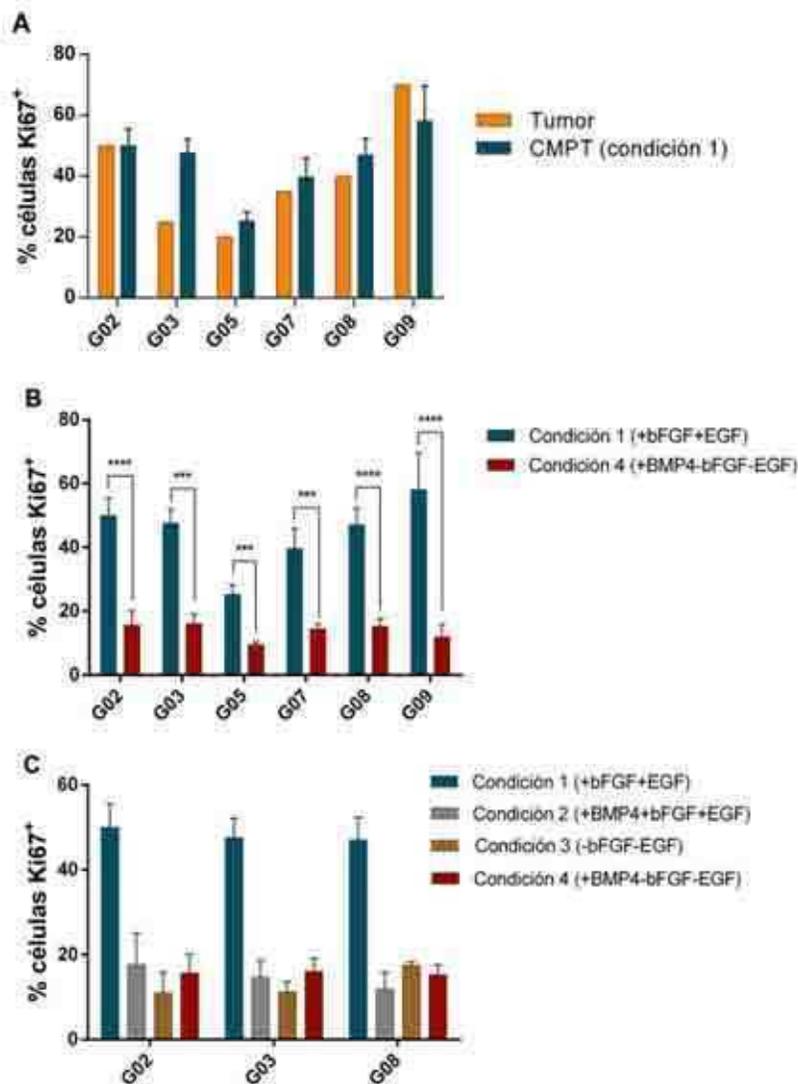


Figura 38. Porcentaje de células positivas para el antígeno nuclear Ki67 determinado mediante inmunofluorescencia en diferentes líneas de CMPT. **A.** Comparación entre los índices cinéticos del tumor y de las líneas de CMPT respectivas. **B.** Efecto de la diferenciación astrogliar en la proliferación de CMPT. **C.** Efecto de distintas condiciones diferenciadoras sobre la proliferación de tres líneas de CMPT. ***p < 0.001; ****p < 0.0001

Línea de CMPT	% Ki67+ en CMPT indiferenciadas (A)	% Ki67+ en CMPT diferenciadas (B)	Descenso de la proliferación (veces) (A/B)
G05	25,26±3,00	9,52±1,00	2,7
G07	39,65±6,26	14,46±1,49	2,7
G08	47,00±5,38	15,27±2,28	3,1
G03	47,59±4,54	16,00±3,07	3,0
G02	49,09±5,51	15,64±4,49	3,2
G09	58,05±11,58	11,96±3,92	4,8

Tabla 9. Porcentajes de núcleos positivos para el antígeno nuclear Ki67 correspondientes a la figura 38 B. (A): condiciones de indiferenciación. (B): condiciones de diferenciación astrogliar. (A/B): cociente entre las medias obtenidas en cada una de dichas condiciones. Se indican las medias ± D.S. de tres experimentos independientes.

Como se mencionó anteriormente, el protocolo de diferenciación astrogliar se basa tanto en la remoción del bFGF y del EGF (exógenos) como en el agregado de BMP4 recombinante. Por lo tanto, para evaluar separadamente los efectos de cada uno de estos estímulos diferenciadores sobre la proliferación de las líneas de CMPT, decidimos determinar el grado de proliferación de 3 líneas de CMPT (G02, G03 y G08) luego de que sean expuestas a cada uno de dichos estímulos durante 21 días. Nótese que estos tratamientos corresponden a las condiciones 2 y 3 descritas en la tabla 7. Como se observa en la figura 38 C, la disminución de la proliferación producida tanto por el agregado de BMP4, como por la remoción del bFGF y del EGF, fue similar a la observada luego de que estas líneas fueran diferenciadas mediante el protocolo astrogliar. Estos resultados sugieren que el agregado del BMP4 exógeno podría interferir con la señalización, mediada por el bFGF y por el EGF, responsable de mantener la proliferación de estas células, lo cual explicaría la falta de sinergismo entre el agregado de BMP4 y la remoción del bFGF y del EGF en la disminución de la proliferación.

Niveles de expresión del ARNm de factores involucrados en la señalización mediada por miembros de la familia BMP en CMPT y PN

Dado que cada una de las líneas de CMPT mostró un patrón de diferenciación particular, tanto a nivel de la morfología celular como de la expresión de marcadores de linaje, decidimos evaluar si estas diferencias podían ser atribuidas, al menos en parte, a los niveles de expresión génica de ciertas proteínas involucradas en la vía de señalización que controlan la diferenciación de CMN y de CMT de glioma (Lee J. 2008). Para ello, realizamos un análisis por RT-PCR en tiempo real de dos ligandos de la familia BMP (BMP2 y BMP4), de sus receptores (BMPR1A, BMPR1B y BMPR2) y de Nogina. Estas determinaciones fueron realizadas en condiciones de cultivo que favorecen la propagación de estas células y el mantenimiento de su fenotipo indiferenciado. Los FH fueron utilizados nuevamente como una referencia no relacionada al sistema nervioso.

Como se observa en la figura 39, los niveles de expresión relativos de los ARNm, tanto de BMP2 como de BMP4, resultaron ser mayores en G02 y G03 que en el resto de las líneas de CMPT. Sin embargo, en el caso de G07 se observó un nivel de expresión intermedio del transcripto de BMP2. Además, mientras que los niveles de expresión del ARNm de BMP2 resultaron ser menores en FH y PN que en la mayoría de las líneas de CMPT, en el caso de BMP4 se observó lo contrario. En relación a los transcriptos de BMPR1A pudimos determinar que los niveles de expresión fueron similares en todos los tipos celulares analizados, a excepción de los PN, los cuales mostraron mayores niveles de este ARNm. Por el contrario, la abundancia relativa de los transcriptos de BMPR1B y BMPR2 fue variable entre líneas, siendo las diferencias aun más evidentes para el caso de BMPR1B. Finalmente, los niveles de expresión del ARNm de Nogina resultaron mayores en G02 y G07 que en el resto de las líneas de CMPT analizadas.

Llamativamente, encontramos una correlación inversa entre los niveles de expresión del ARNm de los ligandos (BMP2 y BMP4) y del BMPR1B. En este sentido, las líneas G02, G03 y en menor medida G07, exhibieron los mayores niveles de expresión de los transcriptos de BMP2 y de BMP4 y los menores niveles de BMPR1B. Por el contrario, las líneas G05, G08 y G09 mostraron una baja expresión de los ARNm de los mencionados ligandos y una elevada expresión del transcripto de BMPR1B. Este último perfil de expresión estuvo asociado con una mayor capacidad para adquirir un fenotipo astrocitario, dado que las líneas G05, G08 y G07 fueron las que presentaron, luego de la diferenciación astrogial, una morfología estrellada con múltiples prolongaciones ramificadas (GFAP⁺/MAP2⁻) (Figuras 29 y 30). Más aún, los elevados niveles de BMPR1B desplegados particularmente por la línea G05 con respecto al resto de las líneas analizadas podrían explicar, al menos en parte, el fenotipo exhibido (GFAP⁺) por la misma cuando se la sometió al protocolo de diferenciación neuronal. Por otra parte, observamos que dos de las tres líneas de CMPT que presentaron niveles de expresión elevados de los transcriptos de BMP2 o de BMP4 (G02 y G07), también exhibieron niveles elevados del ARNm de Nogina.

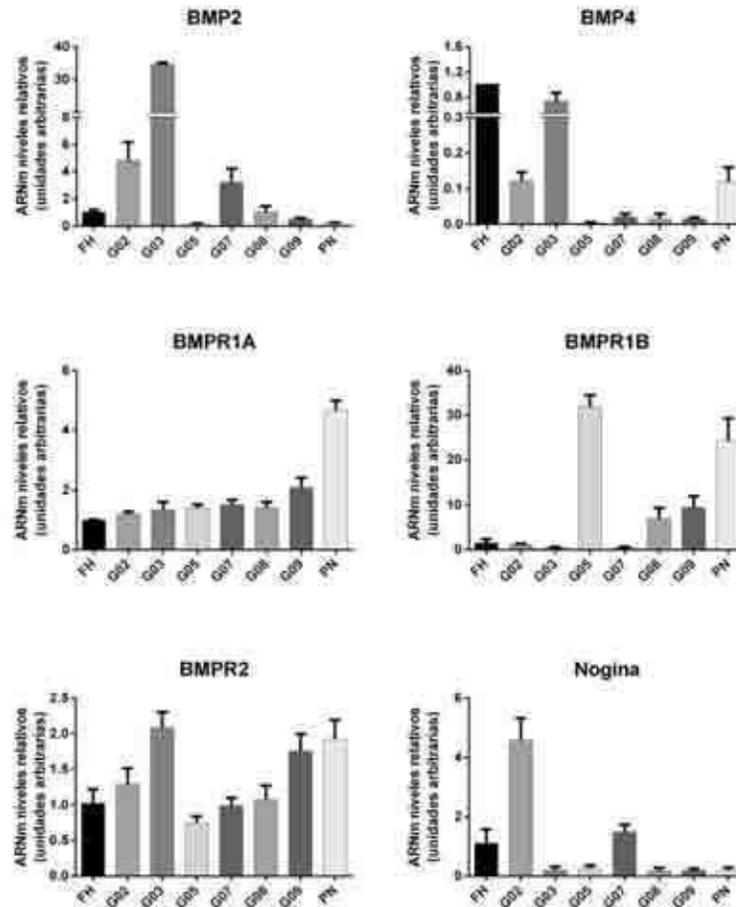


Figura 39. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para BMP2, BMP4, Nogina, BMPR1A, BMPR1B y BMPR2. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión de FH, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes.

Teniendo en cuenta que la señalización del receptor BMPR1B promueve la diferenciación astroglial en distintos tipos celulares del SNC (Lee J. 2008; Bond A. 2011), una posible explicación para la asociación descrita en el párrafo anterior, podría consistir en que los niveles de expresión elevados de BMPR1B (en las líneas G05, G08 y G09), y por ende la actividad de éste, conlleve a la represión de la expresión de ligandos mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. Este mecanismo hipotético posibilitaría que las CMPT mantengan inactiva la señalización mediada por BMPR1B cuando son mantenidas en condiciones de indiferenciación, permitiendo la conservación de su capacidad de auto-renovación.

Por el contrario, los bajos niveles de expresión del receptor BMPR1B en las líneas G02, G03 y G09 permitirían mantener el fenotipo indiferenciado, aun en presencia de niveles elevados de BMP2 y BMP4 (endógenos). Además, la elevada expresión de Nogina detectada en las líneas G02 y G07 bloquearía los posibles efectos diferenciadores de dichos ligandos endógenos (Figura 39).

Por último, es importante destacar que si bien los niveles de expresión de BMPR1B mostraron una buena correlación con la capacidad de diferenciación astrogliar en las distintas líneas de CMPT analizadas, dichos niveles de expresión no guardaron relación con la magnitud del descenso en el índice de proliferación de estas células luego de haber sido expuestas al protocolo de diferenciación astrogliar (Tabla 10).

Con respecto a los PN, resulta interesante mencionar que los niveles de expresión del ARNm de BMPR1A observados en estas células resultaron ser significativamente mayores a los observados en las líneas de CMPT (Figura 39). Este resultado sugiere que la diferenciación neuronal observada luego de cultivar a estas células con BMP4 recombinante, podría estar dirigida por este receptor.

Línea de CMPT	Descenso de la proliferación (veces)	Niveles de expresión relativos de los transcritos de BMPR1B
G05	2,7	+++
G07	2,7	+
G08	3,1	++
G03	3,0	+
G02	3,2	+
G09	4,8	++

Tabla 10. Relación entre el descenso de la proliferación luego de la diferenciación astrogliar y los niveles de expresión relativos de los transcritos de BMPR1B.

Niveles de expresión del ARNm de factores involucrados en la señalización mediada por miembros de la familia BMP en distintas condiciones de cultivo que promueven la diferenciación de las líneas de CMPT

Con el fin de determinar en forma individual los efectos del agregado de BMP4 recombinante y de la remoción del bFGF y del EGF del medio de cultivo en

la expresión de los transcritos analizados en la sección anterior, expusimos a las líneas G08 y G09 durante 14 días a las 4 condiciones experimentales mencionadas en la tabla 7. Como se observa en las figuras 40 y 41, en ciertas condiciones, tanto en la línea G08 como en la línea G09, pudimos detectar cambios significativos de los niveles de expresión de los transcritos de BMPR1A y BMPR2 respecto a los observados en las condiciones de indiferenciación (condición 1). Sin embargo, la mayor variación ocurrió en los niveles de expresión de los ARNm de BMP2, BMP4, BMPR1B y de Nogina. Nótese que éstos representan los principales mediadores de la diferenciación astrogial en este tipo de células (Piccirillo S. 2006; Lee J. 2008). A continuación se detallarán los efectos de cada condición diferenciante (2, 3 y 4) sobre la expresión de dichos transcritos con respecto a lo observado en las condiciones de indiferenciación (condición 1).

