

Progenitores de los tumores cerebrales

Stem cells in brain tumors

► León Darío Ortiz^{1,2}, Andrés Felipe Cardona^{2,4}, Hernán Carranza^{2,4}, Henry Becerra³, Carlos Vargas^{2,4}, Enrique Jiménez⁵, Fernando Hakim⁵, Nicolás Useche⁶, Sonia Bermúdez⁶, Jorge Otero^{2,4}, Pilar Archila^{4,7}, Silvia Serrano⁴, Diana Torres^{4,8}, July Katherine Rodríguez⁴, Orlando Ricaurte⁹, Carmen Balaña¹⁰, Alejandro Blanco¹¹

¹Departamento de Oncología Clínica, Sección Neuro-oncología, Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas (Medellín, Colombia).

²Investigador asociado Red Latinoamericana de Neurooncología (RedLANO).

³Grupo Oncología Clínica y Traslacional, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia).

⁴Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada del Cáncer (FICMAC); investigador asociado ONCOLGroup.

⁵Departamento de Neurocirugía, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia).

⁶Departamento de Imágenes Diagnósticas, Sección Neurorradiología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia).

⁷Departamento de Patología, Hospital de San José, Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (Bogotá, Colombia).

⁸Instituto de Genética Humana, Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia); investigador asociado German Cancer Research Center (DKFZ).

⁹Departamento de Patología, Universidad Nacional de Colombia (Bogotá, Colombia).

¹⁰Departamento de Oncología Médica, Sección Neuro-oncología, Hospital Germans Trias i Pujol, Instituto Catalán de Oncología (ICO) (Barcelona, España).

¹¹Departamento de Radioterapia, Hospital México (San José de Costa Rica, Costa Rica).

Resumen

El dogma sobre la génesis de las células es un evento insignificante en el cerebro de los mamíferos adultos, que ha influenciado nuestra percepción y la comprensión del origen y desarrollo de los tumores del sistema nervioso central. El descubrimiento de que las neuronas y la neuroglia se generan a lo largo de la vida a partir de células progenitoras proporciona nuevas posibilidades para definir la clonalidad y el comportamiento de las neoplasias cerebrales. La hipótesis detrás de este hallazgo está soportada por las modificaciones celulares y los mecanismos genéticos que controlan la neurogénesis normal y tumoral, lo que permite la identificación de nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: Tumor cerebral, glioma, célula progenitora, carcinogénesis, neurogénesis, desarrollo.

Abstract

The dogma that the genesis of cells is a negligible event in the adult mammalian brain has long influenced our perception and understanding of the origin and development of (central nervous system) CNS tumors. The discovery that new neurons and glia are produced throughout life from neural stem cells provides new possibilities for the candidate cells of origin of CNS neoplasias. The emerging hypothesis is that alterations in the cellular and genetic mechanisms that control adult neurogenesis might contribute to brain tumorigenesis, thereby allowing the identification of new therapeutic strategies.

Key words: Brain tumor, glioma, stem cells, carcinogenesis, neurogenesis, development.

Introducción

Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, Organización Mundial de la Salud), la incidencia estandarizada de los tumores primarios del sistema nervioso central a nivel mundial es de 15.8/100.000 y 17.2/100.000 habitantes para los hombres y mujeres, respectivamente¹. Globalmente, estas cifras se traducen en 190.000 casos nuevos por año, un 22% más que las neoplasias cerebrales diagnosticadas en 1960, lo que en la actualidad representa el 1.4% de todos los cánceres². En general, estas lesiones son más prevalentes entre los habitantes de los países

desarrollados (72%) y están constituidas, principalmente, por los tumores de estirpe glial^{1,3}.

Los gliomas representan la tercera causa de muerte por cáncer entre los hombres de edad media, y la cuarta para las mujeres con una edad comprendida entre los 15 y 34 años^{3,4}. A pesar del notorio desarrollo de la biología molecular tumoral, las estrategias terapéuticas dirigidas contra el control de esta enfermedad continúan siendo limitadas y solo se han incrementado en un 18% durante las últimas dos décadas, lo que les posiciona lejos de otras neoplasias más prevalentes⁵. En oposición, los modelos celulares de los tumores cerebrales

DATOS DE CONTACTO

Correspondencia: León Darío Ortiz, MD, MSc. Departamento de Oncología Clínica, Sección Neuro-Oncología, Instituto de Cancerología, Clínica Las Américas (Medellín, Colombia) y Andrés Felipe Cardona, MD, MSc, PhD^c. Grupo Oncología Clínica y Traslacional, Instituto de Oncología, Fundación Santa Fe de Bogotá (Bogotá, Colombia). **Dirección:** carrera 80 diagonal 75B N° 2A 80-140. **Teléfono:** 340 9393. **Fax:** 342 3307. **Correos electrónicos:** leonortiz@une.net.co; a_cardonaz@yahoo.com

Fecha de recepción: 10 de abril de 2012. **Fecha de aprobación:** 15 de mayo de 2012.

Declaración de conflictos de interés: ninguno.

han permitido explorar nuevas áreas relacionadas con el conocimiento de las enfermedades malignas, entre ellas, la que tiene relación con el papel de las células progenitoras multipotenciales.

La supervivencia global (SG) de los pacientes con glioblastoma (GB) y la de aquellos con gliomas anaplásicos es de 8 a 15 meses y de 12 a 28 meses, respectivamente⁶; después de la publicación de Stupp y colaboradores, la gran mayoría de los centros con experiencia en neuro-oncología utilizan como tratamiento estándar del GB la temozolamida (TMZ) en concomitancia con radioterapia, seguida de seis meses de tratamiento con este agente alquilante, con lo que se logra una SG de 14.6 meses y una proporción de sujetos vivos a los dos años del 26%⁷. No obstante, más del 50% de los pacientes progresan durante el primer año, luego de lo cual suelen tener una SG menor a 20 semanas⁸.

La teoría de la neurogénesis posnatal de Altman y colaboradores, y el hallazgo de las células progenitoras de los tumores gliales en el 2002 han permitido ampliar el conocimiento respecto de nuevas intervenciones que podrían modificar el comportamiento del microambiente tumoral glial⁹. Un ejemplo representativo es la evidencia de que la mayoría de las células pluripotenciales que presentan el marcador de superficie CD133 se asocian con un microambiente que favorece la elevación de los niveles de VEGF (10 a 20 veces sobre el valor normal) y también la sobreexpresión del receptor VEGFR-2⁹. De forma similar, estudios con xenogramas murinos demostraron en los gliomas de alto grado un incremento significativo de la angiogenina, interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 6 (IL-6), y en los factores de crecimiento derivado de los fibroblastos (FGF), similar a la insulina (IGF-IR), producido por las plaquetas (PDGF) e inducido por la hipoxia (HIF)¹⁰. En respuesta, los precursores de las células tumorales gliales y sus descendientes maduros incrementan la sensibilidad al VEGF, especialmente en presencia de acidosis, fenómeno normal en las empalizadas típicas del GB¹¹.

