

Células madre cancerosas en tumores cerebrales: El nuevo reto

Javier Neri-Hipólito, Leticia Buendía-González, Edgar Villagrán-Vargas

Departamento de Biotecnología
Universidad Autónoma del Estado de México
El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México,
javiernerihipolito@live.com.mx, lety_sax@yahoo.com.mx, villagran.e@gmail.com

Abstract— For many years, the cell that gives rise to cancer has been a subject of a strong debate. In this contribution, we provide an analysis of the basic concepts around this topic as well as a historical background concerning the evolution of the theories dealing with the initiation and progression of cancer, from the earliest studies up to the most recent investigations pointing out to the existence of Cancer Stem Cells. Particularly, we focus our attention on the study of Brain Tumor Cancer Stem Cells, since the Brain Cancers are the main cause of cancer death in children at global level. Unfortunately, there is little research about this subject due to its complexity. Finally, we show a strategy for research in the development of new protocols for Glioblastomas treatment.

Keyword— *cancer stem cell, brain neoplasm, glioblastoma.*

Resumen—La célula que da origen al cáncer ha sido un tema debatido fuertemente a través de los anales históricos de la investigación del cáncer. En esta contribución, proporcionamos un análisis de los conceptos esenciales acerca del tema en cuestión, así como una base histórica y una sinopsis de cómo las teorías de la iniciación y progresión del cáncer han evolucionado desde los primeros tiempos hasta la actualidad, esto último, en base a investigaciones recientes en pro de la existencia de las células madre del cáncer. En particular, centramos nuestra atención en el estudio en las células madre cancerosas de neoplasias cerebrales, ya que los tumores cerebrales son la principal causa de mortalidad por cáncer de niños a nivel global y en lo que menos investigación se tiene reportado por lo complicado que resulta el tema. Finalmente, exponemos una estrategia de investigación para el desarrollo de nuevos protocolos de tratamiento de Glioblastomas.

Palabras claves—*célula madre cancerosa, neoplasia cerebral, glioblastoma.*

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en América. En el 2012, causó 1,3 millones de muertes, y alarmantemente un 47% de los decesos totales ocurrieron en América Latina y el Caribe, y no solo eso, se espera que la mortalidad por cáncer en América aumente hasta 2,1 millones en el 2030 [1].

La Organización Mundial de la Salud (OMS; por su siglas en español) en conjunto con la Organización Panamericana de la Salud (OPS; por sus siglas en español) han elaborado un informe acerca del cáncer en las Américas con perfiles de distintas zonas, incluyendo México. En la Tabla 1 se muestra el número de muertes por cáncer en algunos países en la década del 2000 cada 2 años.

Tabla I. Mortalidad por cáncer en américa [1].

| Países | 2000 | 2002 | 2004 | 2006 | 2008 | 2010 |
|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Argentina | 53,260 | 52,829 | 54520 | 56,382 | 56,565 | 57,459 |
| Belice | 137 | 139 | 155 | 158 | 155 | 148 |
| E.U.A | 550,865 | 554,901 | 551,550 | 557,271 | 562,865 | 560,129 |
| México | 54,088 | 57,516 | 60,257 | 62,655 | 65,827 | 68,008 |

Con respecto a la tabla 1, los datos revelan que México está muy por encima de países latinoamericanos en cuanto al número de muertes por cáncer pues su índice de mortalidad en este rubro crece de manera alarmante.

Como se sabe de antemano, el impacto que genera el cáncer en la población es de manera homogénea, por lo tanto, es alarmante el impacto social y económico que provoca actualmente el cáncer en niños y adolescentes pues representa que, del 65 al 90% de las familias sin seguro social, no cuente con recursos para su atención y tengan que enfrentarse por lo tanto a gastos económicos excesivos [2].