En la condición 2 (agregado de BMP4 recombinante en presencia de bFGF y de EGF) fue posible determinar, en ambas líneas de CMPT, un marcado descenso en los niveles de expresión del receptor BMPR1B (Figuras 40 y 41). En la línea G09 también pudo observarse un descenso significativo de los transcritos de BMP2 y de BMP4 (Figura 41). Contrariamente, en esta condición, los niveles de los transcritos de BMPR1A, BMPR2 y Nogina aumentaron significativamente en todos los casos analizados. Nótese que en el caso de Nogina, dicho aumento fue considerable (entre aproximadamente 40 y 100 veces) (Figuras 40 y 41). En términos generales, el agregado de BMP4 en presencia de bFGF y EGF produce, dentro de este sistema, una disminución de la expresión de los componentes involucrados en la diferenciación astrogial (BMP2, BMP4 y BMPR1B) y un aumento considerable de los niveles de expresión de Nogina, un antagonista de esta vía. Estos cambios son compatibles con la manifestación de un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta al agregado de BMP4.

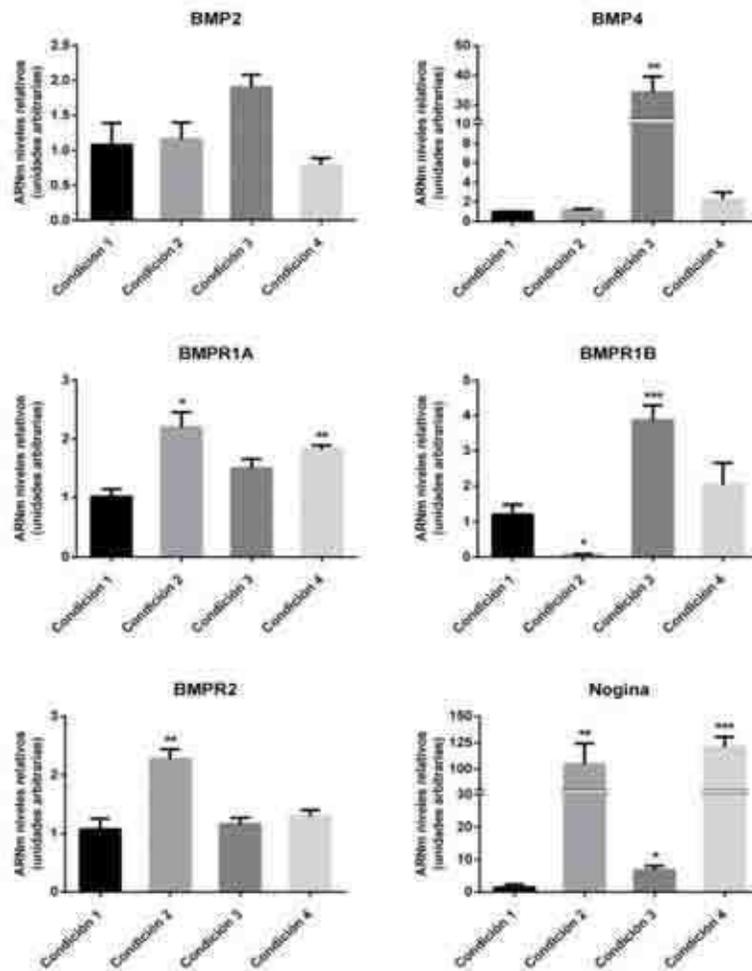


Figura 40. Ensayos de RT-PCR en tiempo real en la línea de CMPT **G08** utilizando *primers* específicos para BMP2, BMP4, Nogina, BMPR1A, BMPR1B y BMPR2. Las distintas condiciones fueron definidas en la tabla 7. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a los niveles de expresión de la condición 1, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En la condición 3 (ausencia de BMP4, bFGF y EGF exógenos) pudimos observar, en la mayoría de los transcritos analizados, una respuesta opuesta a la ocurrida en la condición 2. En ambas líneas de CMPT se detectaron aumentos significativos de los niveles de expresión, tanto de los ligandos analizados (BMP2 y BMP4) como de del receptor BMPR1B. Además, en este caso no fue posible observar un aumento significativo de los niveles de expresión de los transcritos de BMPR1A y de BMPR2. Por el contrario, al igual que lo ocurrido en la condición 2, los niveles de expresión de Nogina aumentaron significativamente en ambas

líneas (Figuras 40 y 41). Los resultados obtenidos en esta condición, en concordancia con lo observado en resultados anteriores (Figuras 34, 35 y 38 C), sugieren que la remoción del bFGF y del EGF exógenos del medio de cultivo permitiría la desrepresión de los componentes de las vías de señalización mediadas por BMP implicados en la diferenciación astrogial de estas células (BMP2, BMP4 y BMPR1B). El aumento en los niveles de expresión de Nogina, en las condiciones 2 y 3, podría corresponder a un mecanismo de retroalimentación negativa en respuesta a la activación de las vías dependientes de BMP. Este mecanismo ha sido descrito en distintos tipos celulares (Ito H. 1999).

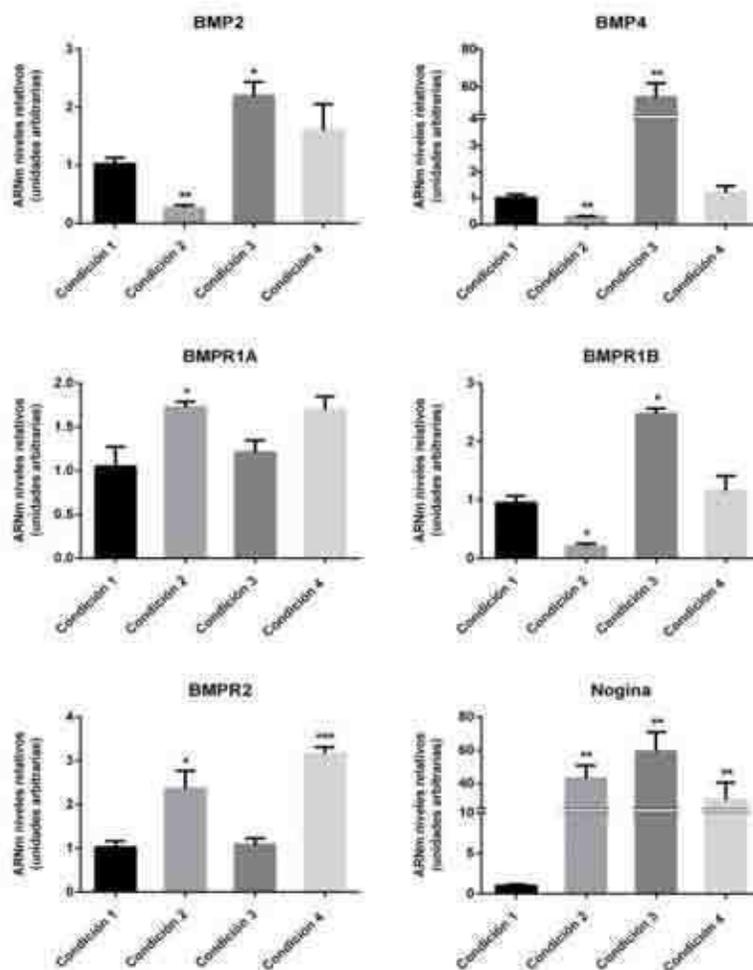


Figura 41. Ensayos de RT-PCR en tiempo real en la línea de CMPT **G09** utilizando *primers* específicos para BMP2, BMP4, Nogina, BMPR1A, BMPR1B y BMPR2. Las distintas condiciones fueron definidas en la tabla 7. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a los niveles de expresión de la condición 1, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Con respecto a la condición 4 (agregado de BMP4 en ausencia de bFGF y EGF exógenos), en todos los casos, a excepción de lo determinado para los niveles del ARNm de Nogina, se observaron niveles intermedios respecto a los detectados en las condiciones 2 y 3 (Figuras 40 y 41). Esta observación resulta consistente con la idea de que la señalización dependiente de miembros de la familia de BMP antagoniza con la generada por el bFGF y el EGF. Respecto a la expresión de Nogina, en estas condiciones también se pudo determinar un marcado aumento de la misma.

PARTE 3: CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EN DISTINTAS LÍNEAS DE CMPT

Dado que el nicho perivascular cumple un papel fundamental en el mantenimiento y la propagación de distintos tumores del SNC (Calabrese C. 2007), decidimos determinar la relevancia biológica de las vías de señalización mediadas por el sistema endotelinérgico en distintas líneas de CMPT.

Niveles de expresión del ARNm de componentes del sistema endotelinérgico en CMPT

En primer lugar determinamos, mediante RT-PCR en tiempo real, los niveles de expresión relativos de los diferentes componentes del sistema endotelinérgico en distintas líneas de CMPT. Con fines comparativos, en este análisis también incluimos FH y células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC, del inglés, *human umbilical vein endothelial cells*). Estas determinaciones fueron realizadas en condiciones de cultivo que favorecen la propagación de estas células y el mantenimiento de su fenotipo indiferenciado.

Como se observa en la figura 42, las distintas células exhibieron una notoria variabilidad en los niveles de los transcritos de EDN1. La línea G02 presentó un nivel de expresión elevado, comparable al observado en las HUVEC; la línea G03 mostró un grado de expresión similar al detectado en FH. En el resto de las líneas de CMPT los niveles de expresión de EDN1 resultaron ser muy bajos. Por otra parte, los niveles de expresión de EDN2 y de EDN3 mostraron un menor grado de variabilidad que el observado en el caso de EDN1. Es importante mencionar que, a juzgar por los valores obtenidos en los ΔCt correspondientes, los niveles de expresión de los ARNm de EDN2 y de EDN3 resultaron ser muy bajos en todos los tipos celulares analizados. Para confirmar los valores obtenidos, repetimos estos ensayos ajustando las condiciones experimentales y empleando nuevos pares de *primers*, tanto para EDN2 como para EDN3. En todos estos casos, nuevamente obtuvimos resultados similares. Con respecto a los receptores de EDN, los niveles de expresión del receptor ETRA resultaron ser mayores en los FH y en la línea G03 que en el resto de las células analizadas. Contrariamente, el

receptor ETRB presentó, en todas las líneas de CMPT, niveles de expresión muy superiores respecto a los observados tanto en los FH como en las HUVEC. Nótese que en las líneas G05, G08 y G09 el grado de expresión de este transcripto resultó ser un orden de magnitud mayor al observado en el resto de las líneas de CMPT. Finalmente, en todas las células analizadas (a excepción de la línea G02), los niveles de expresión relativos del ARNm de la ECE mostraron una buena correlación con los observados para EDN1. Este resultado sugiere que las células que exhiben mayores niveles de EDN1 poseen además la capacidad de convertirla en su forma activa.

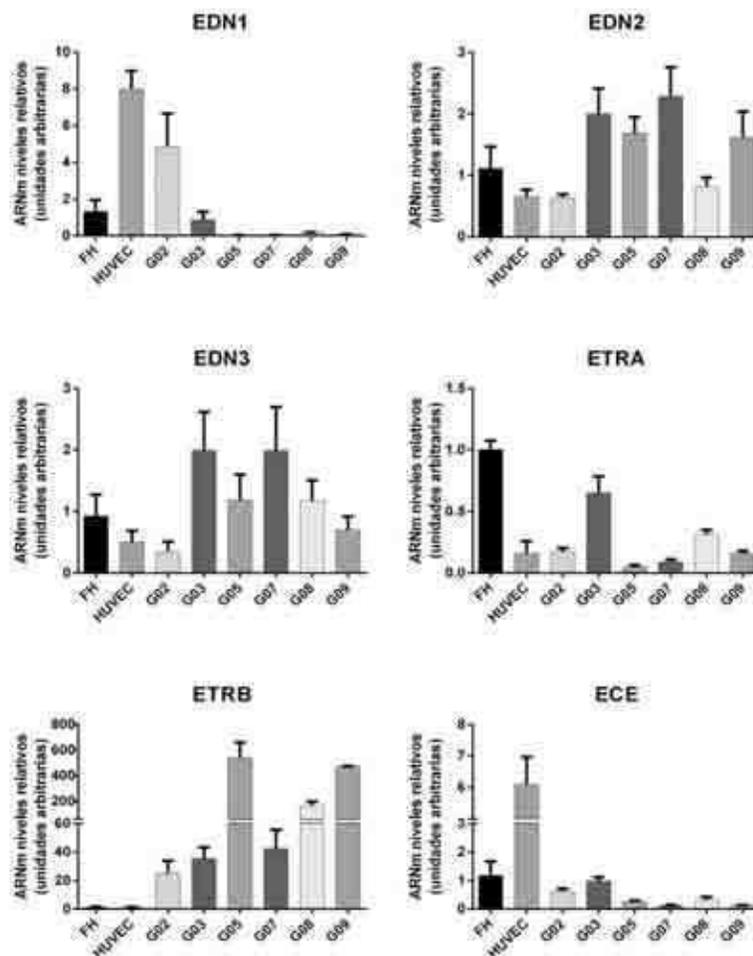


Figura 42. Ensayos de RT-PCR en tiempo real en FH, HUVEC y seis líneas de CMPT (en condiciones de indiferenciación). Se utilizaron *primers* específicos para EDN1, EDN2, EDN3, ETRA, ETRB y ECE. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión de FH, fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes.