A continuación, se realiza una revisión detallada de la información publicada sobre las células progenitoras de los gliomas y meduloblastomas, y su posible relación con la respuesta a la quimiorradiación y a futuras intervenciones terapéuticas. De igual forma, se discute el papel de estas en la propagación de la enfermedad, y se proporciona un análisis de las

propiedades funcionales de las células progenitoras neuronales normales y de sus homólogas tumorales que pierden su capacidad regulatoria durante el proceso de neurogénesis.

Formato utilizado para la búsqueda de información

La información consignada en esta revisión fue extraída a partir de búsquedas de la literatura médica practicadas en las bases de datos Medline, Biosis y Embase, desde 1966, 1992 y 1974, respectivamente, hasta el 1° de julio del 2012, usando la plataforma Ovid (Ovid Technologies, Inc., US) y múltiples términos clave. Se diseñaron estrategias adicionales para las bases de datos Lilacs y Cinhal, usando criterios similares; también, se recopilaron las referencias más representativas presentadas durante los últimos cinco años en los congresos de la American Society of Clinical Oncology (ASCO), de la European Society of Medical Oncology (ESMO), de la Society of Neuro-Oncology (SNO), de la European Association for Neuro-Oncology (EANO) y de la American Association for Cancer Research (AACR), más algunos datos obtenidos del motor general Google.

Identificación de las células progenitoras en el cerebro y su relación con los tumores gliales

El cáncer suele desarrollarse a partir de mutaciones que ocurren en pocas células, o incluso, a partir de solo un elemento fundador; estas unidades anormales pierden la capacidad de autorregulación, lo que repercute en su potencial incontrolado de proliferación¹². Dos modelos hipotéticos explican este fenómeno: el primero es el estocástico, que predice que todas las células tienen una capacidad homogénea para iniciar una neoplasia que usualmente presenta apartados en los que sus elementos se encuentran activados de forma sincrónica y constitutiva¹². El segundo modelo es el jerárquico, que asume que solo un subgrupo de células presentes en el tumor tiene cierto potencial para proliferar y generar nuevos focos neoplásicos, mientras el resto actúa como soporte o representa células tumorales bien diferenciadas o terminales. Este modelo explica los hallazgos de las células progenitoras

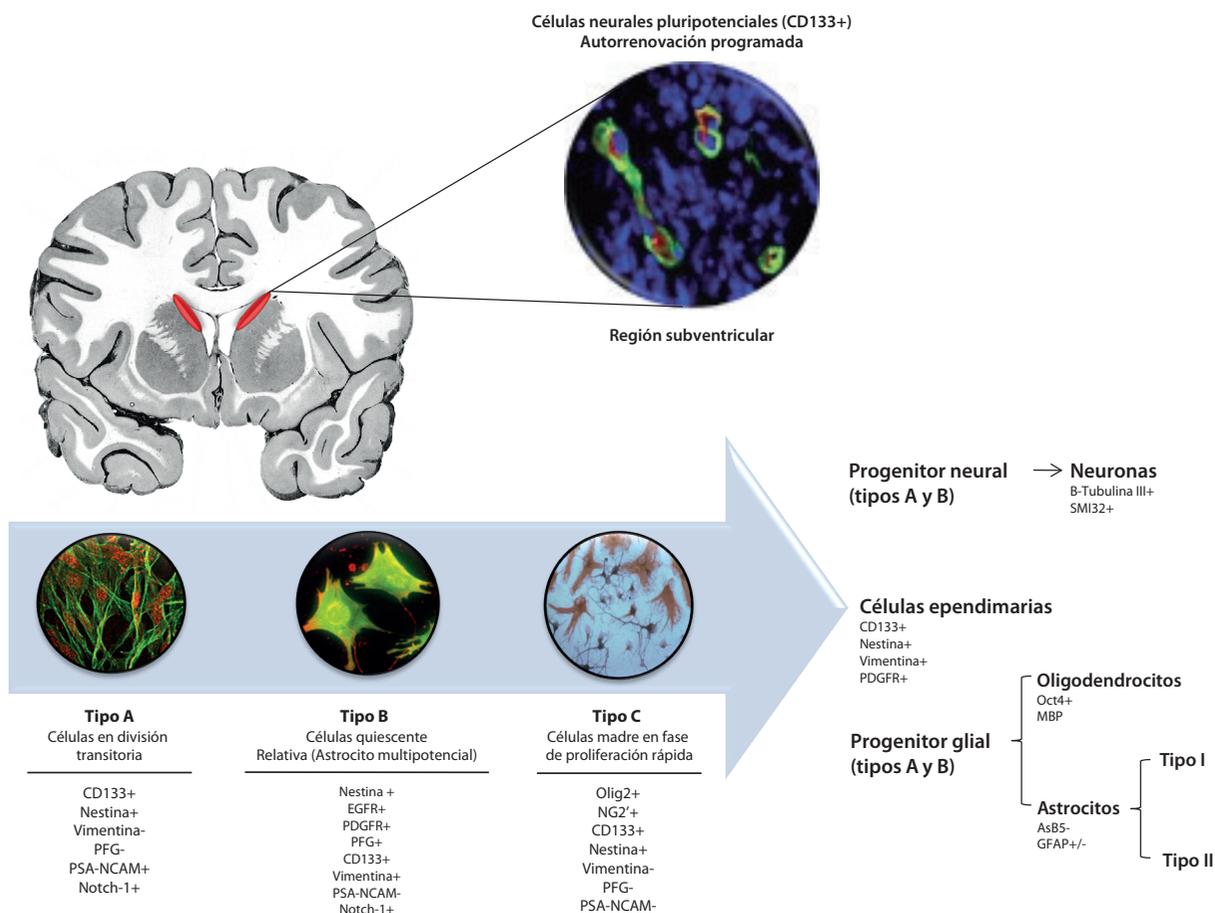
pluripotenciales en la leucemia mieloide aguda, en los tumores cerebrales, en los cánceres de mama, próstata y colon^{13,14}.

