

# Importancia de Células Madre Tumoraes y Cultivos de Neuroesferas en Neurooncología

Dr. Emmanuelle Vargas Valenciano

emanuelv14@gmail.com

Programa de Investigación en Neurocirugía y Órganos de los Sentidos.

Departamento de Fisiología, Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica–Caja Costarricense de Seguro Social. San Jose, Costa Rica

Dr. Miguel Ángel Esquivel Miranda

Programa de Investigación en Neurocirugía y Órganos de los Sentidos.

Escuela de Medicina de la Universidad de Costa Rica–Caja Costarricense de Seguro Social. San Jose, Costa Rica

Servicio de Neurocirugía, Hospital México. San Jose, Costa Rica

## Resumen

En el presente artículo, se revisa la importancia de las nuevas teorías sobre la formación de los tumores cerebrales y el rol de las células madre en las mismas. La evidencia científica está cambiando el concepto que se tenía sobre la proliferación de una única célula adulta como la causa de la formación del tumor cerebral a una nueva perspectiva de una “célula madre tumoral cerebral” o una célula progenitora con un ciclo celular desregulado así como aberraciones genéticas y alteración en la expresión proteica como la causa potencial de génesis tumoral. Actualmente, se ha logrado la formación de cultivos de estas células en el laboratorio, obteniendo estructuras esféricas compuestas por células madre tumorales, células progenitoras y células nerviosas adultas, denominadas neuroesferas, las cuales presentan un gran potencial como modelo celular para estudios de biología molecular tumoral y farmacología antitumoral, así como por su posible utilización como marcadores pronósticos de sobrevida global y sobrevida libre de enfermedad en estos pacientes.

**Palabras clave:** Tumor cerebral, neoplasia malignas, células madre, , neurocirugía.

## Abstract

In this article, it's reviewed the importance of the new theories about the formation of brain tumors and the role the stem cells have in it. The scientific evidence is changing the concept we had about the proliferation of a single adult cell as the cause of the tumor formation to a new perspective of a “brain tumor” stem cell or a progenitor cell with an unregulated cell cycle and a series of genetic aberrations and anomalous protein expression as the potential cause of tumoral genesis. Actually, there are techniques to culture this cell in a laboratory, obtaining structures known as neurospheres, which have a huge potential as a cell model for tumoral molecular biology and antitumoral pharmacologic investigations and have a possible use as a prognostic marker of survival and tumoral progression in this patients.

**Keywords:** Brain Tumors, Malignant, Neoplastic Stem Cells, Tumor Cell Line, neurosurg.

## Introducción

La biología molecular tumoral ha presentado numerosos avances en las últimas décadas con la descripción de nuevas vías metabólicas y nuevos marcadores pronósticos a partir de estudios con cultivos celulares. Dentro de los cambios más

importantes se encuentra el posible papel desempeñado por las células madre en la formación tumoral. El presente artículo pretende realizar una revisión de la literatura sobre este importante tópico y sus implicaciones en la práctica clínica neurooncológica, con el fin de mejorar la atención brindada a nuestros pacientes.

## Generalidades

Las neoplasias actualmente presentan un importante aumento de su incidencia a nivel mundial y nacional, constituyendo la segunda causa de mortalidad en nuestro país de acuerdo con los datos más recientes<sup>[1]</sup>. Dentro del total de neoplasias, los tumores del Sistema Nervioso Central, de acuerdo a los datos del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, presentan una mortalidad aproximada de 115 casos por año<sup>[2]</sup>, correspondiendo al 2,67% de las muertes por cáncer en el año 2010. Actualmente el protocolo de manejo de mayor aceptación a nivel mundial es conocido como el protocolo de Stupp, el cual incluye resección tumoral, quimioterapia y radioterapia<sup>[3]</sup>.

## Células Madre

Las células madre son un subgrupo del total de células de un organismo que presentan como características la capacidad de autoregeneración, es decir, producir nuevas células idénticas al ser colocadas en un medio de cultivo apropiado; y la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares<sup>[4]</sup>.