Por lo tanto, en términos generales, los FH se destacan por una elevada expresión de los transcritos del receptor ETRA y por niveles de expresión intermedios del ARNm de EDN1. Por su parte, las HUVEC muestran niveles de expresión muy elevados de los transcritos de EDN1 y de los de la ECE, pero exhiben bajos niveles de expresión de ambos receptores. Contrariamente, la mayoría de las líneas de CMPT expresan niveles muy bajos de los ARNm de las tres EDN (excepto de EDN1 en G02 y G03) y se caracterizan por una mayor expresión de los receptores ETRB que de los receptores ETRA. Estos resultados se encuentran en concordancia con datos publicados previamente (Paolillo M. 2006; Liu Y. 2011). Llamativamente, las líneas que mostraron mayores niveles de expresión del transcrito de EDN1, mostraron también los niveles más bajos de expresión del ARNm de ETRB.

Niveles de expresión del ARNm de componentes del sistema endotelinérico en CMPT a lo largo de la diferenciación astrogliol

Con la intención de profundizar la caracterización de la expresión de los componentes del sistema endotelinérico en CMPT, decidimos analizar si los niveles de expresión de estos transcritos mostraban variaciones a lo largo de la diferenciación. Para ello, sometimos a cuatro líneas de CMPT (G02, G03, G08 y G09) al protocolo de diferenciación astrogliol, a lo largo del cual se tomaron muestras para evaluar la expresión de los ARNm correspondientes mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real. Nótese que de las cuatro líneas elegidas para este análisis, dos de ellas (G02 y G03) corresponden a las que mostraron mayores niveles de expresión de EDN1 (y menores niveles de ETRB), mientras que las dos restantes (G08 y G09) coinciden con las que mostraron mayores niveles de expresión de ETRB (y menores niveles de EDN1) (Figura 42). En esta oportunidad, los niveles de expresión de EDN2 y de EDN3 a lo largo de la diferenciación no fueron incluidos ya que éstos se encontraron próximos al límite de la sensibilidad del método, impidiendo una cuantificación rigurosa.

Como se observa en la figura 43, sólo se detectaron aumentos significativos de los transcritos de EDN1 en las líneas G08 y G09, las cuales, en condiciones

de indiferenciación exhibieron muy bajos niveles de expresión de este ARNm (Figura 42). Por otra parte, los niveles de expresión de ambos receptores aumento significativamente en las cuatro líneas de CMPT ensayadas. Finalmente, la expresión de los transcritos de la ECE aumentó significativamente sólo en las líneas en las que se observaron aumentos del ARNm de EDN1 (G08 y G09).

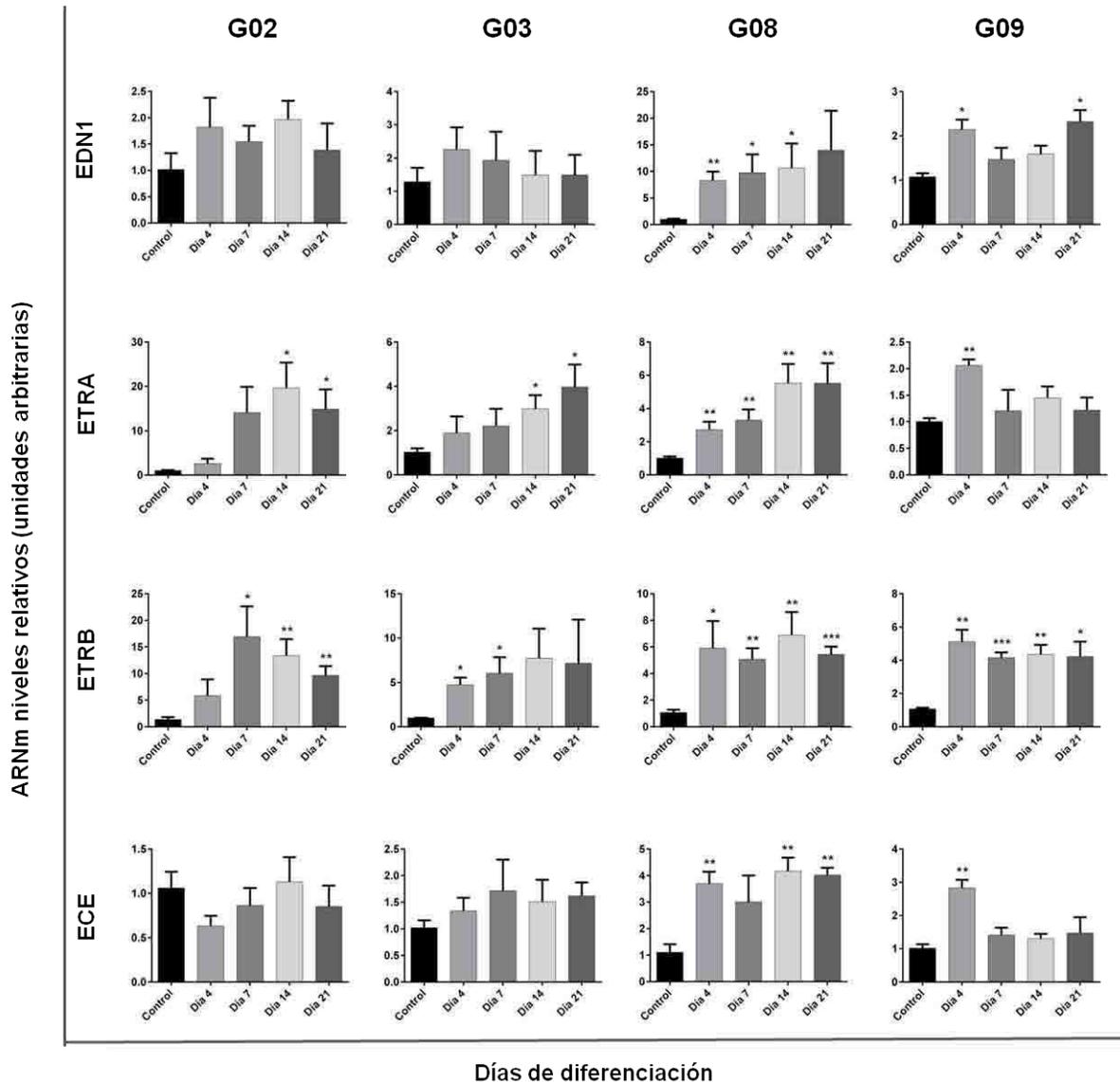


Figura 43. Ensayos de RT-PCR en tiempo real utilizando *primers* específicos para EDN1, ETRA, ETRB y ECE. Los valores fueron normalizados contra GAPDH. Todos los valores son relativos a la expresión del control (día 0) fijada arbitrariamente en un valor de 1. Se indican las medias ± E.S. de tres experimentos independientes. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

Estos resultados indican que la diferenciación *in vitro* de CMPT conlleva a un aumento en la expresión de los transcritos de distintos componentes del eje endotelinérgico, sugiriendo que las células más diferenciadas, presentes en la masa tumoral, podrían ser capaces de contribuir en la señalización de este sistema.

Efecto de las EDN en la supervivencia celular de CMPT

Como se describió en la Introducción, numerosas publicaciones han demostrado que las endotelinas contribuyen al desarrollo tumoral en distintos tipos de cáncer. Por este motivo, decidimos estudiar los efectos de la EDN1 en la supervivencia celular de las CMPT. Para ello, realizamos ensayos de viabilidad celular (XTT/PMS) en cuatro líneas de CMPT (G02, G03, G08 y G09) en dos condiciones de cultivo diferentes, cada una de ellas en presencia o en ausencia de EDN1 recombinante (10nM). La primera condición consistió en cultivar a las células en el medio en el que éstas son propagadas (TSM), favoreciendo así el mantenimiento de la viabilidad celular. En la segunda condición las células fueron cultivadas en un medio de cultivo básico (*Neurobasal*), el cual debido a la escasez de nutrientes y a la falta de factores de crecimiento conllevó, luego de unos días, a un importante descenso en la supervivencia de los cultivos estudiados (Figura 44). En todos los casos, la determinación de la viabilidad celular fue realizada luego de tres o de seis días de cultivo en las condiciones mencionadas.

De las cuatro líneas de CMPT analizadas, sólo dos de ellas (G08 y G09) sufrieron cambios en la viabilidad celular luego de ser cultivadas en presencia de EDN1 recombinante. En estos casos, el agregado de EDN1 al medio de cultivo TSM provocó cierto incremento de la viabilidad celular (20%-40%) (Figura 44, columnas azules); sin embargo, cuando las células fueron mantenidas en el medio de cultivo *Neurobasal* (NB), la presencia de EDN1 recombinante produjo un aumento notable en la viabilidad celular, alcanzando en algunos casos incrementos de hasta 250% (Figura 44 A, columnas rojas y Figura 44 B).

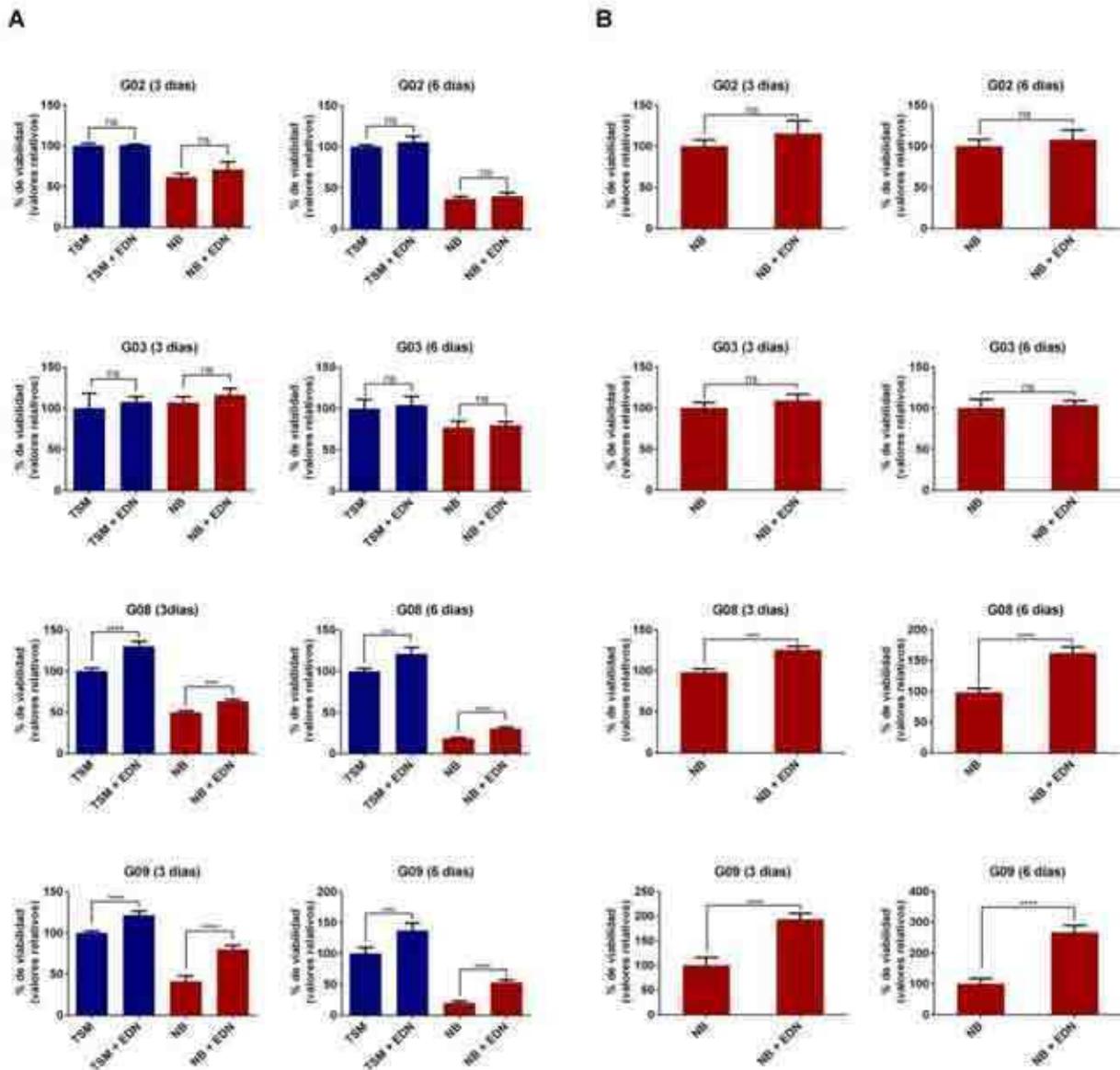


Figura 44: **A.** Viabilidad celular de CMPT cultivadas en TSM (columnas azules) o en *Neurobasal* (columnas rojas) en ausencia o en presencia de EDN1 recombinante (10nM) luego de 3 o 6 días de cultivo. **B.** Resultados obtenidos en *Neurobasal* mostrados en (A) relativizados contra la viabilidad observada en *Neurobasal* en ausencia de EDN1. Los valores fueron determinados mediante ensayos de XTT/PMS y se presentan como porcentajes de viabilidad. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de un experimento realizado por quintuplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. TSM: *Tumor stem cell media* (medio de cultivo de CMT). NB: *Neurobasal*.