Al profundizar más en el tema de cáncer infantil encontramos que los estudios realizados, de 2007 a 2008, se observó que los cánceres más frecuentes son las Leucemias, seguida por los Linfomas, Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC), y los Sarcomas de Partes Blandas. Dentro de las Leucemias el diagnóstico más frecuente es la Leucemia Linfoblástica Aguda, le sigue la Leucemia Mieloide Aguda, y la Leucemia Granulocítica; de los Linfomas, el más frecuente es el Linfoma Hodgkin, en segundo lugar el Linfoma No Hodgkin; Respecto a los Tumores de SNC, el más frecuente es el Astrocitoma, el Meduloblastoma, el Glioma, el Ependimoma, y el Tumor Neuroectodérmico Primitivo; de los Sarcomas de partes blandas el más frecuente es el Rabdomyosarcoma [2].

Tabla II. Estadísticas de tumores del sistema nervioso central [2].

| Diagnostico | | 2007 | | 2008 | |
|--------------------------------------|----------------------------------|-------|------------|-------|------------|
| | | Casos | Porcentaje | Casos | Porcentaje |
| Tumores del Sistema Nervioso Central | Astrocitoma | 100 | 4.96 | 71 | 3.19 |
| | Meduloblastoma | 46 | 2.28 | 65 | 2.92 |
| | Glioma | 13 | 0.64 | 30 | 1.35 |
| | Tumor neuroectodérmico primitivo | 12 | 0.59 | 6 | 0.27 |
| | Ependimoma | 10 | 0.5 | 15 | 0.67 |
| | Meningioma | 2 | 0.1 | 0 | 0 |
| | Schwannoma | 2 | 0.1 | 0 | 0 |
| | Craneofaringioma | 1 | 0.05 | 4 | 0.18 |
| | Otros | 2 | 0.1 | 7 | 0.31 |

Como se aprecia en la Tabla 2, el porcentaje de Astrocitomas, Meduloblastomas y Glioblastomas ocupa un lugar importante, por ello, es de vital importancia dedicarle atención a estos padecimientos, pues degeneran la calidad de vida de los pacientes, principalmente infantiles.

La situación actual del cáncer en América Latina es muy preocupante ya que además de que la tasa de incidencia en la población va en aumento, existe poca investigación sobre el tema en cuestión y además enfrentan el reto de asumir la demanda generada a sus sistemas sanitarios a consecuencia del cáncer y otras enfermedades crónicas.

Pero existe además un problema “silencioso” en el caso de los tumores del sistema nervioso central y del que existen muy pocas estadísticas: la recurrencia de los tumores después de que el paciente ha sido sometido tanto a cirugías como a tratamientos por quimio o radioterapia. Es decir, que las estadísticas generales solo se enfocan a decir cuál es el número de pacientes tratados por alguna de las modalidades terapéuticas, pero en los países de América Latina es muy difícil encontrar un seguimiento de los

pacientes durante y después del tratamiento. Sin embargo, por estadísticas realizadas en Estados Unidos, se ha determinado que las neoplasias cerebrales son de los cánceres más agresivos y que a pesar de las intervenciones terapéuticas, existe una alta recurrencia (reincidencia del cáncer) y el tiempo promedio de sobrevivencia de los pacientes después del diagnóstico, es de un año [3].

En el presente trabajo, tratamos de dar un panorama general de la situación de la investigación en cáncer y en particular de los tumores cerebrales. Nos centramos en el hecho de que actualmente se maneja la hipótesis de las células iniciadoras del cáncer, a las que también se responsabiliza de la recurrencia de las neoplasias. Además, mostramos un protocolo propuesto por investigadores Norteamericanos para determinar si un fármaco nuevo será efectivo para erradicar tales células iniciadoras de cáncer. Finalmente, mencionamos la estrategia que estamos utilizando para tratar de volver radio-sensibles a tales células por medio de un fármaco llamado Partenolida y de esa manera evitar la recurrencia de los tumores cerebrales en los pacientes que lo padecen y más aun, reducir la dosis de radiación para su tratamiento con el fin de evitar los trágicos efectos colaterales irreversibles.