El término de célula madre se adoptó desde el año 1908, acuñado por el histólogo de origen ruso, Alexander Maksimov durante un congreso de hematología, al estudiar la diferenciación de las distintas células sanguíneas<sup>[5]</sup>. Posteriormente, a inicios de la década de los años sesenta, del siglo anterior, se logra demostrar la existencia de éstas células madre con capacidad de autoregeneración y su proliferación a nivel de la médula ósea. Asimismo, en el año 1957 se inicia la utilización de células madre en la práctica clínica al realizarse el primer trasplante de médula ósea en 6 pacientes con una afección hematológica<sup>[6,7]</sup>.

En el año 1978, se descubre la presencia de células madre sanguíneas en el cordón umbilical de ratón y humano, marcando el inicio del estudio de células madre embrionarias<sup>[8,9]</sup>. Posteriormente, se han logrado ubicar células madre en tejido adulto prácticamente en todos los tipos de tejidos corporales y aún más, recientemente se ha logrado la manipulación de células diferenciadas adultas para producir células madre indiferenciadas, razón por la cual se han denominado células madre inducidas<sup>[10]</sup>.

### Células Madre Cerebrales

A finales del siglo antepasado, Santiago Ramón y Cajal, dentro de su doctrina neuronal, estableció que una vez que el desarrollo embrionario termina, la neurogénesis acaba y no se presenta la misma durante la vida adulta. Esta creencia conocida como el dogma central de la neurobiología se mantuvo vigente durante la mayor parte del siglo pasado<sup>[11]</sup>. Sin embargo

desde principios de los años sesenta, se realizaron estudios que sugerían lo contrario, al demostrar la presencia de neuronas en la región subventricular que captaban marcadores químicos específicos para células en división<sup>[12]</sup>, tanto a nivel de la región subventricular como posteriormente en el giro dentado del hipocampo<sup>[13]</sup>. Varios años después se demostró en ratones que la proliferación a nivel subventricular producía neuronas que migraban hasta conformarse en células granulares en el bulbo olfatorio a través de una vía denominada vía migratoria rostral<sup>[14]</sup>.

A pesar de la evidencia de estos estudios, la mayoría de la comunidad científica continuó con la creencia de que no existía la neurogénesis en mamíferos adultos. Esta situación se mantuvo hasta principios de los años noventa, cuando al realizar un cultivo de células del estriado de ratones adultos<sup>[15]</sup> propagadas en un medio de cultivo adicionado de factor de crecimiento epidérmico, se desarrollaron estructuras esféricas de gran tamaño, conformadas de neuronas, células gliales y un subconjunto de células con la capacidad de autoregenerarse y de producir tanto células de estirpe neuronal como glial, correspondiendo éstas a células madre neuronales<sup>[11,16]</sup>. Estas estructuras esféricas fueron denominadas a partir de entonces como neuroesferas.

Las células madre neuronales se encuentran en el adulto humano, a nivel de la región subventricular de los ventrículos laterales<sup>[17]</sup> y a nivel de la región subgranular del giro dentado<sup>[18,19]</sup>. Se cree que un subgrupo de células de la región subventricular que expresan el marcador para la proteína fibrilar ácida glial son los candidatos más fuertes para constituir el reservorio de células madre neuronales. En el caso del adulto humano se ha logrado ubicar esta zona y se ha demostrado que estas neuronas migran de forma individual hacia un destino que no ha sido dilucidado con claridad<sup>[20]</sup>. De esta manera, actualmente los estudios orientan a la existencia de un único precursor con marcadores astrocitarios que daría lugar a células neuronales y gliales maduras, contrario a la creencia previa de precursores diferentes para ambos subgrupos celulares<sup>[19,21,22,23]</sup>.

### Teoría de las Células Madre Tumorales

En décadas pasadas, la teoría de tumorigénesis cerebral se fundamentaba en la existencia de células derivadas de un único clonaje, las cuales presentaban las mismas características en cuanto a morfología, genética y bioquímica, así por ejemplo, un astrocitoma provenía de un astrocito y un oligodendroglioma de un oligodendrocito, nombrando al tumor de acuerdo a la semejanza histológica con las posibles células de origen<sup>[24]</sup>. Sin embargo, en los últimos años se ha cambiado esta visión al demostrar la presencia de un espectro de distintos tipos celulares que componen los tumores<sup>[25]</sup>, presentado

células con mayor potencial para la replicación y con capacidad de desarrollar nuevos tumores al ser transplantados a otros individuos. Estas células se conocen como células madre tumorales <sup>[25, 26]</sup>.