Debido a que los cambios observados en el porcentaje de viabilidad celular en los ensayos de XTT/PMS pueden deberse a factores que no necesariamente afectan la supervivencia celular (por ejemplo, variaciones en la tasa de proliferación, en la actividad metabólica, etc.), decidimos evaluar si los efectos

observados en las líneas G08 y G09 se correspondían con cambios en la tasa de muerte celular. Dado que numerosos trabajos le asignan un rol antiapoptótico a las EDNs en diferentes tipos celulares, nos preguntamos si el aumento en la viabilidad celular, observado en presencia de estos polipéptidos, era debido a una disminución en los niveles de apoptosis. Para ello, mediante ensayos de ELISA cuantificamos los niveles relativos de mono y oligonucleosomas presentes en extractos citoplasmáticos, los cuales se generan a partir de la fragmentación ordenada del ADN típica de procesos apoptóticos. Los inmunoensayos fueron realizados en las condiciones experimentales descritas con anterioridad, tras incubar o no a las células tres días con EDN1 recombinante.

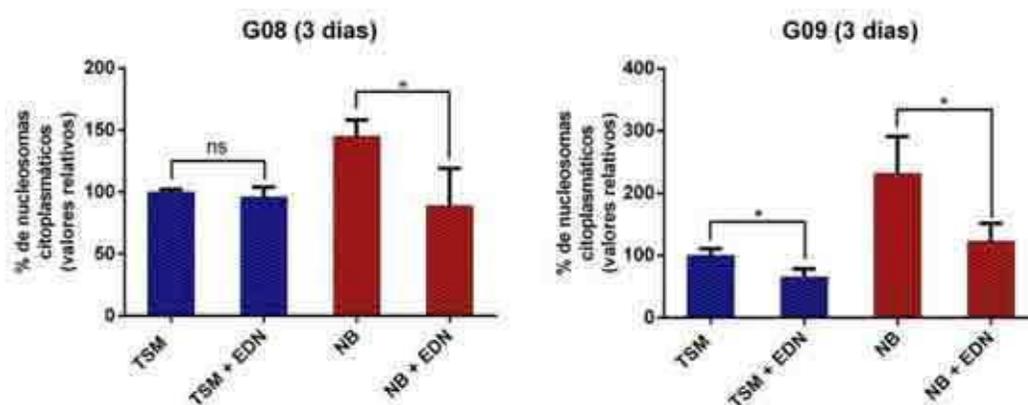


Figura 45. Cuantificación de mono y oligonucleosomas citoplasmáticos mediante ensayos de ELISA en las líneas G08 y G09 luego de ser cultivadas durante tres días en ausencia o en presencia de EDN1 tanto en el medio de cultivo utilizado para la propagación de estas células (TSM) como en el medio básico *Neurobasal* (NB). Los resultados se expresan como porcentaje de nucleosomas citoplasmáticos respecto a los detectados en las células control (sin agregado de EDN1). Cada barra representa el promedio \pm D.S. de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$.

Como se indica en la figura 45, a excepción de la línea G08 en TSM, en todos los casos pudimos determinar que los cambios de viabilidad celular observados fueron debidos, al menos en parte, a cambios en los niveles de apoptosis. Nótese que el cultivo de estas células en NB efectivamente produce, luego de tres días, un aumento en los niveles basales de apoptosis de estas líneas celulares.

Posteriormente, para dilucidar si los miembros restantes de la familia de EDNs eran también capaces de reducir la muerte celular, cultivamos las líneas G02, G08 y G09 con dosis crecientes de EDN2 o de EDN3 durante seis días en el medio NB.

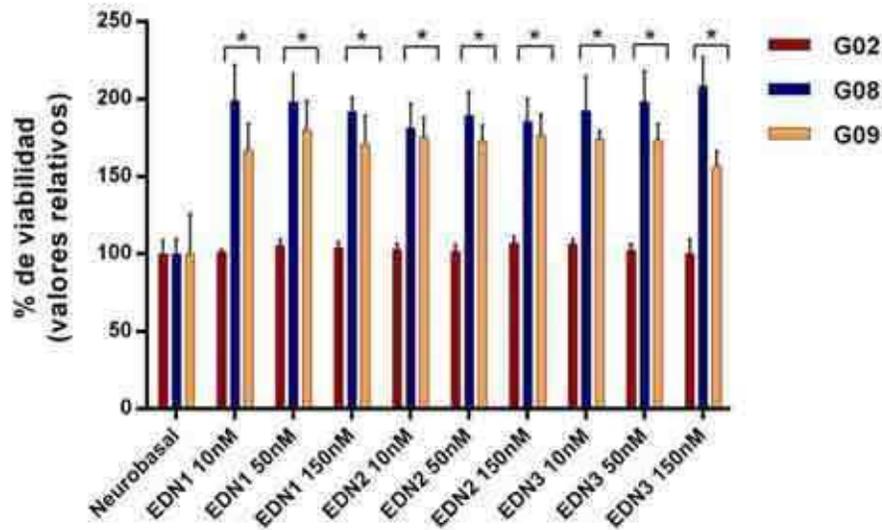


Figura 46: Viabilidad celular de CMPT cultivadas en *Neurobasal* en presencia de concentraciones crecientes de EDN1, EDN2 y EDN3 recombinantes durante 6 días. Los valores fueron determinados mediante ensayos de XTT/PMS y se presentan como porcentaje de viabilidad con respecto al control (sin EDN). Cada barra representa el promedio \pm D.S. de un experimento realizado por quintuplicado. * $p < 0,05$.

En todos los casos analizados pudo observarse que tanto la EDN2 como la EDN3 fueron capaces de producir el mismo efecto que la EDN1 en la viabilidad celular de dichas líneas de CMPT (Figura 46). Es importante recordar que la EDN1 y la EDN2 se unen con afinidades similares a ambos receptores (ETRA y ETRB), mientras que la EDN3 presenta una afinidad 100 veces mayor por el ETRB que por el ETRA (Bagnato A. 2008). Teniendo en cuenta que estas líneas de CMPT presentan elevados niveles de expresión de los transcritos de ETRB y que los cambios producidos por la EDN3 en la viabilidad celular resultaron similares a los

generados por la EDN1 y por la EDN2, es posible sugerir que el ETRB sería el principal mediador de las señales antiapoptóticas en estos tipos celulares (Figuras 42 y 46).

Resulta interesante remarcar que la presencia de EDN1, EDN2 o EDN3 no ejerció efectos sobre la viabilidad celular de las líneas G02 y G03. Este fenómeno podría explicarse, al menos en parte, por los elevados niveles de expresión del transcrito de EDN1 que exhiben estas células con respecto a las demás líneas estudiadas. La concentración de EDN1 endógena podría en estos casos, ser suficiente para activar a los receptores y mantener encendido al sistema, conformando un escenario molecular en el cual el agregado de EDN1 recombinante no sería capaz de causar aumentos adicionales sobre la viabilidad celular.

Por lo tanto, en concordancia con publicaciones anteriores (Paolillo M. 2010; Liu Y. 2011), el eje endotelinérgico sería uno de los múltiples sistemas que participaría en el mantenimiento y la supervivencia de ciertas CMPT derivadas de glioma.

Caracterización de los efectos de dos antagonistas del sistema endotelinérgico: macitentan y tezosentan

Habiendo determinado que las distintas EDNs son capaces de promover la supervivencia de ciertas CMPT, decidimos estudiar los efectos de dos inhibidores duales de los ETRA y ETRB en este tipo de células. El primero de ellos, el tezosentan (Ro 61-0612), corresponde a un antagonista dual que muestra afinidades similares por ambos receptores (Clozel M. 1999). El segundo inhibidor, el macitentan (ACT-064992), si bien también es un antagonista dual, posee una afinidad muy superior por el ETRA que por el ETRB (Iglarz M. 2008). Este compuesto, en combinación con TMZ, está siendo evaluado en un ensayo clínico (fase I) realizado en pacientes con GBM (Patel T. 2014)

Con el fin de evaluar la capacidad de estos antagonistas para revertir los efectos producidos por la EDN1 descritos previamente (Figura 44), diseñamos

dos tipos de ensayos de viabilidad (XTT/PMS) diferentes utilizando en todos los casos a la línea G09. En el primero de ellos, las células fueron cultivadas en el medio NB durante 6 días en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de cada uno de estos inhibidores (Figura 47 A y B paneles de la izquierda). En el segundo tipo de ensayo, realizamos las mismas curvas de dosis respuesta pero esta vez en presencia de EDN1 recombinante (Figura 47 A y B paneles de la derecha).

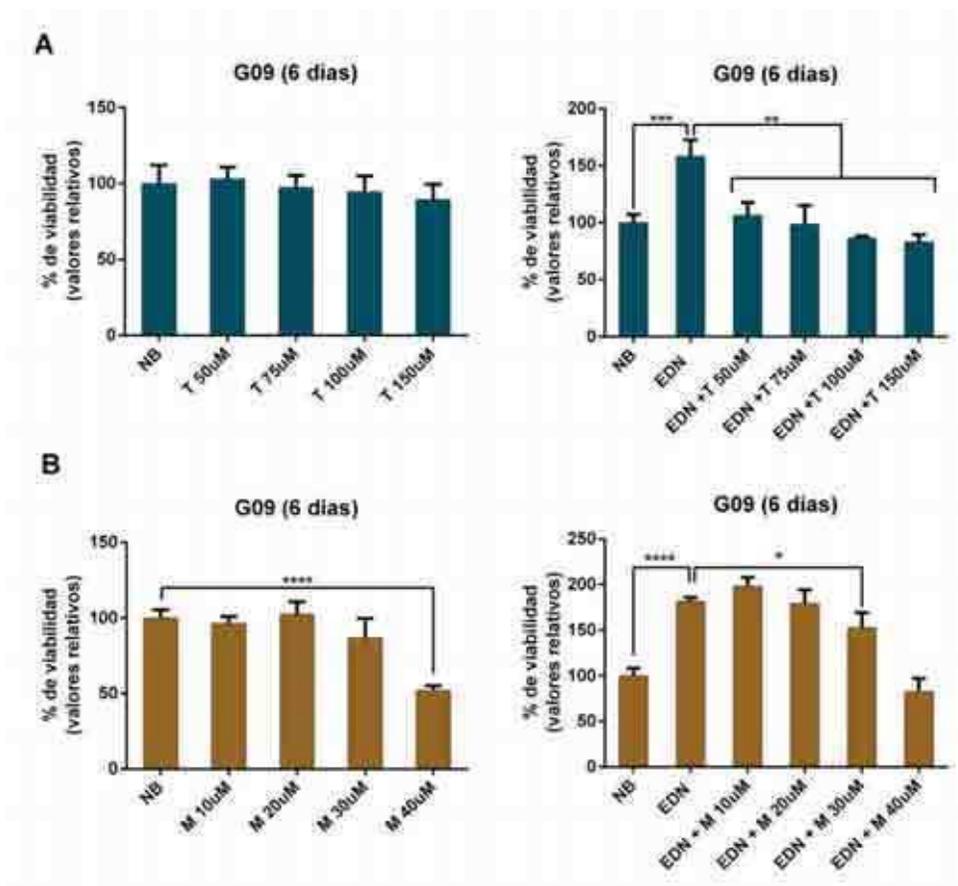


Figura 47: Ensayos de viabilidad celular realizados en la línea de CMPT G09 cultivada en *Neurobasal* durante 6 días en presencia de concentraciones crecientes de antagonistas duales de receptores de EDNs. **A.** Efectos de concentraciones crecientes de tezosentan en ausencia (panel izquierdo) y en presencia de EDN1 recombinante (panel derecho). **B.** Efectos de concentraciones crecientes de macitentan en ausencia (panel izquierdo) y en presencia de EDN1 recombinante (panel derecho). Los valores fueron determinados mediante ensayos de XTT/PMS y se presentan como porcentaje de viabilidad con respecto a los controles correspondientes. Cada barra representa el promedio \pm D.S. de un experimento realizado por quintuplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. NB: *Neurobasal*. M: macitentan. T: tezosentan.

El tratamiento con tezosentan fue capaz de revertir totalmente el efecto de la EDN1 recombinante dentro de todo el rango de concentraciones utilizado (50 μ M-150 μ M) (Figura 47 A panel derecho). Por otra parte, en ningún caso la presencia de este antagonista produjo cambios significativos en la viabilidad celular respecto a la observada en el control (Figura 47 A panel izquierdo). El hecho de que en esta línea de CMPT el tezosentan fue capaz de revertir totalmente el efecto de la EDN1 recombinante sin afectar la viabilidad celular cuando éste fue agregado en forma individual, sumado a los bajos niveles de expresión de los transcritos de las distintas EDNs en estas células, sugiere que la contribución de una posible señalización endógena sería despreciable.

En el caso del macitentan, una concentración de 30 μ M permitió revertir sólo parcialmente el efecto de la EDN1 recombinante (Figura 47 B panel derecho). En esta concentración la viabilidad celular no fue afectada significativamente cuando este antagonista fue agregado individualmente. Sin embargo, la presencia de macitentan en una concentración de 40 μ M produjo un importante descenso en la viabilidad celular, sugiriendo que a partir de esta concentración el macitentan es capaz de generar efectos citotóxicos inespecíficos (Figura 47 B panel izquierdo).

Por lo tanto, estos resultados indican que el uso de tezosentan en este tipo de células resultaría más apropiado que el de macitentan, lo cual se corresponde con el hecho de que estas células expresan principalmente el ETRB (Figura 42 y Paolillo M. 2006).