Hace solo 17 años, Nottebohm y colaboradores reportaron el descubrimiento de tejido embrionario neural en el parénquima cerebral de las aves, seguido por varios estudios complementarios que evidenciaron el mismo hallazgo en roedores, simios y humanos¹⁵. Por consiguiente, es un hecho que la neurogénesis persiste durante la adultez, particularmente a nivel del giro dentado del hipocampo (en el hilio y en varios planos de la lámina granular) y en la región superior profunda de los ventrículos laterales, vecina al cuerpo estriado (figura 1). Estas células constituyen cerca del 0.2% de los elementos formes del encéfalo, primitivamente pertenecen al telencéfalo, y generalmente expresan la proteína fibrilar glial (GFAP, por su sigla en inglés)¹⁶. Poseen un papel putativo y son capaces de regenerar la estructura neurogenética in vivo e in vitro; usualmente,

disfrutaban de un estado de quiescencia relativa con un ciclo celular cercano a los 28 días (células tipo B o *astrocitos pluripotenciales*)¹⁷.

Habitualmente, las células progenitoras pluripotenciales tienen la capacidad de generar otros elementos progenitores de segundo orden que se dividen cada 12 horas (fase de proliferación rápida); estas células han sido denominadas del tipo C (*precursores inmaduros*), mantienen la multipotencialidad y producen otros precursores neuronales con mayor madurez designados como células tipo A (*neuroblastos migrantes*), capaces de migrar en grupo a través de la porción rostral del ventrículo lateral hacia el bulbo olfatorio, donde se integran como nuevas interneuronas en las diferentes capas del córtex¹⁸ (figura 1). La región productora subventricular se encuentra preservada en los mamíferos euterios incluyendo al hombre, solo que, en este último, el desplazamiento celular no es grupal, sino individual, y sigue un destino que aún no ha sido aclarado¹⁹. Análogamente

Figura 1. Proceso relacionado con el desarrollo y evolución de las células progenitoras de los tumores cerebrales.



Fuente: tomado con autorización de Cardona AF, Balañá C, Torres D, Becerra H, Ortiz LD, Fadul CE. Stem cells in brain tumorigenesis and their impact on therapy. Curr Stem Cell Res Ther 2011;6(4):339-49.

a la zona subventricular, la región granular hipocámpal amplifica algunas células precursoras menos conocidas denominadas tipo D, debido a su capacidad migratoria limitada (cortas distancias)¹⁹.

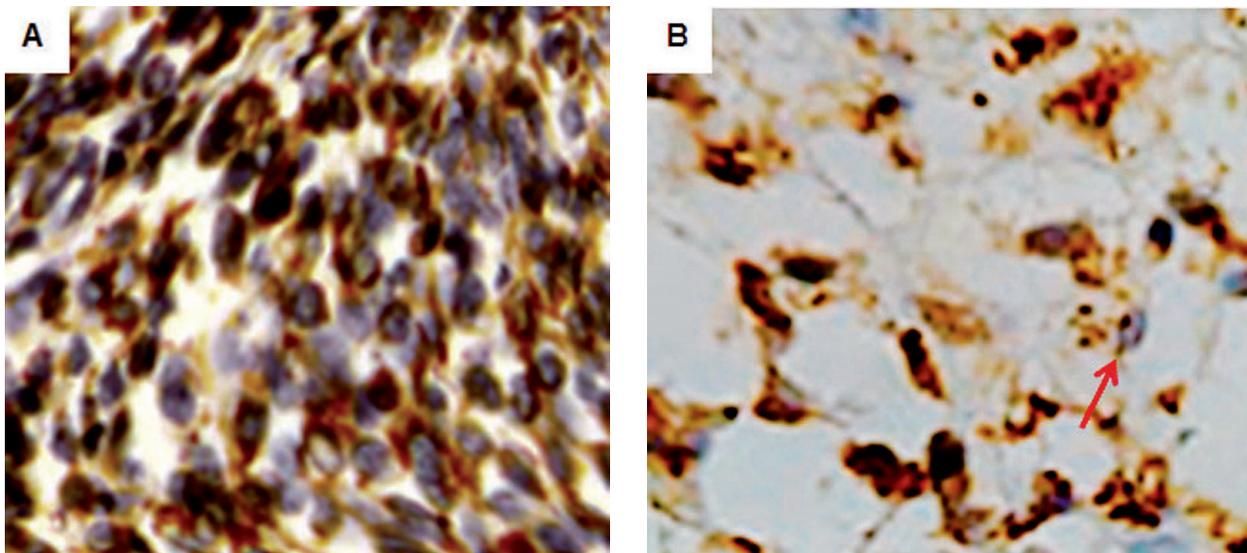
Los precursores celulares normales y tumorales comparten la expresión de múltiples marcadores, la capacidad de regeneración ilimitada, la proliferación exponencial y la de diferenciación abierta. Adicionalmente, presentan una actividad similar en sus telomerasas, en la resistencia a la apoptosis, y una mayor capacidad para el transporte de sustancias a nivel de la membrana²¹. Esta última característica facilita la exportación de moléculas antineoplásicas por medio de proteínas pertenecientes a la familia ABC como la MDR-1 (ABCB1 o glicoproteína P), MRP-1 (ABCC1), ABCA2, ABCA3 y ABCG2^{20,21}.

Desde una perspectiva neuroquímica, las células tipo B expresan otros filamentos intermedios, como la vimentina y la nestina, y son característicamente negativas para los marcadores neuronales PSA-NCAM y TuJ1²⁰; con frecuencia, expresan PDGFR- α , que parece actuar como regulador del balance para la diferenciación entre los oligodendrocitos y las neuronas durante la fase de neurogénesis asimétrica. Las células tipo B también son altamente sensibles al estímulo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del FGF2¹⁹, y demuestran positividad constitutiva para el CD133 (*prominina-1*), una glicoproteína de superficie de 130 KDa con cinco dominios transmembrana²⁰. Existen varias isoformas del CD133 reguladas vía metilación,

no obstante, su función puntual y la regulación de su transcripción son aún desconocida^{21,22}. Algunos reportes sugieren que su posición en la membrana tiene relación con la organización dinámica de esta estructura celular, lo que favorece la determinación de la polaridad celular, la migración y la interacción con otras células vecinas, especialmente, con aquellas pertenecientes al endotelio tumoral²³.