II. RESEÑA HISTÓRICA DE LAS CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

Para entender cómo ha cambiado históricamente la concepción del cáncer, es necesario conocer las hipótesis y evidencias que se han ido presentando a lo largo de la investigación en torno al tema. Al inicio, se consideraba como un conjunto de mutaciones de una célula de cualquier tipo dañada al azar, sin embargo, actualmente se tienen importantes evidencias de que es específicamente una célula madre cancerosa, esto es, un tipo particular de células que son capaces de auto renovarse e inducir el crecimiento de los tumores y cuya progenie posee daños en su material genético, explicando así, su renuencia hacia su desaparición completa [4].

Comenzamos con unos Patólogos alemanes encabezados por Johannes Mueller en 1840, específicamente tres alumnos de Mueller quienes comenzaron a estudiar los orígenes de los tumores. Rudolf Virchow fue el primero en reconocer que sólo una pequeña parte de lo que llamó "células" tenía la capacidad de multiplicarse independientemente. El postuló que el tumor venía de células normales [5].

Julius Cohnheim, otro discípulo de Mueller, tomó un enfoque diferente, y en 1867 propuso que los tumores se derivan no a partir de tejidos adultos normales, sino de "restos de células embrionarias", que describió como células residuales embrionarias dejadas atrás en el organismo adulto [6].

Finalmente, Wilhelm Waldeyer detalló que los carcinomas se obtuvieron a partir estructuras epiteliales adultas y concluyó que el cáncer comienza en una célula y puede propagarse a otras partes del cuerpo por las células que migran desde el sitio original a través de la sangre o el sistema linfático, lo cual se conoce como metástasis [6].

Paralelamente a estos estudios que abarcaron dos siglos, la genética básica del cáncer empezaba a ser aclarada, empezando por Percivall Pott quien unía la exposición ambiental al desarrollo del cáncer, y culminando en los ensayos de mutagénesis (referido a algún cambio, o conjunto de ellos en el material genético que son heredables [7]) desarrollados por Bruce Ames, quien demostró que un tipo de cáncer era causado por mutaciones genéticas [8].

Sin embargo, muchos sostienen la cuestión, ¿Cuántas mutaciones y en que células se necesitan para iniciar el cáncer? Para resolver esta cuestión, se desarrolló la teoría de la tumorigénesis de varios pasos. Se propuso que múltiples eventos independientes deben ocurrir en una sola célula. Esta teoría de la tumorigénesis de varios pasos se centra en la naturaleza y el número de mutaciones, en lugar de las propiedades de la célula en las que se produce [5]. A pesar de una serie de limitaciones, los principios y conceptos de esta teoría han sido incorporados en el paradigma actual de la investigación del cáncer.

En este punto, la creencia de la formación del cáncer ya estaba cimentada, hasta que Pierce GB Jr. en un trabajo de estudio sobre teratocarcinomas en ratones se dio cuenta que al implantar células tumorales, estas fueron capaces, sorprendentemente, de formar una progenie normal, lo que lo llevó a especular que el tumor contenía un pequeño número de “células madre malignas” [9].

Por lo tanto, la propuesta de identificación de la célula cancerígena cerró el círculo. La idea inicial de que una célula diferenciada era responsable de la carcinogénesis, fue progresando hasta la aceptación de que una célula progenitora inmadura era responsable de la iniciación del tumor. Por lo tanto, un siglo después de que se propone, la teoría de restos celulares embrionarios de Julio Cohnheim comenzaba a resurgir [10].

A pesar de que con el paso del tiempo cada vez hay más pruebas que apoyen la hipótesis de la existencia de las células madres cancerosas, aún hay puntos acerca de su origen que lo hace un tema aun controversial. Una posibilidad es que las células madre cancerosas (Cancer Stem Cells CSCs, en inglés) son el resultado de la transformación oncogénica de las células madre de tejidos normales [11]. En este caso, las mutaciones en mecanismos reguladores que controlan la auto-renovación de células madre son posibles para promover la formación de CSCs [12,13], generando células cancerosas jerárquicas y heterogéneas, lo que sugiere que la célula del cáncer que se origina tiene la capacidad de generar múltiples tipos celulares (es decir, plasticidad multi-diferenciable), una característica de troncal de las células [14, 15, 16].