CONCLUSIONES

A pesar de que en las últimas décadas se han desarrollado numerosas drogas antineoplásicas, el éxito terapéutico de éstas ha sido muy acotado (Huff C. 2006; Cantley L. 2012). Actualmente se considera que esto se debe, en parte, a las limitaciones propias de los sistemas de cultivo *in vitro* a partir de los cuales dichos agentes han sido desarrollados. De hecho, la información obtenida a partir de ensayos donde se utilizaron líneas de células tumorales no ha contribuido de manera significativa en el desarrollo de estrategias terapéuticas que hayan logrado aumentar la sobrevivencia de los pacientes oncológicos (Williams S. 2013). Por ejemplo, el Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal capaz de unirse e inactivar a los receptores Her2/Neu (del inglés, *human epidermal growth factor receptor 2*) y el Imatinib, un inhibidor de la quinasa Abl, han mostrado una elevada eficacia en el tratamiento del cáncer de mama y de la leucemia mieloide crónica (LMC) respectivamente; sin embargo, ninguno de ellos fue desarrollado a partir de estudios realizados en líneas tumorales tradicionales (Druker B. 2006; Verma S. 2012). El receptor Her2/Neu fue identificado como un blanco terapéutico potencial a partir de la observación de su sobre-expresión en cortes histológicos obtenidos a partir de biopsias tumorales (Natali P. 1990), mientras que la proteína de fusión p210-BCR/ABL fue descubierta a partir de muestras de sangre provenientes de pacientes con LMC (Rowley J. 1973). En estos casos, sin embargo, tanto las líneas celulares tradicionales como los experimentos *in vivo* realizados en ratones modificados genéticamente han complementado dichos hallazgos y han permitido conocer los detalles moleculares del funcionamiento y la regulación de estas quinasas. De hecho, los sistemas *in vitro* han contribuido profundamente en nuestra concepción actual de la biología tumoral. Gracias a la facilidad para fijar variables y mantener constantes las condiciones experimentales, las líneas celulares han sido muy útiles para comprender las bases biológicas de la resistencia a tratamientos oncológicos, han permitido descubrir vías de señalización fundamentales para la supervivencia y la proliferación de las células tumorales e incluso han facilitado el desarrollo de ciertos inhibidores de quinasas entre otros. Similarmente, muchos compuestos quimioterapéuticos que mostraron

resultados prometedores en sistemas *in vitro*, resultaron poco prácticos debido a su toxicidad sistémica (Williams S. 2013).

Por lo tanto, si bien está claro que los sistemas *in vitro* sólo representan una herramienta complementaria dentro de las investigaciones en oncología, su utilidad no debe ser menospreciada. En este sentido, el descubrimiento de las CMT y la posibilidad de cultivarlas en medios definidos (en ausencia de SFB), sin dudas representa un gran avance en el desarrollo de modelos *in vitro* más adecuados. Estos hallazgos han propiciado el establecimiento de líneas celulares enriquecidas en células con propiedades de CMT obtenidas directamente de muestras quirúrgicas de pacientes, permitiendo realizar ensayos con células que han sido mantenidas en cultivo durante períodos breves, minimizando hasta cierto punto, los posibles eventos de selección. Además, la elevada eficiencia en el establecimiento de estos cultivos ofrece la posibilidad de contar con un número significativo de líneas celulares provenientes de diferentes pacientes, lo cual permite no sólo realizar un abordaje estadístico en las distintas investigaciones que se lleven a cabo, sino también contar con datos clínicos asociados a cada muestra.

En este trabajo, encontrar una definición adecuada para las células derivadas de pacientes con gliomas de alto grado no resultó ser una tarea sencilla. Creemos que no resulta conveniente referirse a estos cultivos como “líneas de células madre derivadas de gliomas” ya que más allá de la selección generada por las condiciones de cultivo, no hemos aislado o purificado una subpoblación de CMT definida por algún criterio en particular (por ejemplo células positivas para CD133). Por lo tanto, si consideramos que las condiciones de cultivo empleadas soportan la auto-renovación de CMT, pero éstas normalmente sufren divisiones celulares asimétricas, no hay motivos para pensar que en estas condiciones, las poblaciones aisladas se mantengan estables a lo largo de los pasajes (sin considerar además posibles eventos de selección clonal). En cuanto a la capacidad tumorigénica, estas líneas exhibieron un menor grado de tumorigenicidad respecto al de las subpoblaciones de CMT aisladas a partir de marcadores e inmediatamente inyectadas en ratones inmunodeficientes (Singh S.

2004; Pollar S. 2009). Es importante tener presente que los cambios genéticos y/o epigenéticos producto del cultivo *in vitro* también podrían afectar el grado de tumorigenicidad de estas células. Por lo tanto, podría pensarse que estos cultivos se encuentran enriquecidos en CMT, pero no necesariamente representan una población pura de éstas.

En base a lo expuesto, es concebible pensar que en cada línea celular obtenida podría existir un equilibrio dinámico particular entre distintas subpoblaciones (Figura 48). Éste podría estar dado por al menos tres variables:

1. Tasa de división asimétrica versus tasa de división simétrica.
2. Duración del ciclo de división celular de cada subpoblación.
3. Frecuencia de posibles eventos de plasticidad fenotípica y de dediferenciación celular.

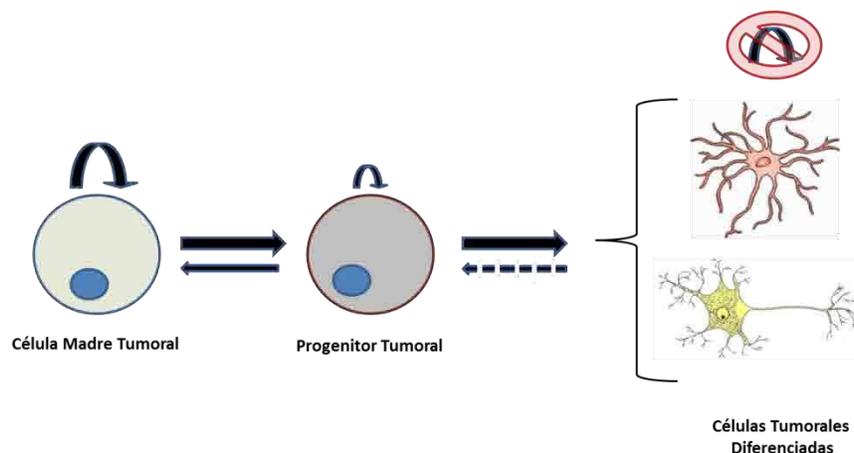


Figura 48. Representación de las posibles subpoblaciones presentes en los cultivos derivados de gliomas de alto grado. Nótese que la capacidad de auto-renovación (indicada con flechas curvas) de las CMT es mayor a la de los progenitores tumorales y es nula en las células tumorales diferenciadas. Las flechas punteadas indican posibles eventos de dediferenciación celular.

Por ejemplo, si dentro de una línea celular, una subpoblación posee una mayor tasa de división simétrica que de división asimétrica, y además la duración del ciclo celular de ésta es menor a la del resto, entonces, dicha subpoblación sería la predominante.

En base al fenotipo indiferenciado determinado en todas las líneas analizadas en este trabajo y a sus respectivas capacidades para dar origen a una progenie diferenciada, proponemos que los tipos celulares predominantes en estos cultivos corresponderían a CMT y/o a progenitores tumorales tempranos. En otras palabras, las células capaces de proliferar en las condiciones *in vitro* utilizadas en este trabajo, corresponderían al ápice de la pirámide propuesta por el modelo de organización jerárquica de los tumores (Figura 49). Por lo tanto, consideramos que la designación de CMPT resulta apropiada.

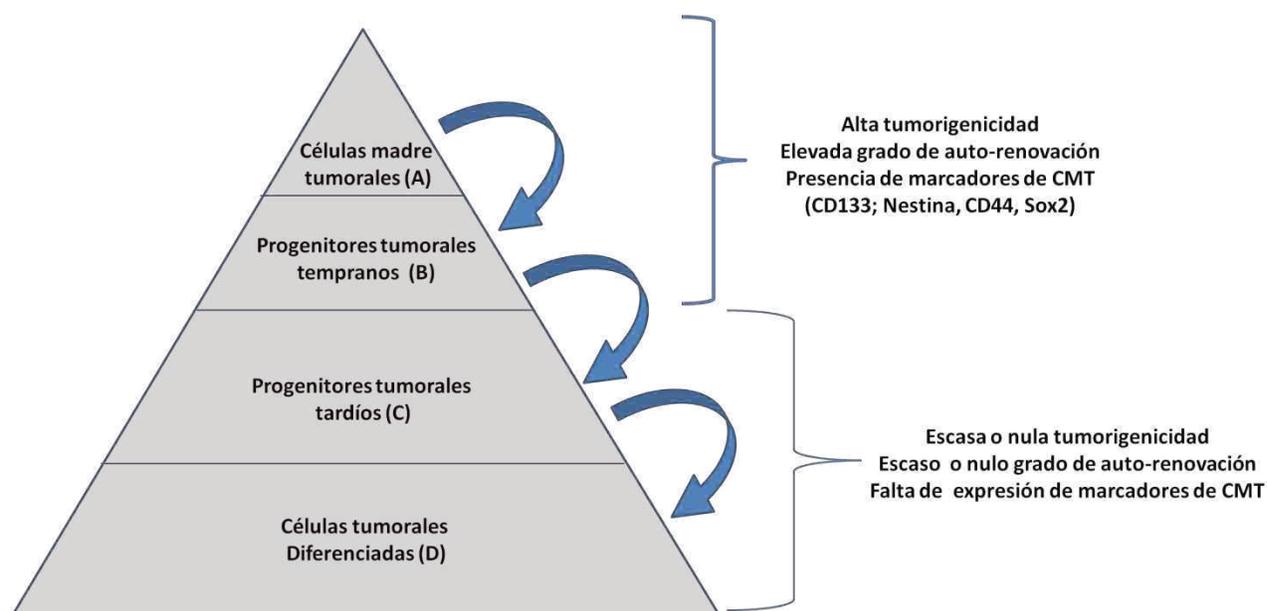


Figura 49. Representación de la organización jerárquica de los tumores. Las células tumorales capaces de auto-renovarse en las condiciones *in vitro* empleadas en este trabajo corresponderían principalmente a las CMT y a los progenitores tumorales tempranos (A y B), mientras que las células con cierto compromiso en la diferenciación estarían representadas en forma minoritaria (C y D).

Las terapias diferenciantes tienen como objetivo promover la pérdida de la auto-renovación de las CMT y de los progenitores tumorales. Esta estrategia resulta atractiva ya que evitaría los efectos citotóxicos propios de los agentes antineoplásicos tradicionales. En diversos trabajos de investigación los miembros

de la familia BMP han sido considerados como candidatos potenciales para tratar los gliomas de alto grado, ya que estas proteínas han demostrado tener una elevada capacidad para promover la diferenciación de las CMT correspondientes (Piccirillo S. 2006; Lee J. 2008). En este sentido, el modelo experimental desarrollado en esta tesis resultó de gran utilidad para comprender en mayor detalle los efectos de la señalización de BMP4 en la diferenciación de las CMPT derivadas de gliomas. Pudimos determinar que si bien estas células retienen su capacidad para diferenciarse, la eficiencia de este proceso y el compromiso hacia los distintos linajes neurales (en particular el astrogial y el neuronal) varía dramáticamente entre las distintas líneas celulares. Sin embargo, en todos los casos analizados, la tasa de proliferación de las CMPT se redujo significativamente luego de que estas fueron sometidas a diferentes condiciones que favorecen la diferenciación, sugiriendo que en este tipo de tumores, el desarrollo de agentes diferenciadores podría resultar efectivo como parte de un esquema terapéutico.

Dado que el sistema endotelinérgico participa en el mantenimiento y en la propagación de distintos tipos de cáncer (Bagnato A. 2008), decidimos evaluar la relevancia de las señales mediadas por este sistema en diferentes líneas de CMPT derivadas de gliomas de alto grado. Nuevamente, este modelo nos permitió encontrar diferencias tanto en el perfil de expresión de los componentes del eje endotelinérgico, como en los efectos biológicos desencadenados por el agregado de EDN recombinantes. Teniendo presente que el nicho perivascular presente en los gliomas juega un rol fundamental en el desarrollo de estos tumores (Calabrese C. 2007), el bloqueo de los distintos componentes que lo conforman podría representar una opción terapéutica a tener en cuenta.

Si bien los distintos casos de gliomas de alto grado muestran similitudes en cuanto a sus características histopatológicas, a su clínica y a su pronóstico, a lo largo de todo este trabajo quedó demostrado que la heterogeneidad inter-tumoral en este tipo de cáncer es sumamente elevada. Pudimos observar entre las distintas líneas de CMPT diferencias en prácticamente todos los aspectos analizados, incluyendo morfología celular, inmunofenotipo, tasa de proliferación,

capacidad para diferenciarse a células de distintos linajes y respuesta a EDN recombinantes. Estas observaciones destacan la importancia de este tipo de modelos *in vitro* para realizar investigaciones traslacionales y para contribuir al desarrollo de terapias personalizadas que resulten más efectivas para el tratamiento del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

- Akkina, R., B. K. Berges, et al. (2011). "Humanized Rag1^{-/-} gammac^{-/-} mice support multilineage hematopoiesis and are susceptible to HIV-1 infection via systemic and vaginal routes." *PLoS One* 6(6): e20169.
- Alcantara Llaguno, S., J. Chen, et al. (2009). "Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model." *Cancer Cell* 15(1): 45-56.
- Alcantara Llaguno, S. R., Y. Chen, et al. (2011). "Stem cells in brain tumor development." *Curr Top Dev Biol* 94: 15-44.
- Al-Hajj, M., M. W. Becker, et al. (2004). "Therapeutic implications of cancer stem cells." *Curr Opin Genet Dev* 14(1): 43-47.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3983-3988.
- Anderson, K., C. Lutz, et al. (2011). "Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia." *Nature* 469(7330): 356-361.
- Andersson, A., J. Fenhammar, et al. (2008). "Mixed endothelin receptor antagonism with tezosentan improves intestinal microcirculation in endotoxemic shock." *J Surg Res* 149(1): 138-147.
- Bachoo, R. M., E. A. Maher, et al. (2002). "Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis." *Cancer Cell* 1(3): 269-277.
- Bagnato, A., F. Spinella, et al. (2008). "The endothelin axis in cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy." *Can J Physiol Pharmacol* 86(8): 473-484.
- Bani-Yaghoob, M., R. G. Tremblay, et al. (2006). "Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex." *Dev Biol* 295(1): 52-66.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response." *Nature* 444(7120): 756-760.
- Bao, S., Q. Wu, et al. (2006). "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor." *Cancer Res* 66(16): 7843-7848.
- Barabe, F., J. A. Kennedy, et al. (2007). "Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice." *Science* 316(5824): 600-604.
- Barker, N., M. Huch, et al. (2010). "Lgr5(+) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro." *Cell Stem Cell* 6(1): 25-36.
- Barker, N., J. H. van Es, et al. (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." *Nature* 449(7165): 1003-1007.
- Barrandon, Y. and H. Green (1987). "Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(8): 2302-2306.
- Barroca, V., B. Lassalle, et al. (2009). "Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo." *Nat Cell Biol* 11(2): 190-196.
- Beck, B. and C. Blanpain (2013). "Unravelling cancer stem cell potential." *Nat Rev Cancer* 13(10): 727-738.
- Beier, D., P. Hau, et al. (2007). "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles." *Cancer Res* 67(9): 4010-4015.
- Berggren, P., R. Kumar, et al. (2003). "Detecting homozygous deletions in the CDKN2A(p16(INK4a))/ARF(p14(ARF)) gene in urinary bladder cancer using real-time quantitative PCR." *Clin Cancer Res* 9(1): 235-242.
- Blanpain, C. (2013). "Tracing the cellular origin of cancer." *Nat Cell Biol* 15(2): 126-134.
- Blanpain, C. and B. D. Simons (2013). "Unravelling stem cell dynamics by lineage tracing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(8): 489-502.