El marcador CD133 ha sido aislado de las células progenitoras normales, en aquellas de los tumores gliales y en otras neoplasias (modelo de la "neurosfera")²⁴. Las células positivas para CD133 (CD133⁺) presentan una serie de mecanismos que contribuyen con la activación preferencial de los puntos regulatorios del ciclo celular, aumentando su tolerancia al daño inducido por la radioterapia²⁵. Este hallazgo y otras vías de activación anormal, como la Wnt/b-catenina, Notch, sonic-hedgehog (SHh), PTEN y Bmi-1, permiten comprender porque las células progenitoras de los tumores gliales son resistentes a la radiación²⁶. Estas células también se caracterizan por exhibir resistencia primaria a la quimioterapia (carboplatino, paclitaxel y etopósido). Un estudio que valoró la expresión génica del BCRP1/ABCG2 y de la MGMT en los progenitores gliales determinó una elevación significativa de su función, al igual que varios supresores de la apoptosis, como el Bcl-2, FLIP, BCL-XL, y de algunos inhibidores de proteínas proapoptóticas, como el XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP y survivina²⁷. Además, la inhibición

Figura 2. a) Expresión de nestina en el tejido neural del estroma de un glioblastoma. **b)** Expresión de CD133 (flecha) en una célula de estirpe glial incluida en un glioblastoma secundario.



Fuente: cortesía Fundación para la Investigación Clínica y Molecular Aplicada de Cáncer – FICMAC (Bogotá, Colombia).

de las caspasas 3, 7 y 9 es significativamente superior en los GB recurrentes ricos en células CD133⁺ que en sus homólogos, en los que se encuentra un conteo menor²⁸.

La nestina es un filamento intermedio de la clase IV que se produce en grandes cantidades en las células progenitoras normales y tumorales durante el desarrollo del cerebro y en las neoplasias gliales^{29,30}. Constituye parte del citoesqueleto que se encarga de la morfología celular y facilita la adhesión, la proliferación y la migración. En los adultos, la nestina se expresa en las células progenitoras subventriculares, en algunos remanentes cercanos a los plexos coroides y en el prosencéfalo³¹. De igual forma que en los gliomas de alto grado, la nestina se reexpresa en múltiples linajes celulares del cerebro durante otras circunstancias, como la isquemia aguda, el trauma y la meningoencefalitis³². En las neoplasias, la coexpresión de nestina y vimentina se relaciona con un incremento sustancial de la capacidad invasora (asociación con multifocalidad), de la facilidad para reparar agresiones externas (la nestina nuclear regula la cromatina) y de la motilidad. Esta combinación podría ser útil para definir el pronóstico de la enfermedad, en especial, porque su presentación se relaciona con un fenotipo más agresivo específico de los tumores ricos en células progenitoras³³. La figura 2 muestra la expresión de CD133 y nestina en tejido tumoral derivado de una neoplasia glial de alto grado.

Cambios moleculares que favorecen a las células progenitoras tumorales

Las células progenitoras de los tumores cerebrales presentan ciertas características que las diferencian de las unidades funcionales normales. Todas deben tener la capacidad de desarrollar neoplasias después de la implantación ortotópica (si el tumor es una copia fenotípicamente idéntica a la neoplasia original), presentar una capacidad sustancial para autorregenerarse, exhibir alteraciones cariotípicas o genéticas que faciliten la diferenciación aberrante, y ser capaces de mostrar policlonalidad²⁹. Recientemente, Prada y colaboradores establecieron un modelo murino que combinó mutaciones en el *p53* y en el gen específico de la neurofibromatosis (*NF1*), capaz de activar la vía Ras para favorecer la formación terminal de astrocitomas. El

estudio encontró que la delección de uno o varios genes supresores de tumor y/o la activación de oncogenes, como *Ras* y *Akt*, en las células indiferenciadas que expresan CD133 o nestina resultaban en la formación de tumores gliales³⁰.

El efecto del PDGF sobre las células progenitoras positivas para nestina deriva en el desarrollo de gliomas, manifestación equivalente a la que ocurre cuando se combina la pérdida del *CDKN2A*, que codifica para los genes supresores *INK4a* y *ARF*, o con el aumento en la expresión del EGFR en las células inmaduras y en las terminales³⁴. Además, durante la embriogénesis, se ha reconocido en los progenitores neurales la expresión de la isoforma A del PDGFR, mientras sus homónimos maduros (glia y neuronas) manifiestan en superficie el ligando. El PDGFR-B se encuentra en pequeñas cantidades en las células multipotenciales, pero suele aumentar con la diferenciación y maduración celular, especialmente en los oligodendrocitos y en presencia del PDGFR-A fosforilado³⁵. La infusión de PDGF-A en la región subventricular de ciertos roedores suprime la producción de los neuroblastos y genera una hiperplasia de las células del tipo B que termina, con frecuencia, en la producción de astrocitomas y oligodendrogliomas. Adicionalmente, la activación de la vía de señalización del PDGF en las regiones del cerebro ricas en células precursoras contribuye con la tumorigénesis, que se ve favorecida por la estimulación autocrina y paracrina a través del PDGF-A, el PDGF-B y el factor de transcripción OLIG2^{35,36}.

Algunas de las vías de señalización incluidas en la evolución de los progenitores y en su diferenciación se encuentran alteradas en los gliomas. La vía Notch es esencial para el mantenimiento de la arquitectura celular tumoral, se expresa desde la embriogénesis y suele interactuar normal y anormalmente con múltiples ligandos, como DLL-1, 3 y 4, y con las proteínas Jag-1 y 2. En los progenitores tumorales, los receptores Notch actúan como gatillo para el estímulo mediado por la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TACE) y por la C-secretasa, que, posteriormente, se encargaran de la transducción de señales al núcleo para desencadenar respuestas a través de la transcripción del factor CBF1/Su(H)/LAG1 (CSL)³⁷. Esta interacción resulta en el desplazamiento del correpressor CoR y en el reclutamiento de un coactivador llamado CoA, que promueven la activación de genes blanco encargados

de evitar la diferenciación y la apoptosis³⁸. Por otra parte, la vía de señalización Notch previene la degradación y ubiquitinación de la nestina en las células progenitoras y coopera con K-RAS para promover su unión en colonias^{37,39}.

Un estudio demostró que la inhibición del receptor Notch-1 induce la apoptosis e inhibe la proliferación de células gliales tumorales que expresan CD133⁴⁰, lo que constituye una magnífica posibilidad para el control de los elementos encargados de la resistencia al tratamiento, ya que en la actualidad disponemos de compuestos que actúan como señuelos, o con los inhibidores de la g-secretasa con cebos intracelulares dirigidos contra MAML-1, o simplemente con inhibidores de la vía Ras⁴¹.