Por ello hay que tener en cuenta que el concepto central de las CSCs se apoya en la observación de que, no todas las células en un tumor son iguales [4]. Para poner de manifiesto lo dicho anteriormente, en la figura 1 se muestra un posible esquema de la evolución clonal del cáncer. De arriba hacia abajo: la evolución clonal conlleva a una progresión tumorigénica. (1) La primer mutación oncogénica (vector iluminado) ocurre en una célula madre (alternativamente, en un progenitor o igualmente en una célula diferenciada) de un tejido epitelial sano, resultando en el crecimiento de una lesión benigna genéticamente homogénea. (2) La segunda afectación en el blanco de una de las células en la lesión benigna, que deja el crecimiento de un clon más maligno e invasivo dentro del tumor primario. (3) Una tercera afectación en la célula dentro de un subclon maligno provoca una nueva transformación, visualizado como la entrada en un vaso sanguíneo de metástasis a distancia. Los sub-clones genéticamente independientes pueden coexistir dentro del tumor. (4) Una última afectación en el tumor deja un tumor completamente absorbido por las células que se comportan como CSCs. Se muestra, de arriba a abajo: en cada etapa de esta evolución clonal, clones y subclones dentro de tumores que contienen algunas células que se comportan como CSCs, haciendo que el concepto de CSC tome sentido en estas etapas [4].

En conclusión, este pequeño resumen histórico refleja los acontecimientos principales por los que tuvieron que pasar las investigaciones biológicas del cáncer antes de llegar hasta donde estamos, pero, ¿En qué punto estamos? Con sinceridad se debe admitir que aún no se han consolidado de manera estable cualquiera de las teorías acerca del cáncer, pues éstas generan controversia, sin embargo las investigaciones recientes apuntan más hacia la existencia de las CSCs como las originarias de los tumores y las causantes de las recurrencias de éstos después de tratamientos quirúrgicos o por radiación [3].

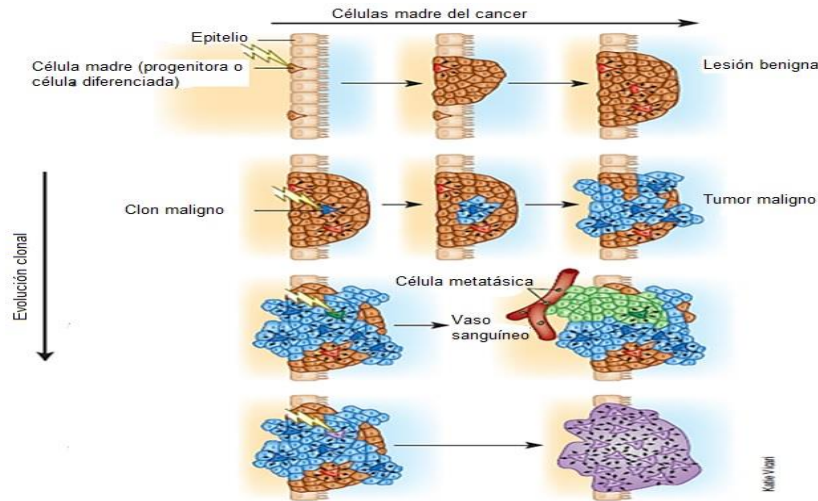


Fig. 1. Posible esquema de la evolución clonal del cáncer. Imagen adaptada de [4].

III. NEOPLASIAS CEREBRALES

Las neoplasias o tumores cancerosos cerebrales son la principal causa de mortalidad por cáncer en los niños; a pesar de los avances en cirugía y terapia, siguen siendo difíciles de curar [17]. La investigación más actual de tumores cerebrales se centra en el análisis molecular y celular de la masa tumoral mayor. Los tumores cerebrales son típicamente compuestos de células morfológicamente diversas que expresan una variedad de marcadores de linaje neural.