- Bleau, A. M., D. Hambardzumyan, et al. (2009). "PTEN/PI3K/Akt pathway regulates the side population phenotype and ABCG2 activity in glioma tumor stem-like cells." *Cell Stem Cell* 4(3): 226-235.
- Bond, A. M., O. G. Bhalala, et al. (2012). "The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation." *Dev Neurobiol* 72(7): 1068-1084.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." *Nat Med* 3(7): 730-737.
- Boumil, R. M., Y. Ogawa, et al. (2006). "Differential methylation of Xite and CTCF sites in Tsix mirrors the pattern of X-inactivation choice in mice." *Mol Cell Biol* 26(6): 2109-2117.
- Bruce, W. R. and H. Van Der Gaag (1963). "A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo." *Nature* 199: 79-80.
- Brunschwig, A., C. M. Southam, et al. (1965). "Host resistance to cancer. Clinical experiments by homotransplants, autotransplants and admixture of autologous leucocytes." *Ann Surg* 162(3): 416-425.
- Calabrese, C., H. Poppleton, et al. (2007). "A perivascular niche for brain tumor stem cells." *Cancer Cell* 11(1): 69-82.
- Calloni, R., E. A. Cordero, et al. (2013). "Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells." *Stem Cells Dev* 22(9): 1455-1476.
- Cantley, L.C., Dalton, W.S. et al. (2012). "AACR Cancer Progress Report 2012". *Clin Canc Res* 18.
- Carducci, M. A., F. Saad, et al. (2007). "A phase 3 randomized controlled trial of the efficacy and safety of atrasentan in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer." *Cancer* 110(9): 1959-1966.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." *Nature* 473(7347): 298-307.
- Cavallaro, M., J. Mariani, et al. (2008). "Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants." *Development* 135(3): 541-557.
- Cerletti, M., S. Jurga, et al. (2008). "Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles." *Cell* 134(1): 37-47.
- Cetin, A., S. Komai, et al. (2006). "Stereotaxic gene delivery in the rodent brain." *Nat Protoc* 1(6): 3166-3173.
- Chaturvedi, A., M. M. Araujo Cruz, et al. (2013). "Mutant IDH1 promotes leukemogenesis in vivo and can be specifically targeted in human AML." *Blood* 122(16): 2877-2887.
- Chen, H., X. Shen, et al. (2010). "Phosphatase and tensin homolog reconstruction and vascular endothelial growth factor knockdown synergistically inhibit the growth of glioblastoma." *Cancer Biother Radiopharm* 25(6): 713-721.
- Chen, J., Y. Li, et al. (2012). "A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy." *Nature* 488(7412): 522-526.
- Chen, J., R. M. McKay, et al. (2012). "Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells." *Cell* 149(1): 36-47.
- Chen, R., M. C. Nishimura, et al. (2010). "A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma." *Cancer Cell* 17(4): 362-375.
- Chen, W. (2007). "Clinical applications of PET in brain tumors". *J Nucl Med* 48(9):1468-81.
- Cheshier, S. H., S. J. Morrison, et al. (1999). "In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 3120-3125.
- Chu, P., D. J. Clanton, et al. (2009). "Characterization of a subpopulation of colon cancer cells with stem cell-like properties." *Int J Cancer* 124(6): 1312-1321.

- Clozel, M. et al (1999). "Pharmacology of Tezosentan, New Endothelin Receptor Antagonist Designed for Parenteral Use". *J Pharmacol Exp Ther* 290(2):840-6.
- Collins, A. T., P. A. Berry, et al. (2005). "Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells." *Cancer Res* 65(23): 10946-10951.
- Colman, H., L. Zhang, et al. (2010). "A multigene predictor of outcome in glioblastoma." *Neuro Oncol* 12(1): 49-57.
- Cotsarelis, G., T. T. Sun, et al. (1990). "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis." *Cell* 61(7): 1329-1337.
- Curley, M. D., V. A. Therrien, et al. (2009). "CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer." *Stem Cells* 27(12): 2875-2883.
- Dahlrot, R. H., S. K. Hermansen, et al. (2013). "What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas?" *Int J Clin Exp Pathol* 6(3): 334-348.
- Dalerba, P., S. J. Dylla, et al. (2007). "Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24): 10158-10163.
- Dalerba, P., T. Kalisky, et al. (2011). "Single-cell dissection of transcriptional heterogeneity in human colon tumors." *Nat Biotechnol* 29(12): 1120-1127.
- Daniel, V. C., L. Marchionni, et al. (2009). "A primary xenograft model of small-cell lung cancer reveals irreversible changes in gene expression imposed by culture in vitro." *Cancer Res* 69(8): 3364-3373.
- Dawson, M. A., R. K. Prinjha, et al. (2011). "Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia." *Nature* 478(7370): 529-533.
- de Sousa, E. M., L. Vermeulen, et al. (2011). "Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells." *Clin Cancer Res* 17(4): 647-653.
- Dean, M., T. Fojo, et al. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* 5(4): 275-284.
- DeAngelis, L. M. (2005). "Chemotherapy for brain tumors--a new beginning." *N Engl J Med* 352(10): 1036-1038.
- Denault, J. B., A. Claing, et al. (1995). "Processing of proendothelin-1 by human furin convertase." *FEBS Lett* 362(3): 276-280.
- Diehn, M., R. W. Cho, et al. (2009). "Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells." *Nature* 458(7239): 780-783.
- Dieter, S. M., C. R. Ball, et al. (2011). "Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases." *Cell Stem Cell* 9(4): 357-365.
- Dinsmore, C. E. (1992). "The foundations of contemporary regeneration research: historical perspectives." *Monogr Dev Biol* 23: 1-27.
- Doetsch, F., I. Caille, et al. (1999). "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain." *Cell* 97(6): 703-716.
- Dolecek, T. A., J. M. Propp, et al. (2012). "CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009." *Neuro Oncol* 14 Suppl 5: v1-49.
- Driessens, G., B. Beck, et al. (2012). "Defining the mode of tumour growth by clonal analysis." *Nature* 488(7412): 527-530.
- Druker, B.J., Guilhot, F. et al. (2006) "Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia". *N Engl J Med* 355:2408–2417.
- Du, L., H. Wang, et al. (2008). "CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells." *Clin Cancer Res* 14(21): 6751-6760.
- Dylla, S. J., L. Bevilgia, et al. (2008). "Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy." *PLoS One* 3(6): e2428.

- Eisenhardt, L. and H. Cushing (1930). "Diagnosis of Intracranial Tumors by Supravital Technique." *Am J Pathol* 6(5): 541-552 547.
- Eramo, A., F. Lotti, et al. (2008). "Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population." *Cell Death Differ* 15(3): 504-514.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med* 4(11): 1313-1317.
- Fan, F., S. Samuel, et al. (2012). "Overexpression of snail induces epithelial-mesenchymal transition and a cancer stem cell-like phenotype in human colorectal cancer cells." *Cancer Med* 1(1): 5-16.
- Ferrer-Luna, R., M. Mata, et al. (2009). "Loss of heterozygosity at 1p-19q induces a global change in oligodendroglial tumor gene expression." *J Neurooncol* 95(3): 343-354.
- Ferrer-Luna, R., L. Nunez, et al. (2011). "Whole-genomic survey of oligodendroglial tumors: correlation between allelic imbalances and gene expression profiles." *J Neurooncol* 103(1): 71-85.
- Fialkow, P. J. (1974). "The origin and development of human tumors studied with cell markers." *N Engl J Med* 291(1): 26-35.
- Folkins, C., S. Man, et al. (2007). "Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors." *Cancer Res* 67(8): 3560-3564.
- Fong, H., K. A. Hohenstein, et al. (2008). "Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells." *Stem Cells* 26(8): 1931-1938.
- Fortin, D., G. J. Cairncross, et al. (1999). "Oligodendroglioma: an appraisal of recent data pertaining to diagnosis and treatment." *Neurosurgery* 45(6): 1279-1291; discussion 1191.
- Foudi, A., K. Hochedlinger, et al. (2009). "Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells." *Nat Biotechnol* 27(1): 84-90.
- Fraser, S. E. and M. Bronner-Fraser (1991). "Migrating neural crest cells in the trunk of the avian embryo are multipotent." *Development* 112(4): 913-920.
- French, P. J., S. M. Swagemakers, et al. (2005). "Gene expression profiles associated with treatment response in oligodendrogliomas." *Cancer Res* 65(24): 11335-11344.
- Friedman, M. D., D. S. Jeevan, et al. (2013). "Targeting cancer stem cells in glioblastoma multiforme using mTOR inhibitors and the differentiating agent all-trans retinoic acid." *Oncol Rep* 30(4): 1645-1650.
- Fuchs, E. and T. Chen (2013). "A matter of life and death: self-renewal in stem cells." *EMBO Rep* 14(1): 39-48.
- Furth, J. and M. Kahn (1937). "The transmission of leukemia in mice with a single cell." *Am J Cancer* 31: 276-282.
- Gangemi, R. M., F. Griffero, et al. (2009). "SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity." *Stem Cells* 27(1): 40-48.
- Gao, W., F. Tiang, et al. (2014) "Epidermal growth factor increases the expression of Nestin in rat reactive astrocytes through the Ras-Raf-ERK pathway". *Neuroscience Letters* 562 54– 59
- Garnett, M. J., E. J. Edelman, et al. (2012). "Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells." *Nature* 483(7391): 570-575.
- Gibson, P., Y. Tong, et al. (2010). "Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins." *Nature* 468(7327): 1095-1099.
- Gilbertson, R. J. and J. N. Rich (2007). "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche." *Nat Rev Cancer* 7(10): 733-736.
- Gill, G. N. and C. S. Lazar (1981). "Increased phosphotyrosine content and inhibition of proliferation in EGF-treated A431 cells." *Nature* 293(5830): 305-307.
- Gilman, A. (1963). "The initial clinical trial of nitrogen mustard." *Am J Surg* 105: 574-578.

- Ginestier, C., M. H. Hur, et al. (2007). "ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome." *Cell Stem Cell* 1(5): 555-567.
- Gonczy, P. (2008). "Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(5): 355-366.
- Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(10): 777-788.
- Grimshaw, M. J., T. Hagemann, et al. (2004). "A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion." *Cancer Res* 64(7): 2461-2468.
- Gross, C. G. (2000). "Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma." *Nat Rev Neurosci* 1(1): 67-73.
- Grosse-Gehling, P., C. A. Fargeas, et al. (2013). "CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges." *J Pathol* 229(3): 355-378.
- Growcott, J. W. (2009). "Preclinical anticancer activity of the specific endothelin A receptor antagonist ZD4054." *Anticancer Drugs* 20(2): 83-88.
- Gupta, P. B., C. M. Fillmore, et al. (2011). "Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells." *Cell* 146(4): 633-644.
- Hadjipanayis, C. G. and E. G. Van Meir (2009). "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies." *Trends Mol Med* 15(11): 519-530.
- Hamburger, A. W. and S. E. Salmon (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." *Science* 197(4302): 461-463.
- He, J., G. Zhang, et al. (2012). "How variable clones build an invariant retina." *Neuron* 75(5): 786-798.
- He, S., D. Nakada, et al. (2009). "Mechanisms of stem cell self-renewal." *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 377-406.
- Heddleston, J. M., Z. Li, et al. (2009). "The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype." *Cell Cycle* 8(20): 3274-3284.
- Herman, J. G., J. R. Graff, et al. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18): 9821-9826.
- Hermann, P. C., S. L. Huber, et al. (2007). "Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer." *Cell Stem Cell* 1(3): 313-323.
- Hewitt, H. B. (1958). "Studies of the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocytic leukaemia of CBA mice." *Br J Cancer* 12(3): 378-401.
- Hochedlinger, K. and R. Jaenisch (2006). "Nuclear reprogramming and pluripotency." *Nature* 441(7097): 1061-1067.
- Holland, E. C., J. Celestino, et al. (2000). "Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice." *Nat Genet* 25(1): 55-57.
- Hovinga, K. E., F. Shimizu, et al. (2010). "Inhibition of notch signaling in glioblastoma targets cancer stem cells via an endothelial cell intermediate." *Stem Cells* 28(6): 1019-1029.
- Huff, C.A., Matsui, W. et al. (2006). "The paradox of response and survival in cancer therapeutics". *Blood* 107:431-434.
- Iglarz, M., C. Binkert, et al. (2008). "Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist." *J Pharmacol Exp Ther* 327(3): 736-745.
- Ignatova, T. N., V. G. Kukekov, et al. (2002). "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro." *Glia* 39(3): 193-206.