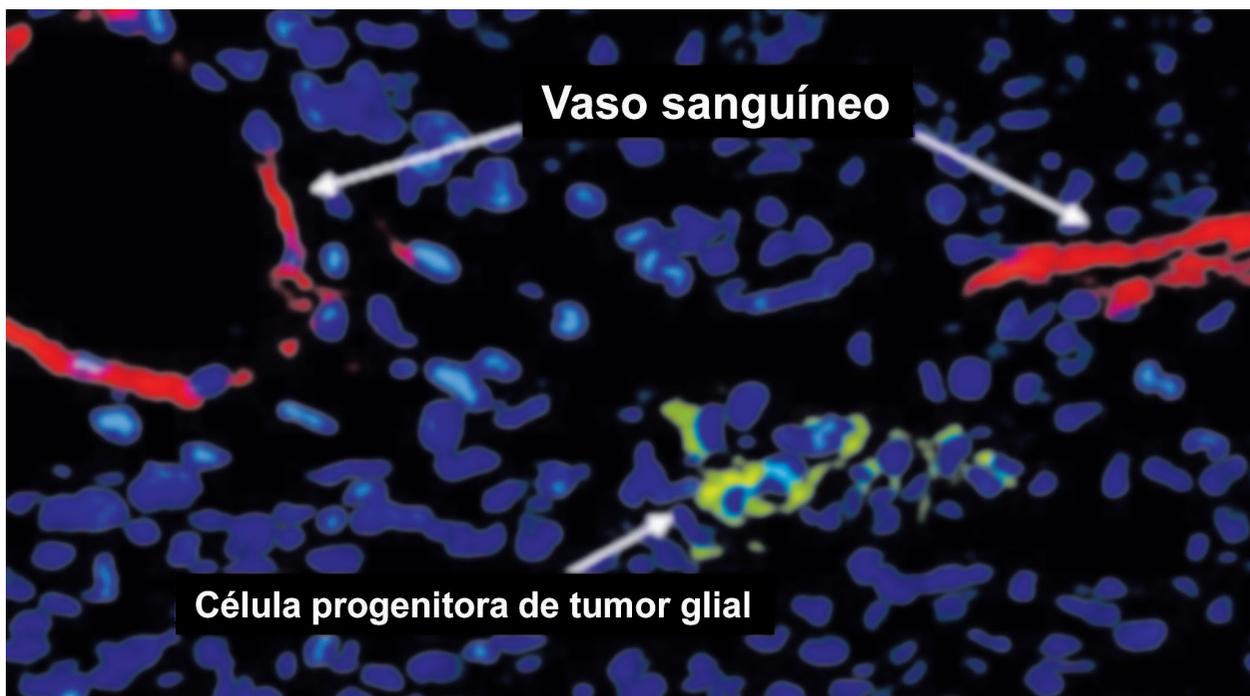
Siguiendo los modelos de variación genética de la neurosfera, Singh y colaboradores inocularon células aisladas de tejido tumoral (gliomas de alto grado) en el cráneo de roedores inmunosuprimidos, encontrando que el número mínimo de células requeridas para reproducir una neoplasia era de 10⁵; sin embargo, cuando el experimento se reprodujo utilizando células CD133⁺ estimuladas por EGF, el número requerido se redujo hasta 100^{23,42}. Es importante resaltar que no solo las células progenitoras neurales y neoplásicas expresan

CD133, también lo hacen las células endoteliales que hacen parte de los vasos sanguíneos necesarios para el desarrollo del cerebro normal y para la génesis tumoral^{43,44}.

El microambiente de las células progenitoras en los tumores gliales

La existencia de las células progenitoras de la leucemia mieloide aguda permitió determinar la importancia del microambiente para mantener su función y estado quiescente^{9,12,14}. El nicho perivascular de los progenitores tumorales gliales está altamente especializado y depende en gran medida de los capilares, que son semejantes a los encontrados en la región periventricular del cerebro humano. La proximidad con las células endoteliales permite la comunicación intercelular que se ve enriquecida por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento endotelial tipo C (VEGFC) y el factor pigmentado derivado del endotelio⁹, moléculas que facilitan principalmente la migración y proliferación neoplásica. También, hay evidencia consistente de que la matriz extracelular aporta puntos clave para la regulación de los precursores tumorales a través de la tenascina-C, un gen que se

Figura 3. Localización de las células progenitoras en el nicho vascular. Tinción con el anticuerpo anti-L1CAM diseñado para primordios de glioblastoma (verde) y anti-CD31 relacionado con las células endoteliales.



Fuente: tomado con autorización de Cheng L, Bao S, Rich JN. Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):654-65.

expresa para generar propiedades antiadhesivas en las células de la cresta neural, bloqueando la interacción de la fibronectina con los sindecanos⁴⁵. Además, el condroitin-sulfato mantiene estimulada a la célula progenitora para mantener su estado primitivo, impidiendo la evolución de su progenie.

A pesar de que el comportamiento del nicho afecta la biología de las células progenitoras en el tumor, la comunicación no es unidireccional; varios estudios han demostrado la habilidad que tienen los precursores para promover la replicación de las células endoteliales, incluyendo el estímulo necesario para la formación de estructuras neovasculares complejas⁴⁶ inducido mediante el incremento de los niveles de VEGF y de BDNF^{9,47}. Como complemento, Calabrese y colaboradores encontraron, en estudios de rastreo con microscopía multifotón láser, que las células CD133⁺/nestina⁺ siempre se encuentran en íntima proximidad con el endotelio vascular de los GB, meduloblastomas, ependimomas y oligodendrogliomas⁴⁷. La figura 3 muestra la proximidad de las células progenitoras con el nicho vascular.

Clásicamente, las descripciones patológicas de los gliomas de alto grado relatan un crecimiento vascular desorganizado y aberrante, generado de forma aleatoria para suplir la voracidad del tumor, sin embargo, varias revisiones publicadas recientemente explican que esta arquitectura se dispone en forma alterada para servir como aposento a los precursores tumorales y a sus análogos vasculares^{9,14}. Las células progenitoras gliales y su descendencia están capacitadas para entrar en los vasos sanguíneos del cerebro usando el efecto conocido como "satelitosis perivascular", no obstante, es infrecuente encontrar lesiones extraaxiales. Clínicamente, la densidad microvascular del GB se correlaciona con el pronóstico de la enfermedad⁴⁸, factor que contribuye con la respuesta observada a los antiangiogénicos, posiblemente dependientes del VEGF generado en elevadas cantidades por las células CD133⁺⁴⁹. Es más, hay datos que demuestran que las células del GB positivas para CD133 pierden su habilidad para reclutar células endoteliales y formar vasos sanguíneos después de ser expuestas a bajas concentraciones de bevacizumab (Avastin®)⁹. Es probable que este efecto sea controlado, al menos en parte, por la disminución en la expresión de VEGF, VEGFR2 y angiopoyetina-2 (Ang-2)⁹.