El estudio de la morfología básica y fenotipo de los tumores cerebrales sólo ha dado una cantidad limitada de conocimiento en cuanto al comportamiento clínico del tumor. Con esto nos referimos al hecho de que existen tumores cerebrales con similitud en proporción, morfología y fenotipo pero que tienen un diferente pronóstico y respuesta a un tratamiento por radioterapia [18].

Esto nos hace pensar que hace falta un ensayo funcional de las células del tumor cerebral que podrían determinar cuál de las morfológicamente diversas células tumorales son capaces de mantener el crecimiento del tumor. La determinación de las células clave en una población tumorigénica que son capaces de mantener el tumor, dará información sobre el mecanismo de tumorigénesis cerebral, y nos permitirá rastrear de nuevo a la célula de origen en un cerebro normal [19].

Hay pruebas abrumadoras en otras neoplasias malignas, como la leucemia, de que la población clonal de células neoplásicas exhibe una marcada heterogeneidad con respecto a la proliferación y la diferenciación [20]. Las células madre “raras” dentro de una población leucémica posee la proliferación y la capacidad de auto-renovación que no se encuentra en la mayoría de las células leucémicas. La capacidad para fraccionar y analizar cuidadosamente a las células madre leucémicas condujo a la determinación de que son pocas las necesarias y suficientes para mantener la leucemia [20], y probablemente ocurra lo mismo en las neoplasias (cánceres) cerebrales.

IV. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y AISLAMIENTO DE CSCS DE NEOPLASIAS CEREBRALES

Hasta ahora, los protocolos para identificar y aislar las CSCs se basan en los ya establecidos para la obtención de células madre sanas. Pero aquí existe la gran diferencia de que las muestras deben ser tomadas de pacientes con tumores cerebrales. De este modo, el primer paso es la parte ética. Por ello, las investigaciones con este tipo de células deben seguir los lineamientos establecidos en la Declaración de

Helsinski, por lo que se debe hacer del conocimiento tanto de los pacientes como de sus familiares, quienes tienen que otorgar su consentimiento por escrito.

Posteriormente, las células disociadas de las muestras de los tumores cerebrales de los pacientes se etiquetan con 1 mL de esferas micromagnéticas con CD133, por cada millón de células, utilizando para ello el Kit de aislamiento celular CD133 (MACS, Milteny Biotech) [21]. El CD133+ es una glucoproteína transmembranal que se utiliza como marcador de superficie ya que se ha visto que se expresa en las células madre cancerosas de glioblastomas [22]. Posteriormente, las células con CD133+ se cultivan en un medio libre de suero (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) DMEM/F12 (GIBCO) suplementado con N2 (R&D), 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Básico de Fibroblasto (bFGF) (R&D) y 10 ng/mL de Factor de Crecimiento Epidérmico EGF [21,23].

Una vez que se ha aislado a esta particular población de células madre, se procede a la determinación de sus propiedades de tipo célula madre cancerosa. Para éste propósito, se ha observado lo siguiente [23]:

- 1) Las células con CD133+ tienen una mayor tasa de proliferación que CD133- (células que no poseen CD133), lo cual ha sido verificado por el estudio de Methil Thiazole Tetrazolium (MTT assay).
- 2) El estudio *in-vitro* de Invasión Matrigel Transwell reveló que las células CD133+ resultaron ser más invasivas al ser comparadas con las CD133-.
- 3) Al colocar un número igual de células en agar suave, las CD133+ tienen una mayor habilidad de formar colonias tumorales que las CD133-.
- 4) Para determinar la capacidad tumorigénica del CD133+ y CD133-, se inyectaron dentro del estrato del cerebro de un ratón SCID, un número creciente de células (300, 10^3 , 3×10^3 , 10^4). Los resultados mostraron que 10^4 CD133- no indujo formación de tumor pero 3000 CD133+ de nueve pacientes (100%) y 300 CD133+ de uno de cuatro pacientes (25%) generaron tumores visibles en ratones xeno-trasplantados 8 días después de la inyección.
- 5) Más aun, un ciento de CD133+ aisladas de un tumor trasplantado pueden volver a generar un nuevo segundo tumor.