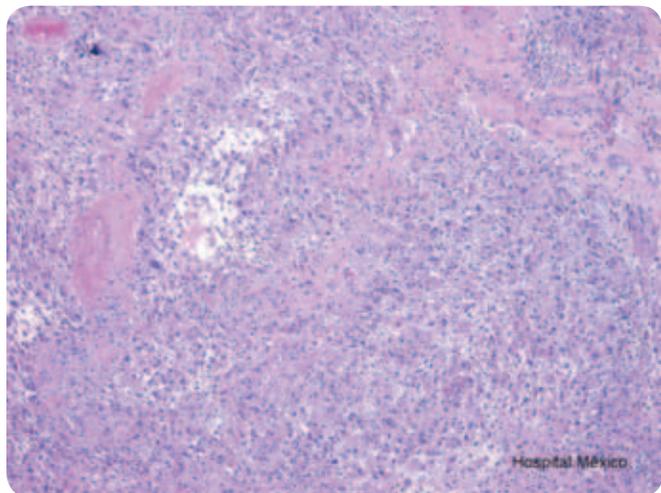


Figura 1. Imagen Histológica de Glioblastoma Multiforme, donde se observa necrosis pseudoempalizada y proliferación endotelial vascular Foto cortesía de la Dra. Eva Moreno Medina, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital México.

Los primeros indicios de la existencia de estas células en tumores cerebrales se obtuvieron en el año 2002 al documentarse células derivadas de glioblastomas que lograron cultivarse en metilcelulosa asociada a factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento fibroblástico. Estas células fueron capaces de expresar marcadores tanto de las células neuronales como células gliales, así como presentar la capacidad de autoregenerarse y la multipotencialidad, es decir las características que se creían propias de las células madre <sup>[19, 20, 21 y 27]</sup>. Estas células madre tumorales serían la causa de la formación inicial y la progresión de los tumores cerebrales. Asimismo, estas células presentan como parte de sus características una mayor resistencia a estímulos nocivos <sup>[28]</sup>.

A pesar de que hasta el momento no se ha logrado demostrar la existencia de un único marcador que permita identificar de forma fidedigna la identidad de una célula madre, se ha demostrado la presencia de diversos marcadores asociados a las mismas <sup>[20, 22]</sup>. Dentro de estos marcadores se encuentra el CD133, también denominado Prominina-1, así como el marcador A2B5 <sup>[20, 22]</sup>. Asimismo, se ha localizado la expresión dentro de estas células de proteínas embrionarias como la nestina (proteína de los filamentos intermedios) y proteínas de regulación del ciclo celular como Sonic Hedgehog así como alteraciones en las vías del factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento en-

dotelial vascular <sup>[22]</sup>.

Aunado a lo anterior, esta teoría propone un cambio en el paradigma del tratamiento para tumores cerebrales, dejando de enfocarse en las células diferenciadas de rápida división que conforman la mayor parte del tejido tumoral, para enfocarse en eliminar de forma permanente las células madre que se convierten en el origen del crecimiento tumoral <sup>[25, 26]</sup>.

#### Cultivos de Células Madre Tumorales y Neuroesferas

Dentro de los avances de laboratorio más notables en neurooncología, se encuentran los estudios realizados utilizando cultivos de células tumorales, bajo ciertas condiciones especiales, en las cuales algunas de estas células son capaces de dividirse de forma continua y desarrollar esferas clonales multipotentes llamadas neuroesferas <sup>[26]</sup>, demostrando ser un método eficaz para obtener mayores cantidades de células madre tumorales capaces de ser utilizadas para estudios de biología tumoral <sup>[26, 29]</sup>.

Inicialmente la muestra de tejido tumoral se preserva en solución salina con buffer de fosfato o en un medio de cultivo celular y se transporta en hielo al laboratorio, donde es triturada y digerida con pipetas Pasteur para homogenizar la muestra <sup>[25, 30]</sup>. Posteriormente se eliminan los eritrocitos usando un buffer de lisis eritrocitaria y se eliminan los detritos con un kit de remoción de células muertas, con lo cual se procede a cultivar las células <sup>[25]</sup>. Se han utilizado sustancias mitógenas tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) o la utilización en conjuntos de ambos, para mejorar la sobrevivencia y expansión de las células con respuesta a estas citoquinas <sup>[25, 30]</sup>.