Superando la perspectiva preclínica, es claro que tres medicamentos tienen un efecto promisorio sobre

los gliomas de alto grado debido a su potencial inhibitorio sobre el nicho de los progenitores tumorales. El bevacizumab, en curso de ser evaluado en modelos multicéntricos fase III; el cediranib (AZD2171, Recentin®), un agente que actúa sobre los receptores 1, 2 y 3 del VEGF, y que ha demostrado una mediana de SLP y SG en pacientes con gliomas de alto grado recurrentes alrededor de los 110 y 210 días, respectivamente⁵⁰; y el cilengitide, dirigido contra las integrinas $\alpha\beta6$, $\alpha\beta5$ y $\alpha\beta3$ ⁵¹. Como se explicó previamente, el efecto de estas moléculas puede ser el resultado de la normalización de los vasos tumorales o la depleción del riego sanguíneo, que interfiere con el mantenimiento y la supervivencia de las células precursoras y terminales.

Papel de las células progenitoras en los meduloblastomas

Los dos epitelios germinales del cerebelo se encuentran en la zona ventricular profunda a la altura del velo de la médula posterior y en la capa más externa del metencéfalo⁵². La matriz de la primera de estas regiones da origen a varios linajes celulares neuronales y gliales, y la segunda solo produce las células granulares, el elemento más numeroso encontrado en todo el prosencéfalo⁵³. En los seres humanos, el cenit de crecimiento del cerebelo ocurre tardíamente en comparación con el resto del sistema nervioso central, y su principal etapa de desarrollo está en el tercer trimestre de la gestación, a diferencia de los mamíferos más rudimentarios, en los que este evento ocurre durante las dos semanas siguientes al nacimiento⁵³. Sin embargo, en los niños, la evolución de esta estructura neural se encuentra hasta el final del primer año de vida, y parece ser dependiente de la presencia de células CD133⁺, concentradas principalmente en la sustancia blanca y en el labio rómbico⁵⁴.

La evidencia que conecta las células neurales pluripotenciales con los elementos tumorales del meduloblastoma es meramente correlativa y se sustenta en la expresión de calbindina-D entre los precursores del cerebelo normal y su hallazgo en el 50% de los meduloblastomas, especialmente, en aquellos del tipo clásico. En contraste, las lesiones nodulares o desmoplásicas expresan el marcador p75, lo que sugiere un origen tumoral dual. Esta hipótesis está soportada por el comportamiento de los meduloblastomas inducidos

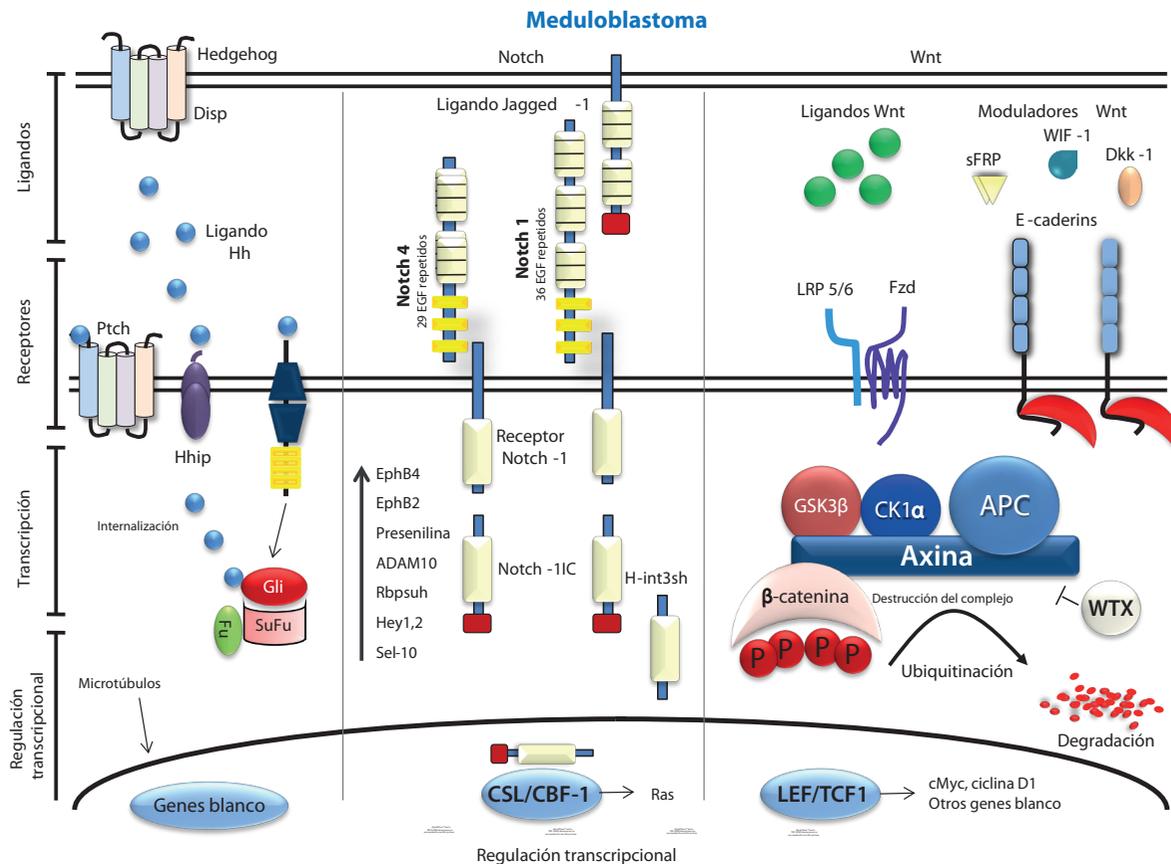
en modelos murinos, que, con frecuencia, expresan CD133+, pero que presentan una evolución disímil de determinada, entre otros, por la activación aberrante del gen Hedgehog (Hh)⁵⁵.

La vía del Hh regula la evolución del cerebelo en muchas especies, pero tiene una importancia cardinal entre los seres humanos, donde promueve la migración de los precursores de las células granulares y su proliferación, incitada por la producción del ligando para Hh en las células de Purkinje. Por otra parte, las mutaciones en el receptor PTCH que resulta en la activación constitutiva de la vía Hh se encuentran en una gran cantidad de sujetos con meduloblastoma esporádico y en aquellos que presentan el síndrome de Gorlin, una entidad autosómica dominante caracterizada por la coexistencia del carcinoma de células basales y de tumores neuroectodérmicos primitivos^{53,56}. Aproximadamente el 14% de los murinos heterocigotos para *PTCH* desarrollan meduloblastomas, en los que, con frecuencia, se encuentra una alteración primaria de los precursores de las células granulares y también

cambios en los genes *SMO* y *SUFU*, generadores de este tipo de neoplasias in vivo⁵⁷. Otros modelos animales han demostrado que los meduloblastomas iniciados por cambios genéticos en vías diferentes a Hh también resultan en la activación de esta vía de señalización; en particular, la inactivación de CXCR6, que resulta en la expresión de *Gli1*, *Gli2*, *Ptc2* y *Sfrp1*, proteínas evidentes en los meduloblastomas que son susceptibles a la inhibición de la Hh con moléculas como la ciclopamina o con inhibidores específicos (Hh-Antag)⁵⁸.