Con este protocolo tan minucioso, queda claramente establecida la existencia de las células madre cancerosas de los tumores cerebrales. En este punto es necesario añadir que sus características van más allá de su particular forma de generar una población potencialmente peligrosa, su obstinación a su exterminio tiene una explicación, ya que también tienen una resistencia innata a la radiación y a medicamentos (expresión de altos niveles de transportadores ABC, lo que le confiere la resistencia) que pongan en peligro su existencia, así como la increíble capacidad de entrar en un estado quiescente (G0, lo que aumenta su duración de vida), reparar su ADN y su resistencia a la apoptosis [19].

Por otra parte, es de mucha importancia mencionar que hasta ahora las CSCs han sido identificadas en un gran número de neoplasias, incluyendo leucemia, cáncer de mama, de próstata, de ovario y de colon y por supuesto tumores cerebrales. Todos estos estudios se fundamentan en el xenotransplante de una subpoblación de CSCs de un tumor humano en un ratón, dando origen al mismo tipo de tumor [24] (y referencias ahí). Sin embargo, aunque esto resulta ser muy útil, este sistema (ratón) no refleja con precisión los factores críticos para la carcinogénesis, tales como el microambiente y la respuesta inmune [24].

V. BIOMARCADORES EFICACES CONTRA LAS CSCS

El primer paso para erradicar un problema, es encontrar la raíz. En el caso de los tumores cerebrales, en los últimos años se ha encontrado que las células madre cancerosas son altamente migratorias, recapitulan los tumores y además son responsables de la recurrencia tumoral [25,18].

De tal manera, que la siguiente etapa sugiere de manera natural el hecho de diseñar estrategias para dirigir un tipo específico de “misil” exclusivamente a tales células, considerando que las hay en un número muy bajo, a decir, una en un millón.

En esta dirección, la compañía Stemina Biomarker Discovery Inc. se encuentra diseñando biomarcadores metabólicos que sean potenciales indicadores de la eficacia de los fármacos contra las CSCs de tumores cerebrales (Brain Tomour Stem Cell) BTSC.

Para este propósito, los investigadores de Stemina han planteado el diseño experimental bosquejado en la figura 2 y el cual consta de los siguientes pasos [26]:

- 1) Determinar las pequeñas moléculas de metabolitos que son comunes entre tres líneas diferentes de BTSC. Esto tiene la finalidad de establecer BTSC de huella metabólica común.
- 2) Este conjunto de biomarcadores de BTSC se comparó con las no-CSC, con las células diferenciadas de Glioblastoma Multiforme (GBM) y células madre neuronales humanas (hNSCs). Como resultado, la metabolómica comparativa aportó un medio para identificar biomarcadores específicos de BTSC que no están presentes en las otras dos líneas celulares.
- 3) Estas pequeñas moléculas se pueden utilizar para monitorear diferentes modalidades terapéuticas de GBM o para llevar a cabo el cribado de bibliotecas químicas con el fin de determinar la eficacia de tales pequeñas moléculas o productos biológicos contra las BTSCs.
- 4) Llevar a cabo una correlación de la eficacia y respuesta del biomarcador.

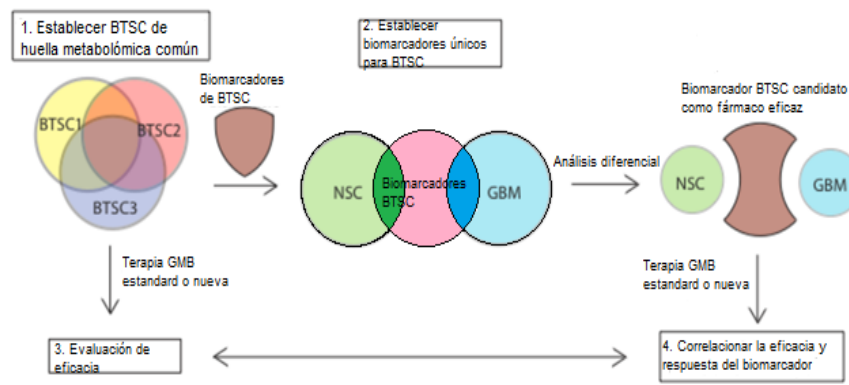


Fig. 2. Diagrama simplificado para el establecimiento de biomarcadores de BTSC [26].