Una vez se obtiene el cultivo tumoral, se debe verificar que corresponden a células madre. Este objetivo se logra por medio de análisis de autoregeneración (capacidad de las células de generar nuevas neuroesferas a través de varias generaciones de medios de cultivo), marcadores de células madre, diferenciación en distintas líneas celulares y capacidad tumorigénica al ser implantadas en forma subcutánea o intracranial en ratones <sup>[25]</sup>.

### Limitaciones de los estudios con Neuroesferas

Se ha postulado la posibilidad de que las neuroesferas sean el resultado de la manipulación del ambiente experimental y reflejen un artefacto más que un evento que ocurra in vivo <sup>[25]</sup>. Se ha observado que las células madre tumorales viven en un ambiente con la posibilidad de obtener rápidamente nutrientes, moléculas de señalización e incluso utilizar los vasos sanguíneos para migrar a zonas cercanas, presentando estos microambientes zonas que promueven la formación y man-

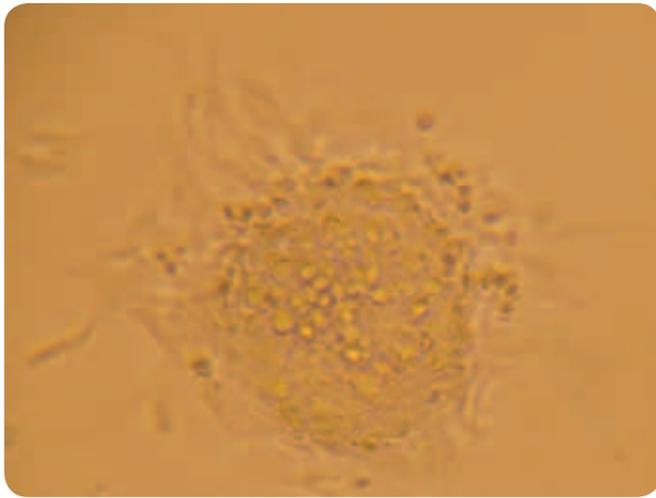


Figura 2. Cultivo de una muestra patológica de glioblastoma multiforme, que presenta una neuroesfera típica. Cortesía de la Dra. Patricia Venegas Barboza, Laboratorio de Citogenética, Hospital Nacional de Niños.

tenimiento de células madre tumorales <sup>[25, 26]</sup>. Asimismo, se ha demostrado la secreción por parte de las células tumorales cerebrales de cantidades aumentadas de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el cual explicaría el aumento de la vascularidad en estas regiones, y en estudios en desarrollo, se ha demostrado una mejoría sustancial con el uso de bloqueadores de VEGF, tales como el Bevacizumab <sup>[25, 26, 28]</sup>.

Sin embargo, la capacidad de los ensayos *in vitro* para producir un microambiente semejante al encontrado *in vivo* es dudoso. Existen restricciones geométricas por su crecimiento en esferas y restricciones en cuanto a difusión de nutrientes con generación de gradientes de los mismos así como del oxígeno y factores de crecimiento <sup>[26]</sup>.

Por otra parte, se ha observado que las neuroesferas son agregados celulares heterogéneos muy complejos, consistentes en un minoría de células madre tumorales junto con células progenitoras y células más diferenciadas <sup>[26]</sup>. Se han documentado tasas de menos de 1% que logran producir una nueva generación de forma repetitiva, por lo que algunos autores han sostenido que el uso de estos cultivos para interpretar las características moleculares de células madre tumorales es cuestionable <sup>[26]</sup>.

Otro aspecto importante, es la ausencia actualmente de un protocolo estandarizado para comparar los resultados, ya que en diferentes estudios se usan medios de cultivo con diferentes componentes y diferentes concentraciones de los mismos <sup>[26,30]</sup>.

#### Estudios farmacológicos con Neuroesferas

Se han desarrollado variados estudios con medicamentos cuya acción influye en la formación de neuroesferas en cultivos tumorales. Dentro de estos, se ha evaluado un me-

dicamento alquilante llamado Temozolamida, utilizado en el protocolo de Stupp <sup>[3]</sup>. Éste medicamento al aplicarse a cultivos tumorales, logró detener la formación de neuroesferas, de forma dosis dependiente. Sin embargo, la replicación de las células madre tumorales, se reanudó de forma marcada al término del tratamiento, sugiriendo que algunas de las células madre tumorales evaden la quimiotoxicidad y logran volver a producir neuroesferas, incluso con una velocidad mayor a la inicial <sup>[28]</sup>. Semejante efecto ejerció otro medicamento que se ha utilizado para aplicar en el lecho tumoral denominado Carmustina, el cual produjo una disminución en la formación de neuroesferas aunque con el mismo problema de recurrencia luego del tratamiento <sup>[28]</sup>.