Otra vía de señalización alterada en los meduloblastomas esporádicos y heredados es la *Wingless/Wnt*, que regula la proliferación de las células progenitoras en la región ventricular profunda y en el hipocampo⁹. La pérdida del *Wnt1*, un efector clave de la b-catenina, causa severas anomalías en el cerebro medio y en el cerebelo, y se encuentra sobre-expresado en los meduloblastomas clásicos⁵⁹. Aún no está claro su papel en la regulación de los progenitores pluripotenciales del cerebelo, pero parece depender de mutaciones

Figura 4. Principales vías de señalización de los precursores neurales del cerebelo y de los meduloblastomas.



similares a las identificadas en los pacientes con síndrome de Turcot, una condición autosómica recesiva causada por la pérdida de la función del gen de la poliposis adenomatosa, que se demuestra en el 5% de los meduloblastomas⁵⁹. En un pequeño subgrupo de pacientes con tumores neuroectodérmicos primitivos, también se encontraron mutaciones y la disminución en la expresión de la *Axina-2*, gen que actúa como regulador negativo del Wnt y que ha sido detectado en una pequeña fracción de pacientes con meduloblastoma⁶⁰.

La translocación nuclear de la b-catenina resultante de la activación de la vía Wnt se encuentra en el 25% de los pacientes con meduloblastoma, y, usualmente, corresponde con una elevada presencia de células CD133⁺. Paradójicamente, y en contra de lo que ocurre en los gliomas de alto grado, su presencia se asocia con una evolución clínica favorable relacionada a la ausencia de alteraciones en el Hh y por aberraciones del cromosoma 17⁶¹.

La vía de señalización Notch se encuentra activa en las células progenitoras de la región ventricular profunda y en el segmento rómbico, y promueve su proliferación y supervivencia inhibiendo la diferenciación. No obstante, las cuatro isoformas del receptor no ocasionan las mismas variaciones en el cerebelo; por ejemplo, el Notch-2 estimula la proliferación de los progenitores de las neuronas granulares, mientras el Notch-1 se asocia con su diferenciación, hallazgo que se mantiene en las formas clásicas del meduloblastoma⁶². Algunos tumores neuroectodérmicos primitivos demuestran ganancias en el loci de Notch-2 y coexpresión de la vía Hes1, que se correlacionan clínicamente con un pronóstico adverso, mientras otros estudios han evidenciado la regulación alterna y anormal del Notch vía Hh⁵³. Finalmente, la hipoxia y los productos proteicos que este suceso genera promueven la proliferación de los progenitores celulares del cerebelo estimulados por la vía Notch, hallazgo que ha sido confirmado en el meduloblastoma⁶³. La figura 4 incluye las principales vías de señalización de los precursores neurales del cerebelo y de los meduloblastomas.

Varias vías accesorias podrían promover la generación de meduloblastomas a partir de las células progenitoras neurales. El gen *REN*, localizado en el cromosoma 17, promueve la diferenciación de los precursores granulares suprimiendo las señales de Hh, alteración que resulta frecuente en el meduloblastoma⁵³. El oncogén

N-myc, que juega un papel esencial en el crecimiento del cerebelo, constituye un blanco primario de la vía Hh en el meduloblastoma y se encuentra amplificado en la variante de células grandes, donde favorece un desenlace clínico negativo. Otros factores de transcripción asociados en los procesos más primitivos de la célula progenitora del cerebelo y en su proyección tumoral son el RE-1, OTX2 y BMI1⁵³. Un reporte reciente describió el papel ponderal de las alteraciones moleculares de las células CD15⁺/CD133⁻ como efector de los tumores neuroectodérmicos primitivos del cerebro⁶⁴.

Implicaciones terapéuticas de los progenitores tumorales

Un estudio que incluyó 44 pacientes con GB tratados con cirugía seguida de quimiorradiación con TMZ y el mismo agente de quimioterapia como adyuvancia evaluó el papel pronóstico de la expresión del marcador CD133 y la capacidad del tumor para generar células CD133⁺ en cultivos a largo plazo. La inmunohistoquímica no demostró ningún valor, mientras la capacidad para generar precursores in vitro se relacionó con una reducción significativa en la SG (HR 2.50, IC95% 1.04-6.06; p = 0.004), que fue de 8 (IC95% 4.0-11.5) y 15 meses (IC95% 11.0-19.0) entre los tumores con mayor y menor cantidad de células CD133⁺ (p = 0.0002), respectivamente. De igual forma, la mediana de la supervivencia libre de progresión (SLP) fue de 3.5 meses para los GB con mayor relación de CD133⁺ respecto de los deficientes (9.0 meses; p = 0.0001) y el conteo de CD133⁺ también se asoció con un mayor riesgo de muerte (HR 1.65, IC95% 1.05-2.60; p = 0.0285)⁶⁵. Estos hallazgos sustentan la búsqueda activa de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra los precursores de los tumores cerebrales y su microambiente.

Las intervenciones terapéuticas dirigidas contra los progenitores celulares de los tumores cerebrales pueden dividirse en tres grupos: el primero, encaminado a provocar la diferenciación de los precursores; el segundo, diseñado para eliminar las células progenitoras inhibiendo su multipotencialidad y quiescencia; y el tercero, destinado a agredir el microambiente tumoral^{66,67}. Las terapias encargadas de provocar la diferenciación de los progenitores concentran su eficacia en la capacidad de revertir el estado de malignidad, lo que repercute