La presentación de este protocolo es de vital importancia para la investigación de nuevos planes de tratamiento de pacientes con neoplasias cerebrales, ya que ahora las nuevas estrategias se deben centrar en aniquilar específicamente a las CSCs. Esto queda de manifiesto en el artículo publicado en octubre del 2013 por Cooper y Wang titulado “Cancer stem cells in glioma: challenges and opportunities” [27], en el cual hacen énfasis en la importancia de considerar como válida la hipótesis de las células iniciadoras del cáncer para iniciar nuevas estrategias de tratamiento.

VI. CONCLUSIONES

Pese a que ha sido un tema fuertemente debatido, en la actualidad ya es aceptado que las CSCs existen y que están intrínsecamente relacionadas tanto al surgimiento como a la resistencia del tumor ante la radioterapia y la reincidencia del cáncer, en particular de las neoplasias cerebrales. Es decir, el nuevo reto en la actualidad para el tratamiento de este mal, es buscar la manera de aniquilar específicamente a las CSCs.

Hasta donde es de nuestro conocimiento, Investigadores del Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la UAEM son los primeros en México en llevar a cabo Investigaciones encaminadas a desarrollar nuevos protocolos de tratamiento de pacientes con neoplasias cerebrales al emplear una molécula bio-activa llamada Partenolida para provocar que las CSCs de Glioblastomas sean más sensibles a la radiación, con lo que se espera que la dosis necesaria para erradicar el tumor en los pacientes sujetos a tratamientos por Radioterapia se reduzca y además, que no exista recurrencia del tumor.

Inicialmente, estas investigaciones se están llevando a cabo en colaboración con el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, el Instituto nacional de Investigaciones Nucleares, el Biotechnology Research and Innovation Center de Copenhagen y el Centre Hospitalier Universitaire Vaudois de Lausanne Suiza, para lo cual se plantean las siguientes 2 fases:

- I. Aislamiento de las células madre cancerosas de Glioblastomas pediátricos.
- II. Evaluación del efecto de la Radioterapia sobre las células madre cancerosas de Glioblastomas tratadas con Partenolida.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen la invaluable aportación de la Dra. Martha Patricia Cruces Martínez, Dr. Emilio Pimentel Peñalosa, Dr. Pedro Morales Ramírez y Dr. Jorge Guerrero Serment pertenecientes al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares de México. EVV agradece al PROMEP por el apoyo financiero dentro del marco del proyecto con Folio UAEM-PTC-302 y oficio numero PROMEP/103.5/13/5333.

REFERENCIAS

- [1] Pan American Health Organization. Regional Office for the Americas of the World Health Organization. (29 de Enero de 2014). http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=292%3Acancer&catid=1866%3Ahds0201a-cancer-home&Itemid=3855&lang=es
- [2] Pérez-Rico R, Sesma-Vázquez S, Puentes-Rosas E. “Gastos Catastróficos por motivos de salud en México: Estudio comparativo por grado de marginación”. Salud pública de México / Vol.47, suplemento 1 de 2005. (citado 2006-09-11).
- [3] Hide T, Takezaki T, Nakamura H, et al. “Brain tumor stem cells as research and treatment targets”. Brain Tumor Pathology. 25 (2): 67-72. 2008.
- [4] Clevers, Hans. “The cancer stem cell: premises, promises and challenges”. Nature medicine, p. 313-319. 2011.
- [5] Shimkin MB. “Contrary to nature”. Washington, DC: US Department of Health, Education and Welfare; 1977.
- [6] Rather LJ. “The genesis of cancer: a study in the history of ideas”. Baltimore: The Johns Hopkins University Press;. p. 1–178. 1978.
- [7] Broussard GW, Norris MB, Schwindt AR, Fournie JW and Ennis DG. “Chronic Mycobacterium marinum infection acts as a tumor promoter in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)”. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, vol. 149, no 2, p. 152-160. 2009.
- [8] Houghton JM, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. “Stem cells and cancer”. Semin Cancer Biol 17(3):191-203. 2007.
- [9] Cairns J. “Mutation selection and the natural history of cancer”. Nature. 255:197–200. 1975.