Los inhibidores de gamma secretasa fueron utilizados en otro estudio más reciente en conjunto con la temozolamida <sup>[33]</sup>. Al aplicarse únicamente el inhibidor de la gamma secretasa, éste presenta un efecto mínimo sobre el número de neuroesferas o el tamaño de las mismas, sin embargo al utilizarse temozolamida o el inhibidor de la gamma secretasa junto con la temozolamida si logra disminuirse de forma significativa la formación de neuroesferas y el tamaño de las mismas, aunque en una proporción semejante entre ambos grupos. En contraposición a lo anterior, al documentar la recuperación del cultivo luego de la suspensión del tratamiento se observó un incremento significativo en el tamaño de las neuroesferas que recibieron temozolamida contrario a las que recibieron ambos medicamentos, las cuales se mantuvieron del mismo tamaño. Asimismo, al determinar la formación de neuroesferas secundarias se logró demostrar que la combinación de inhibidor de gamma secretasa con temozolamida presenta una disminución significativa en la formación de neuroesferas secundarias en comparación con la temozolamida sola <sup>[33]</sup>.

De la misma manera, se han desarrollado fragmentos de anticuerpos y anticuerpos enteros que tienen como blanco las células madre tumorales dentro de las neuroesferas, especialmente las productoras de CD133 (marcador asociado a células madre tumorales cerebrales), los cuales logran disminuir de forma significativa la proliferación de neuroesferas y tienen la ventaja de ser anticuerpos de internalización, los cuales permiten desarrollar estrategias basadas en la entrega intracelular de medicamentos, nanopartículas u otros tóxicos <sup>[34]</sup>.

#### Relación de Neuroesferas con la Evolución Clínica

En varios estudios realizados, se ha logrado documentar una relación estadísticamente significativa entre la formación de las neuroesferas y un deterioro mayor en la evolución del paciente portador de un tumor del neuroepitelio primario, tanto adulto <sup>[29]</sup> como pediátrico <sup>[31]</sup>.

En el caso de los pacientes adultos, en el año 2009 se publicó un estudio con una cohorte de 32 pacientes portadores

de tumores gliales, en su gran mayoría en grados avanzados (8 pacientes grado III y 17 pacientes grado IV), a los cuales se les determinó la sobrevida global y la sobrevida libre de enfermedad, asociándolas con la formación o no de neuroesferas en los cultivos de las muestras patológicas, así como la formación o no de tumoraciones al realizar un xenotransplante de neuroesferas en un modelo murino <sup>[29]</sup>.

Dentro de los resultados obtenidos, se logró demostrar formación de neuroesferas en 14 muestras del total (43%), en su mayoría provenientes de tumores grado IV (11 muestras). De la misma manera, se realizaron estudios de riesgo proporcional demostrando un riesgo de muerte de 7,71 veces en los pacientes que presentaron formación de neuroesferas en los cultivos *in vitro*, comparado con los que no lo hicieron. Asimismo, se obtuvo un riesgo de 5,83 veces de progresión de la enfermedad al realizar la misma comparación <sup>[29]</sup>.

Las muestras de tumor que fueron transplantadas en los ratones y que reprodujeron el tumor mostraron una relación significativa con progresión de la enfermedad en el grupo total de muestras y en el grupo de pacientes adultos. Asimismo, al realizar curvas de Kaplan-Meier se obtiene una sobrevida a 2 años de 31% en el segmento de la población que formó neuroesferas contrario a un 86% en los pacientes cuyas muestras no lo hicieron. De la misma forma, en el subgrupo de glioblastoma multiforme se repitió la relación con sobrevida a 2 años si formaban neuroesferas y 100% sobrevida en los que no las formaban <sup>[29]</sup>. También se valoró el promedio de sobrevida libre de enfermedad en ambos grupos, documentándose un promedio de 370 días en los pacientes formadores de neuroesferas contrario a 700 días en los no formadores, así como 350 días versus 650 días en cuanto a la formación o no de nuevos tumores en los animales xenotransplantados, respectivamente <sup>[29]</sup>.