- Ino, Y., R. A. Betensky, et al. (2001). "Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis." *Clin Cancer Res* 7(4): 839-845.
- Irani, S., A. Salajegheh, et al. (2014). "A review of the profile of endothelin axis in cancer and its management." *Crit Rev Oncol Hematol* 89(2): 314-321.
- Ishikawa, K., M. Ihara, et al. (1994). "Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(11): 4892-4896.
- Ishizawa, K., Z. A. Rasheed, et al. (2010). "Tumor-initiating cells are rare in many human tumors." *Cell Stem Cell* 7(3): 279-282.
- Ito, H, et al. (1999). "Noggin and bone morphogenetic protein-4 coordinately regulate the progression of chondrogenic differentiation in mouse clonal EC cells, ATDC5". *Biochem Biophys Res Commun*.260(1):240-4.
- Ito, M., K. Kizawa, et al. (2004). "Hair follicle stem cells in the lower bulge form the secondary germ, a biochemically distinct but functionally equivalent progenitor cell population, at the termination of catagen." *Differentiation* 72(9-10): 548-557.
- Jackson, E. and A. Brues (1941). "Studies on a Transplantable Embryoma of the Mouse " *Cancer Res* 1: 494-498.
- Jacques, T. S., A. Swales, et al. (2010). "Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes." *EMBO J* 29(1): 222-235.
- Jaks, V., N. Barker, et al. (2008). "Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells." *Nat Genet* 40(11): 1291-1299.
- James, N. D., A. Caty, et al. (2010). "Final safety and efficacy analysis of the specific endothelin A receptor antagonist zibotentan (ZD4054) in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer and bone metastases who were pain-free or mildly symptomatic for pain: a double-blind, placebo-controlled, randomized Phase II trial." *BJU Int* 106(7): 966-973.
- Jaras, M., P. Johnels, et al. (2010). "Isolation and killing of candidate chronic myeloid leukemia stem cells by antibody targeting of IL-1 receptor accessory protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(37): 16280-16285.
- Jiao, W. J., J. Xu, et al. (2007). "Effect of endothelin-1 in esophageal squamous cell carcinoma invasion and its correlation with cathepsin B." *World J Gastroenterol* 13(29): 4002-4005.
- Jin, K., L. Teng, et al. (2010). "Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review." *Clin Transl Oncol* 12(7): 473-480.
- Jin, L., K. J. Hope, et al. (2006). "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells." *Nat Med* 12(10): 1167-1174.
- Joo, K. M., S. Y. Kim, et al. (2008). "Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas." *Lab Invest* 88(8): 808-815.
- Jordan, C. T. (2009). "Cancer stem cells: controversial or just misunderstood?" *Cell Stem Cell* 4(3): 203-205.
- Kai, T. and A. Spradling (2004). "Differentiating germ cells can revert into functional stem cells in *Drosophila melanogaster* ovaries." *Nature* 428(6982): 564-569.
- Karsy, M., L. Albert, et al. (2010). "All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner." *Anticancer Res* 30(12): 4915-4920.
- Katsetos, C.D., Del Valle, L. et. al. (2001). "Aberrant localization of the neuronal class III beta-tubulin in astrocytomas". *Arch Pathol Lab Med* 125(5):613-24.

- Kefford, R., J. M. Beith, et al. (2007). "A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma." *Invest New Drugs* 25(3): 247-252.
- Kelly, P. N., A. Dakic, et al. (2007). "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells." *Science* 317(5836): 337.
- Kemper, K., P. R. Prasetyanti, et al. (2012). "Monoclonal antibodies against Lgr5 identify human colorectal cancer stem cells." *Stem Cells* 30(11): 2378-2386.
- Kennedy, J. A., F. Barabe, et al. (2007). "Comment on "Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells"." *Science* 318(5857): 1722; author reply 1722.
- Kim, C. F. and P. B. Dirks (2008). "Cancer and stem cell biology: how tightly intertwined?" *Cell Stem Cell* 3(2): 147-150.
- Kim, S., J. Han. Et al. (2011). "Silibinin suppresses EGFR ligand-induced CD44 expression through inhibition of EGFR activity in breast cancer cells". *Anticancer Res.* 2011 Nov;31(11):3767-73.
- Kleinsmith, L. J. and G. B. Pierce, Jr. (1964). "Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells." *Cancer Res* 24: 1544-1551.
- Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." *Cell* 132(4): 583-597.
- Kohn, K. W. (1996). "Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment--fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture." *Cancer Res* 56(24): 5533-5546.
- Kondo, T., T. Setoguchi, et al. (2004). "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(3): 781-786.
- Krause, C., A. Guzman, et al. (2011). "Noggin." *Int J Biochem Cell Biol* 43(4): 478-481.
- Kreso, A., C. A. O'Brien, et al. (2013). "Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer." *Science* 339(6119): 543-548.
- Kruger, G. M., J. T. Mosher, et al. (2002). "Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness." *Neuron* 35(4): 657-669.
- Krupkova, O., Jr., T. Loja, et al. (2010). "Nestin expression in human tumors and tumor cell lines." *Neoplasma* 57(4): 291-298.
- Kwon, C. H., D. Zhao, et al. (2008). "Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas." *Cancer Res* 68(9): 3286-3294.
- Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2012). "Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development." *Curr Opin Neurobiol* 22(5): 737-746.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* 367(6464): 645-648.
- Lapouge, G., B. Beck, et al. (2012). "Skin squamous cell carcinoma propagating cells increase with tumour progression and invasiveness." *EMBO J* 31(24): 4563-4575.
- Lapouge, G., K. K. Youssef, et al. (2011). "Identifying the cellular origin of squamous skin tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(18): 7431-7436.
- Lathia, J. D., J. Gallagher, et al. (2010). "Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells." *Cell Stem Cell* 6(5): 421-432.
- Lawson, D. A., L. Xin, et al. (2007). "Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(1): 181-186.
- Lee, J., S. Kotliarova, et al. (2006). "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines." *Cancer Cell* 9(5): 391-403.

- Lee, J., M. J. Son, et al. (2008). "Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells." *Cancer Cell* 13(1): 69-80.
- Lee, Y., A. C. Scheck, et al. (2008). "Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age." *BMC Med Genomics* 1: 52.
- Leon, S. P., R. D. Folkerth, et al. (1996). "Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors." *Cancer* 77(2): 362-372.
- Lepinoux-Chambaud, C. and J. Eyer (2013). "Review on intermediate filaments of the nervous system and their pathological alterations." *Histochem Cell Biol* 140(1): 13-22.
- Lerner, B. H. (2004). "Sins of omission--cancer research without informed consent." *N Engl J Med* 351(7): 628-630.
- Leskinen-Kallio, S. (1994). "Positron emission tomography in oncology". *Clin Physiol* 14(3):329-35.
- Li, Z., S. Bao, et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells." *Cancer Cell* 15(6): 501-513.
- Liem, R. K. and A. Messing (2009). "Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease." *J Clin Invest* 119(7): 1814-1824.
- Linder, D. and S. M. Gartler (1965). "Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas." *Science* 150(3692): 67-69.
- Liu, H., M. R. Patel, et al. (2010). "Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(42): 18115-18120.
- Liu, Y., F. Ye, et al. (2011). "Autocrine endothelin-3/endothelin receptor B signaling maintains cellular and molecular properties of glioblastoma stem cells." *Mol Cancer Res* 9(12): 1668-1685.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Louis, D. N. (2006). "Molecular pathology of malignant gliomas." *Annu Rev Pathol* 1: 97-117.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." *Acta Neuropathol* 114(2): 97-109.
- Luo, Y., J. Cai, et al. (2002). "Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells." *J Neurochem* 83(6): 1481-1497.
- M, A. (1907). "Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid." *Verhandl. Deutsch. Pathol* 11: 39-82.
- Maher, E. A., F. B. Furnari, et al. (2001). "Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter." *Genes Dev* 15(11): 1311-1333.
- Majeti, R., C. Y. Park, et al. (2007). "Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood." *Cell Stem Cell* 1(6): 635-645.
- Malanchi, I., H. Peinado, et al. (2008). "Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling." *Nature* 452(7187): 650-653.
- Malanchi, I., A. Santamaria-Martinez, et al. (2012). "Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization." *Nature* 481(7379): 85-89.
- Mani, S. A., W. Guo, et al. (2008). "The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells." *Cell* 133(4): 704-715.
- Martelli, A. M., C. Evangelisti, et al. (2011). "Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells." *Curr Med Chem* 18(18): 2715-2726.

- Marumoto, T., A. Tashiro, et al. (2009). "Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors." *Nat Med* 15(1): 110-116.
- Mascré, G., S. Dekoninck, et al. (2012). "Distinct contribution of stem and progenitor cells to epidermal maintenance." *Nature* 489(7415): 257-262.
- Mc Lendon R. et. al. (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* 455(7216): 1061-1068.
- Meyer, M. J., J. M. Fleming, et al. (2010). "CD44posCD49fhiCD133/2hi defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer." *Cancer Res* 70(11): 4624-4633.
- Milstein, C., et. al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 32, 31 (1967).
- Ming, G. L. and H. Song (2005). "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system." *Annu Rev Neurosci* 28: 223-250.
- Mohrin, M., E. Bourke, et al. (2010). "Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis." *Cell Stem Cell* 7(2): 174-185.
- Molyneux, G., F. C. Geyer, et al. (2010). "BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells." *Cell Stem Cell* 7(3): 403-417.
- Morel, A. P., M. Lievre, et al. (2008). "Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition." *PLoS One* 3(8): e2888.
- Morrison, L. C., R. McClelland, et al. (2013). "Deconstruction of medulloblastoma cellular heterogeneity reveals differences between the most highly invasive and self-renewing phenotypes." *Neoplasia* 15(4): 384-398.
- Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." *Cell* 132(4): 598-611.
- Morrison, S. J. and I. L. Weissman (1994). "The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype." *Immunity* 1(8): 661-673.
- Morrison, S. J., P. M. White, et al. (1999). "Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells." *Cell* 96(5): 737-749.
- Morshead, C. M., B. A. Reynolds, et al. (1994). "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells." *Neuron* 13(5): 1071-1082.
- Morton, C. L. and P. J. Houghton (2007). "Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice." *Nat Protoc* 2(2): 247-250.
- Naidoo, V., S. Naidoo, et al. (2004). "Cellular distribution of the endothelin system in the human brain." *J Chem Neuroanat* 27(2): 87-98.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, et al. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." *Nat Biotechnol* 26(1): 101-106.
- Nakagawa, T., M. Sharma, et al. (2010). "Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment." *Science* 328(5974): 62-67.
- Nakano, I., K. Saigusa, et al. (2008). "BMPing off glioma stem cells." *Cancer Cell* 13(1): 3-4.
- Naruse, M., K. Shibasaki, et al. (2013). "Dynamic changes of CD44 expression from progenitors to subpopulations of astrocytes and neurons in developing cerebellum." *PLoS One* 8(1): e53109.
- Natali, P.G., Nicotra, M.R. et al. (1990). "Expression of the p185 encoded by HER2 oncogene in normal and transformed human tissues". *Int J Cancer* 45:457-461.
- Nduom, E. K., C. G. Hadjipanayis, et al. (2012). "Glioblastoma cancer stem-like cells: implications for pathogenesis and treatment." *Cancer J* 18(1): 100-106.

- Nelson, J. B., K. Chan-Tack, et al. (1996). "Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer." *Cancer Res* 56(4): 663-668.
- Nguyen, L. V., R. Vanner, et al. (2012). "Cancer stem cells: an evolving concept." *Nat Rev Cancer* 12(2): 133-143.
- Nigro, J. M., M. A. Takahashi, et al. (2001). "Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay." *Am J Pathol* 158(4): 1253-1262.
- Notta, F., C. G. Mullighan, et al. (2011). "Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells." *Nature* 469(7330): 362-367.
- Nunes, M. C., N. S. Roy, et al. (2003). "Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain." *Nat Med* 9(4): 439-447.
- Nutt, C. L., D. R. Mani, et al. (2003). "Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification." *Cancer Res* 63(7): 1602-1607.
- O'Brien, C. A., A. Pollett, et al. (2007). "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice." *Nature* 445(7123): 106-110.
- O'Brien, L. E., S. S. Soliman, et al. (2011). "Altered modes of stem cell division drive adaptive intestinal growth." *Cell* 147(3): 603-614.
- Ogden, A. T., A. E. Waziri, et al. (2008). "Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas." *Neurosurgery* 62(2): 505-514; discussion 514-505.
- Pallini, R., L. Ricci-Vitiani, et al. (2008). "Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme." *Clin Cancer Res* 14(24): 8205-8212.
- Pallini, R., L. Ricci-Vitiani, et al. (2011). "Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis." *Cancer* 117(1): 162-174.
- Palmer, T. D., A. R. Willhoite, et al. (2000). "Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis." *J Comp Neurol* 425(4): 479-494.
- Palmisano, W. A., K. K. Divine, et al. (2000). "Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum." *Cancer Res* 60(21): 5954-5958.
- Panchision, D. M. and R. D. McKay (2002). "The control of neural stem cells by morphogenic signals." *Curr Opin Genet Dev* 12(4): 478-487.
- Pang, R., W. L. Law, et al. (2010). "A subpopulation of CD26+ cancer stem cells with metastatic capacity in human colorectal cancer." *Cell Stem Cell* 6(6): 603-615.
- Paolillo, M., A. Barbieri, et al. (2006). "Expression of endothelins and their receptors in glioblastoma cell lines." *J Neurooncol* 79(1): 1-7.
- Paolillo, M., M. A. Russo, et al. (2010). "Endothelin B receptor antagonists block proliferation and induce apoptosis in glioma cells." *Pharmacol Res* 61(4): 306-315.
- Partap, S., E. K. Curran, et al. (2009). "Medulloblastoma incidence has not changed over time: a CBTRUS study." *J Pediatr Hematol Oncol* 31(12): 970-971.
- Pastrana, E., V. Silva-Vargas, et al. (2011). "Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells." *Cell Stem Cell* 8(5): 486-498.
- Peh G. S. et al. (2009). "CD133 expression by neural progenitors derived from human embryonic stem cells and its use for their prospective isolation". *Stem Cells Dev.* 2009 Mar; 18(2):269-82.
- Perry, J. R. (2001). "Oligodendrogliomas: clinical and genetic correlations." *Curr Opin Neurol* 14(6): 705-710.
- Pfenninger, C.V. et al. (2007). "CD133 Is Not Present on Neurogenic Astrocytes in the Adult Subventricular Zone, but on Embryonic Neural Stem Cells, Ependymal Cells, and Glioblastoma Cells". *Cancer Res* 67(12):5727-36.