- [10] Edwards BK, Howe HL, Ries LA, Thun MJ, Rosenberg HM, Yancik R, et al. "Annual report to the nation on the status of cancer, 1973–1999, featuring implications of age and aging on US cancer burden". *Cancer*. 94:2766–92. 2002.
- [11] Visvader JE. "Cells of origin in cancer". *Nature* 469: 314–322. 2011.
- [12] Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. "Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation". *Exp Cell Res* 306: 330–335. 2005.
- [13] Collins CA, Partridge TA. "Self-renewal of the adult skeletal muscle satellite cell". *Cell Cycle* 4:10; 1338–1341. 2005.
- [14] Kondo T, Setoguchi T, Taga T. "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line". *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 781–786. 2004.
- [15] Poste G, Greig R. "On the genesis and regulation of cellular heterogeneity in malignant tumors". *Invasion Metastasis* 2: 137–176. 1982.
- [16] Sell S, Pierce GB. "Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers". *Lab Invest* 70: 6–22. 1994.
- [17] Hardee ME, Marciscano AE, Medina-Ramirez CM, Zagzag D, Narayana A, Lonning SM and Barcellos-Hoff MH. "Resistance of glioblastoma-initiating cells to radiation mediated by the tumor microenvironment can be abolished by inhibiting transforming growth factor- β ". *Cancer Res*; 72(16). 2012.
- [18] Dirks PB. "Stem cells and brain tumours". *Nature news & views*. Vol 444: 7. 2006.
- [19] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF and Weissman IL. "Stem cells, cancer, and cancer stem cells". *Nature*, 415(6859): 105–111, 2001.
- [20] Zou GM. "Cancer stem cells in leukemia. Recent Advances". *J Cell Physiol*. 213(2): 440-4. 2007.
- [21] Chiou SH, Kao CL, Chen YW, Chien CS, Hung SC, Lo JF, Chen YJ, Ku HH, Hsu MT and Wong TT. "Identification of CD133+ radioresistant cells in atypical Teratoid/Rhaboid tumor". *Plos ONE* 3(5): e2090. 2008.
- [22] Sanai N, Alvarez-Buylla A, Berger MS. "Neural stem cells and the origin of gliomas". *N Engl J Med* 353 (8): 811–822. 2005. doi:10.1056/NEJMra043666. PMID 16120861.
- [23] Lu KH, Chen YW, Tsai PH, Lee YY, Chiang CY, Kao CL, and Chen YJ. "Evaluation of Radiotherapy effect in resveratrol-treated medulloblastoma cancer stem cells". *Childs Nerv Syst* 25:543-550. 2009.
- [24] Bao S, Wu Q, McLendon R, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland A, Dewhirst M, Bigner D and Rich J. "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response". *Nature* 444, 756-760. 2006.
- [25] Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. "Identification of cancer stem cell in human brain tumors". *Cancer Res*. 15; 63 (18) : 5821-8. 2003.
- [26] Weir A, Kruser TJ, Smith AM, Clark P, Bhattacharyya S, Cezar GG, DVM, Kuo JS and West PR. "Identification of Biomarker Signatures for Cancer Stem Cells Using Metabolomics". *Stemina (USA)*. 2009.
- [27] Wang J, Ma Y, Cooper MK. "Cancer stem cells in glioma: Challenges and opportunities". *Transl Cancer Res*. 1; 2(5):429-441. 2013.