En otro análisis realizado, la medición de Ki-67 (marcador utilizado actualmente para medir la tasa de proliferación celular) se asocia significativamente de forma proporcional, es decir, a mayor medición de Ki-67 se obtuvo mayor probabilidad de presentar neuroesferas y xenotransplantes positivos. Sin embargo, al realizar un análisis multivariado se logró comprobar que la formación de neuroesferas fue un factor pronóstico independiente e incluso más robusto que la medición de Ki-67 <sup>[29]</sup>.

Por otro lado, en un estudio más reciente se analizó esta relación en pacientes con tumores cerebrales pediátricos, en una población de 56 pacientes, siendo en este caso tanto tumores gliales como de estirpe embrionaria y mixta glioneural (33, 14 y 12 respectivamente). Se logró un total de 21 cultivos de neuroesferas de las 56 muestras totales (37,5%), estableciéndose una relación inversamente significativa entre forma-

ción de neuroesferas, medición de Ki-67 y grado del tumor con la edad del paciente <sup>[31]</sup>.

Asimismo, se estableció que la probabilidad de formar neuroesferas es 3,8 veces mayor en los pacientes portadores de gliomas de alto grado comparado con los de bajo grado, así como 5,7 veces más probable en los tumores embrionarios que en los gliomas de bajo grado. Por otra parte, se encontró una relación significativa entre los valores de Ki-67 y la formación de neuroesferas para la población total y la subpoblación de gliomas <sup>[31]</sup>. Por otra parte, al realizar un análisis de acuerdo al tipo de tratamiento realizado al paciente, se observó que en aquellos que únicamente se realizaron cirugía (n=32), se obtuvo mayor dificultad para la reseccabilidad de los tumores cuyas muestras presentaban formación de neuroesferas <sup>[31]</sup>.

De la misma manera que en el estudio anterior, se realizó un análisis del riesgo de muerte y progresión de acuerdo a la formación o no de neuroesferas en los diferentes subgrupos histológicos, demostrando que los pacientes con tumores ganglioneurales mixtos no presentaban ninguna relación significativa, mientras que en la población total y en los pacientes con tumores de estirpe embrionaria o meduloblastomas sí presentaban una relación significativa con muerte y progresión. En el caso de los tumores gliales, se observó un resultado semejante al estudio anterior, con evidencia estadísticamente significativa para la relación con progresión, no así con el riesgo de muerte <sup>[31]</sup>.

Estos dos estudios obtienen como resultado que la formación de neuroesferas es un factor predictivo de progresión tumoral, sin embargo no logran demostrar una relación significativa como predictor de la sobrevida global de la enfermedad. De igual manera, ambos estudios demuestran que el grado tumoral continúa siendo el parámetro más importante de predicción de la sobrevida global. Estos resultados son explicados por los autores aduciendo que el proceso de progresión es directamente dependiente del contenido de células madre tumorales. Por el contrario, la sobrevida del paciente dependería de otros factores no necesariamente relacionados con las células madre tumorales, por lo que no presenta una relación significativa <sup>[29]</sup>. Asimismo, se ha demostrado que la utilización de neuroesferas incluso es un predictor más robusto que otros métodos utilizados actualmente como la medición de los niveles de Ki-67. Sin embargo, aún resta realizar una mayor cantidad de estudios para lograr esclarecer todas estas relaciones.

En Costa Rica existe la posibilidad de realizar estudios con cultivos de células tumorales cerebrales y neuroesferas, siendo el laboratorio de citogenética del Hospital Nacional de Niños pionero en este campo a nivel nacional. Toda la información reciente permite inferir que a través de la biología mo-

lecular y el cultivo de neuroesferas en los tumores cerebrales, se podría mejorar la atención de los pacientes, al contar con mayor información para tomar decisiones terapéuticas.

## Agradecimientos

Se agradece a la Dra. Eva Moreno Medina, del Servicio de Patología del Hospital México, a las Dras. Patricia Venegas Barboza, Lucy Serrano Hidalgo y Catalina Obando Jiménez, del laboratorio de Citogenética del Hospital Nacional de Niños y al personal médico del Servicio de Neurocirugía del Hospital México por su gran colaboración.