- Phillips, H. S., S. Kharbanda, et al. (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." *Cancer Cell* 9(3): 157-173.
- Piccirillo, S. G., B. A. Reynolds, et al. (2006). "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells." *Nature* 444(7120): 761-765.
- Pierce, G. B. and W. C. Speers (1988). "Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation." *Cancer Res* 48: 1996-2004.
- Pierce, G. B. and C. Wallace (1971). "Differentiation of malignant to benign cells." *Cancer Res* 31(2): 127-134.
- Pollard, S. M., K. Yoshikawa, et al. (2009). "Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens." *Cell Stem Cell* 4(6): 568-580.
- Pollard, S. M., K. Yoshikawa, et al. (2009). "Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens." *Cell Stem Cell* 4(6): 568-580.
- Ponti, D., A. Costa, et al. (2005). "Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties." *Cancer Res* 65(13): 5506-5511.
- Postiglione, M. P., C. Juschke, et al. (2011). "Mouse inscuteable induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex." *Neuron* 72(2): 269-284.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2010). "Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized." *Cancer Cell* 18(5): 510-523.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature* 456(7222): 593-598.
- Raaijmakers, M. H., S. Mukherjee, et al. (2010). "Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia." *Nature* 464(7290): 852-857.
- Rahman, M., B. Hoh, et al. (2012). "The future of glioma treatment: stem cells, nanotechnology and personalized medicine." *Future Oncol* 8(9): 1149-1156.
- Raso, A., S. Mascelli, et al. (2011). "High levels of PROM1 (CD133) transcript are a potential predictor of poor prognosis in medulloblastoma." *Neuro Oncol* 13(5): 500-508.
- Reifenberger, G. and D. N. Louis (2003). "Oligodendroglioma: toward molecular definitions in diagnostic neuro-oncology." *J Neuropathol Exp Neurol* 62(2): 111-126.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* 414(6859): 105-111.
- Reynolds, B. A. and R. L. Rietze (2005). "Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship." *Nat Methods* 2(5): 333-336.
- Reynolds, B. A. and A. L. Vescovi (2009). "Brain cancer stem cells: Think twice before going flat." *Cell Stem Cell* 5(5): 466-467; author reply 468-469.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." *Science* 255(5052): 1707-1710.
- Ricci-Vitiani, L., D. G. Lombardi, et al. (2007). "Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells." *Nature* 445(7123): 111-115.
- Ricci-Vitiani, L., R. Pallini, et al. (2010). "Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells." *Nature* 468(7325): 824-828.
- Richards, L. J., T. J. Kilpatrick, et al. (1992). "De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(18): 8591-8595.
- Rosano, L., V. Di Castro, et al. (2007). "ZD4054, a specific antagonist of the endothelin A receptor, inhibits tumor growth and enhances paclitaxel activity in human ovarian carcinoma in vitro and in vivo." *Mol Cancer Ther* 6(7): 2003-2011.

- Rowley, J.D. (1973). "A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining". *Nature* 243:290–293.
- Sandberg, A. A. and D. K. Hossfeld (1970). "Chromosomal abnormalities in human neoplasia." *Annu Rev Med* 21: 379-408.
- Schatton, T., G. F. Murphy, et al. (2008). "Identification of cells initiating human melanomas." *Nature* 451(7176): 345-349.
- Schepers, A. G., H. J. Snippert, et al. (2012). "Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas." *Science* 337(6095): 730-735.
- Scherer, H. J. (1940). "A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas." *J Neurol Psychiatry* 3(2): 147-177.
- Schofield, R. (1978). "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." *Blood Cells* 4(1-2): 7-25.
- Schulte, A., H. S. Gunther, et al. (2012). "Glioblastoma stem-like cell lines with either maintenance or loss of high-level EGFR amplification, generated via modulation of ligand concentration." *Clin Cancer Res* 18(7): 1901-1913.
- Setoguchi, T., T. Taga, et al. (2004). "Cancer stem cells persist in many cancer cell lines." *Cell Cycle* 3(4): 414-415.
- Shackleton, M., F. Vaillant, et al. (2006). "Generation of a functional mammary gland from a single stem cell." *Nature* 439(7072): 84-88.
- Sharma, S. V., D. Y. Lee, et al. (2010). "A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations." *Cell* 141(1): 69-80.
- Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2007). "How stem cells age and why this makes us grow old." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9): 703-713.
- Shen, Q., S. K. Goderie, et al. (2004). "Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells." *Science* 304(5675): 1338-1340.
- Shen, Q., Y. Wang, et al. (2008). "Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions." *Cell Stem Cell* 3(3): 289-300.
- Shmelkov, S. V., J. M. Butler, et al. (2008). "CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors." *J Clin Invest* 118(6): 2111-2120.
- Siebzehnruhl, F. A., D. J. Silver, et al. (2013). "The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance." *EMBO Mol Med* 5(8): 1196-1212.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* 63(18): 5821-5828.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* 432(7015): 396-401.
- Smollich, M., M. Gotte, et al. (2007). "On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 106(3): 361-369.
- Snippert, H. J. and H. Clevers (2011). "Tracking adult stem cells." *EMBO Rep* 12(2): 113-122.
- Snippert, H. J., L. G. van der Flier, et al. (2010). "Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells." *Cell* 143(1): 134-144.
- Son, M. J., K. Woolard, et al. (2009). "SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma." *Cell Stem Cell* 4(5): 440-452.
- Song, H. R., I. Gonzalez-Gomez, et al. (2010). "Nuclear factor IA is expressed in astrocytomas and is associated with improved survival." *Neuro Oncol* 12(2): 122-132.
- Sontheimer, R. D. and J. N. Gilliam (1981). "Immunologically mediated epidermal cell injury." *Springer Semin Immunopathol* 4(1): 1-15.

- Sotiropoulou, P. A., A. Candi, et al. (2010). "Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death." *Nat Cell Biol* 12(6): 572-582.
- Spinella, F., L. Rosano, et al. (2007). "Endothelin-1 and endothelin-3 promote invasive behavior via hypoxia-inducible factor-1alpha in human melanoma cells." *Cancer Res* 67(4): 1725-1734.
- Spinella, F., L. Rosano, et al. (2002). "Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells." *J Biol Chem* 277(31): 27850-27855.
- Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, et al. (2001). "Stem cells find their niche." *Nature* 414(6859): 98-104.
- Stewart, J. M., P. A. Shaw, et al. (2011). "Phenotypic heterogeneity and instability of human ovarian tumor-initiating cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(16): 6468-6473.
- Strowig, T., A. Rongvaux, et al. (2011). "Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-gamma(c)-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(32): 13218-13223.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005). "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* 352(10): 987-996.
- Suh, H., A. Consiglio, et al. (2007). "In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus." *Cell Stem Cell* 1(5): 515-528.
- Suh, H., W. Deng, et al. (2009). "Signaling in adult neurogenesis." *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 253-275.
- Sun, Y., S. Pollard, et al. (2008). "Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture." *Mol Cell Neurosci* 38(2):245-58.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-872.
- Taylor, M. D., H. Poppleton, et al. (2005). "Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma." *Cancer Cell* 8(4): 323-335.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." *Cell* 139(5): 871-890.
- Till, J. E. and C. E. Mc (1961). "A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells." *Radiat Res* 14: 213-222.
- Tropepe, V., M. Sibilila, et al. (1999). "Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon." *Dev Biol* 208(1): 166-188.
- Tveit, K. M. and A. Pihl (1981). "Do cell lines in vitro reflect the properties of the tumours of origin? A study of lines derived from human melanoma xenografts." *Br J Cancer* 44(6): 775-786.
- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(26): 14720-14725.
- Valent, P., D. Bonnet, et al. (2012). "Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details." *Nat Rev Cancer* 12(11): 767-775.
- van Es, J. H., T. Sato, et al. (2012). "Dll1+ secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage." *Nat Cell Biol* 14(10): 1099-1104.
- Van Keymeulen, A. and C. Blanpain (2012). "Tracing epithelial stem cells during development, homeostasis, and repair." *J Cell Biol* 197(5): 575-584.
- van Rhenen, A., N. Feller, et al. (2005). "High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival." *Clin Cancer Res* 11(18): 6520-6527.

- van Rhenen, A., G. A. van Dongen, et al. (2007). "The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells." *Blood* 110(7): 2659-2666.
- Venere, M., H. A. Fine, et al. (2011). "Cancer stem cells in gliomas: identifying and understanding the apex cell in cancer's hierarchy." *Glia* 59(8): 1148-1154.
- Verma, S., Miles, D. et al. (2012). "Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer". *N Engl J Med* 367:1783–1791.
- Vermeulen, L., E. M. F. De Sousa, et al. (2010). "Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment." *Nat Cell Biol* 12(5): 468-476.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2012). "Cancer stem cells: current status and evolving complexities." *Cell Stem Cell* 10(6): 717-728.
- Voigt, M., F. Braig, et al. (2012). "Functional dissection of the epidermal growth factor receptor epitopes targeted by panitumumab and cetuximab." *Neoplasia* 14(11): 1023-1031.
- Vredenburgh, J. J., A. Desjardins, et al. (2007). "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma." *Clin Cancer Res* 13(4): 1253-1259.
- Wang, J., P. O. Sakariassen, et al. (2008). "CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells." *Int J Cancer* 122(4): 761-768.
- Wang, R., K. Chadalavada, et al. (2010). "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium." *Nature* 468(7325): 829-833.
- Wang, R., C. V. Lohr, et al. (2013). "Epigenetic inactivation of endothelin-2 and endothelin-3 in colon cancer." *Int J Cancer* 132(5): 1004-1012.
- Wang, Z., Y. Li, et al. (2009). "Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway." *Cancer Res* 69(6): 2400-2407.
- Ward, R. J. and P. B. Dirks (2007). "Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development." *Annu Rev Pathol* 2: 175-189.
- Weigmann, A., D. Corbeil, et al. (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(23): 12425-12430.
- Weiss, S., B. A. Reynolds, et al. (1996). "Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain?" *Trends Neurosci* 19(9): 387-393.
- Williams, S. A., W. C. Anderson, et al. (2013). "Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century." *Lab Invest* 93(9): 970-982.
- Wilson, A., E. Laurenti, et al. (2008). "Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair." *Cell* 135(6): 1118-1129.
- Wunderlich, M., F. S. Chou, et al. (2010). "AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3." *Leukemia* 24(10): 1785-1788.
- Yamanaka, H., H. Gatanaga, et al. (2007). "Novel mutation of human DNA polymerase gamma associated with mitochondrial toxicity induced by anti-HIV treatment." *J Infect Dis* 195(10): 1419-1425.
- Yang, L., D. Bryder, et al. (2005). "Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients." *Blood* 105(7): 2717-2723.
- Yi, D., T. X. Hua, et al. (2011). "Antitumor treatment efficacy by targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in an orthotopic human glioblastoma model." *J Neurooncol* 104(1): 93-101.

- Yin, A. H., S. Miraglia, et al. (1997). "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* 90(12): 5002-5012.
- Ying, M., S. Wang, et al. (2011). "Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition." *Oncogene* 30(31): 3454-3467.
- Yosida, T. H. (1975). "Handbuch der Allgemeinen Pathologic." Springer-Verlag: 677.
- Youssef, K. K., A. Van Keymeulen, et al. (2010). "Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma." *Nat Cell Biol* 12(3): 299-305.
- Zbinden, M., A. Duquet, et al. (2010). "NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53." *EMBO J* 29(15): 2659-2674.
- Zeppernick, F., R. Ahmadi, et al. (2008). "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients." *Clin Cancer Res* 14(1): 123-129.
- Zhang, S., C. Balch, et al. (2008). "Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors." *Cancer Res* 68(11): 4311-4320.
- Zhang, X. Q. and S. C. Zhang (2010). "Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells." *Methods Mol Biol* 584: 355-366.
- Zheng, H., H. Ying, et al. (2010). "PLAGL2 regulates Wnt signaling to impede differentiation in neural stem cells and gliomas." *Cancer Cell* 17(5): 497-509.
- Zhou, B. B., H. Zhang, et al. (2009). "Tumour-initiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 8(10): 806-823.
- Zoller, M. (2011). "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?" *Nat Rev Cancer* 11(4): 254-267.
- Zomer, A., S. I. Ellenbroek, et al. (2013). "Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors." *Stem Cells* 31(3): 602-606.