## Referencias

1. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Total de Defunciones por grupos de edades, según causa de muerte y sexo. 2010. San José, Costa Rica.
2. Instituto Nacional de Estadística y Censos. Total de Defunciones por grupo de edades, según grandes grupos de causas de muerte y sexo. 2010. San José, Costa Rica.
3. Stupp R. et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med*. 2005 352: 987-996.
4. Gotz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 6: 777-788.
5. Konstantinov I. In search of Alexander A. Maximov: the man behind the Unitarian Theory of Hematopoiesis, *Perspectives of Biology and Medicine*. 2000 43: 269-276.
6. León-Rodríguez, E. Hematopoietic stem-cell transplantation: a long way, from animal models to a standard treatment in human, *Rev invest Clín* 2005 57 (2): 129-131.
7. Thomas ED. et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy, *N Engl Med*. 1957 257: 491-496.
8. Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011 12: 680-686.
9. Thomson JA. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*. 1998 282: 1145-1147.
10. Yu J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*. 2007 318: 1917-1920.
11. Kornblum, HI. Introduction to neural stem cells, *Stroke*. 2007 38: 810-816.
12. Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals?, *Science*. 1962 135: 1127-1128.
13. Altman, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats, *Anat Rec*. 1963 145: 573-591.
14. Altman, J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb, *J Comp Neurol*. 1969 137: 433-457.
15. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, *Science*. 1992 255: 1707-1710.
16. Luskin, MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone, *Neuron*. 1993 11: 173-189.
17. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 90: 2074-2077.
18. Gage, FH. et al. Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus, *J Neurobiol*. 1998 36: 249-266.
19. Das, S et al. Cancer stem cells and glioma, *Nature Clinical Practice Neurology*. 2008 4 (8): 427-435.
20. Vescovi, A; Galli, R; Reynolds, B. Brain Tumor Stem Cells, *Nature Review Cancer*. 2006 6: 425-436.
21. Wen, P; Santosh, K. Malignant Gliomas in Adults, *New Engl Med*. 2008 359: 492-507.
22. Cheshier, S. et al. A neurosurgeon's guide to stem cells, cancer stem cells and brain tumor stem cells, *Neurosurgery*. 2009 65: 237-250.
23. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells, *Nat Rev Neurosci*. 2001 2: 287-293.
24. Kumar VA, A; Fausto, N. Patología Estructural y Funcional, Editorial Elsevier. 2005.
25. Gursel, DB. et al. Glioblastoma Stem-Like Cells-Biology and Therapeutic Implications, *Cancers (Basel)*. 2011 3: 2655-2666.
26. Feng, W. The utility and limitations of Neurosphere Assay, CD133, Immunophenotyping and Side Population Assay in Glioma Stem Cell Research, *Brain Pathology*. 2010 20: 877-889.
27. Ignatova, TN. et al. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro, *Glia* 2002 39: 193-206.
28. Mihaliak, A. Clinically relevant doses of chemotherapy agents reversibly blocks formation of glioblastoma neurospheres, *Cancer Letters* 2010 296: 168-177.
29. Laks DR, Masterman-Smith M, Visnyei K, Angenieux B, Orozco NM, et al. Neurosphere formation is an independent predictor of clinical outcome in malignant glioma, *Stem Cells*. 2009 27: 980-987.
30. Guerrero-Cázares HC, K; Quiñones-Hinojosa, A. Neurosphere Culture and Human Organotypic Model to Evaluate Brain Tumor Stem Cells, *Methods Mol Biol*. 2009 568: 73-83.
31. Panosyan, EH. et al. Clinical outcome in pediatric glial and embryonal brain tumors correlates with in vitro multi-passable neurosphere formation, *Pediatr Blood Cancer*. 2010 55: 644-651.
32. Gilbert, C. Gamma-Secretase Inhibitors Enhance Temozolomide Treatment of Human Gliomas by Inhibiting Neurosphere Repopulation and Xenograft Recurrence, *Cancer Res*. 2010 70: 6870-6879.
33. Zhu XB, S; Hashizume, R. Identification of Internalizing Human Single-Chain Antibodies Targeting Brain Tumor Sphere Cells, *Mol Cancer Ther*. 2010 9: 2131-2141.