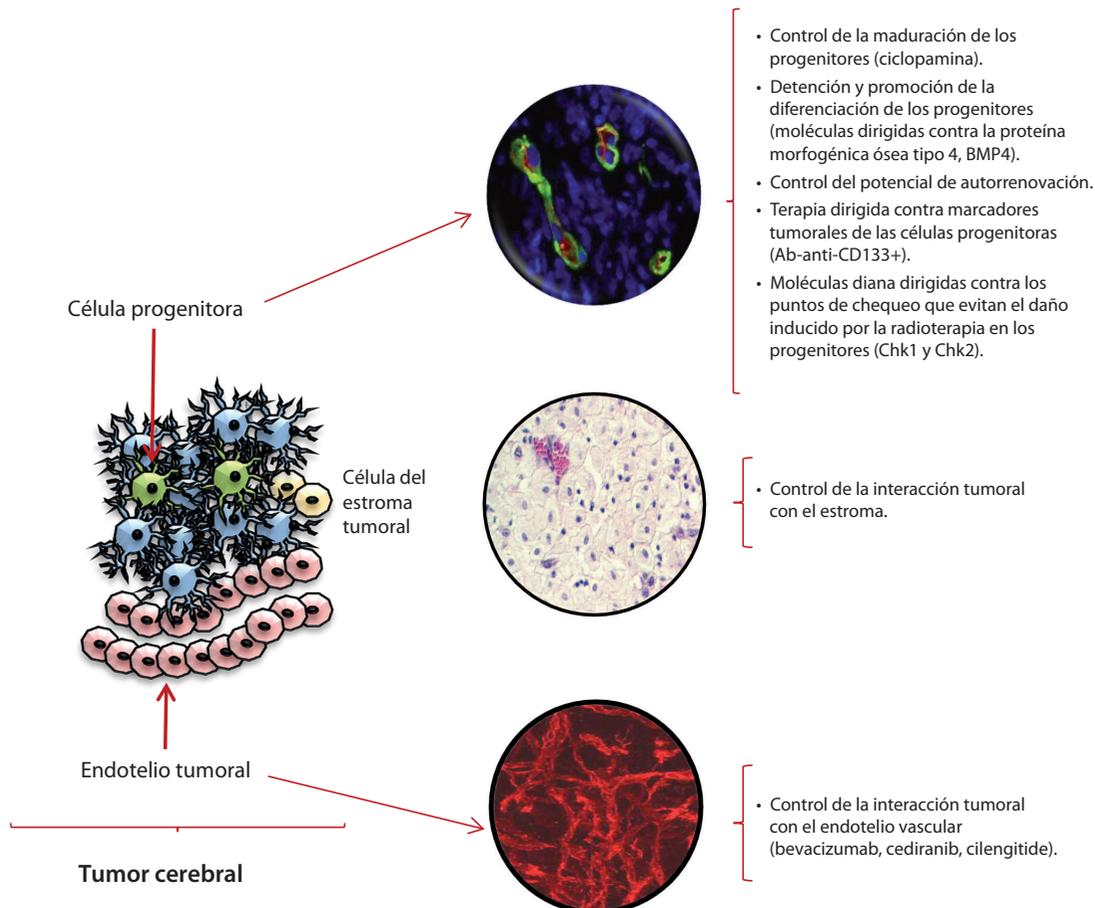
principalmente en la propiedad de autorregeneración⁶⁸. Hasta el momento, dos grupos de medicamentos afectan la diferenciación, los derivados del ácido retinoico y los compuestos dirigidos contra los cambios epigenéticos (dehacetiladores de histonas).

Entre los compuestos destinados a eliminar las células progenitoras, destaca la terapia dirigida contra marcadores tumorales de las células progenitoras (Ab-anti CD133⁺)⁹, los inhibidores de la vía Hh (ciclopamina, NBT-272, vismodegib)⁶⁹, los agonistas del PPAR-gamma⁷⁰, la TMZ⁷¹, los inhibidores mTOR (sirolimus, everolimus, temsirolimus, deforolimus)⁷², los derivados de la proteína morfogenética ósea (BMP)⁷³, las moléculas diana dirigidas contra los puntos de chequeo que evitan el daño inducido por la radioterapia en los progenitores (Chk1 y Chk2)¹⁵, el imatinib⁷⁴ y los inhibidores de la superfamilia ABCB⁷⁵. Así mismo, es importante mencionar los medicamentos que modifican el microambiente tumoral, entre otros, los antiangiogénicos, como el bevacizumab⁴⁷, el cediranib⁵⁰

y el cilengitide⁷⁶. De igual modo, los inhibidores de la PI3K, que actúan sensibilizando a la irradiación los progenitores del meduloblastoma más próximos al nicho vascular⁷⁷. La figura 5 muestra algunas estrategias dirigidas contra los precursores celulares de los tumores cerebrales.

El efecto del ácido retinoico sobre las células CD133⁺ parece estar relacionado con la represión de la vía Wnt/b-catenina que detiene la proliferación que se acompaña de la sobreexpresión de la Axina⁷⁸. La misma estrategia se utilizó en un modelo preclínico para probar la utilidad de la combinación del ácido 13-cis-retinoico más el vorinostat (SAHA) en cultivos celulares de meduloblastoma. El ácido retinoico actúa a través de la activación transcripcional de la BMP-2, y el SAHA facilita la apoptosis controlando la cromatina, efectos que se traducen en el incremento de la sensibilidad al cisplatino y al etopósido⁷⁹. La proteína de choque térmico 90 (HSP90) opera como nodriza de la b-catenina durante su fase de maduración conformacional;

Figura 5. Estrategias dirigidas contra los precursores de los tumores cerebrales.



el inhibidor 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG) modifica el fenotipo de la HSP90 afectando la expresión aberrante de la b-catenina, lo cual facilita la inhibición (in vivo e in vitro) del crecimiento de varias líneas celulares de glioma y de sus progenitores CD133⁺, lo que se traduce en un aumento del efecto de la radiación en el GB, hallazgo que es más evidente durante la exposición a la TMZ⁸⁰.

Por el papel preponderante del Hh en el desarrollo de los progenitores neurales normales y tumorales, Bar y colaboradores exploraron la utilidad de la ciclopamina en una subpoblación de primordios celulares de GB⁸¹. En este estudio, el 26% de las muestras demostraron sobreexpresión de Gli1, un blanco clave de esta vía, que fue inhibido satisfactoriamente en el 60% de los casos, lo que ocasionó una disminución significativa en el crecimiento de los progenitores CD133⁺. En paralelo, la administración de ciclopamina sobre las neuroferas inhibió la generación de nuevas colonias, sugiriendo la regresión de la capacidad clonogénica de los progenitores en los gliomas. En el 2009, Rudin y colaboradores informaron sobre la utilidad del vismodegib (GDC-0449) en un paciente de 26 años con meduloblastoma refractario a múltiples intervenciones, debido a la activación aberrante del Hh mediada por la pérdida de heterocigidad y la mutación del gen PTCH1 (*encoding patched homologue 1*), un regulador negativo clave en su vía de señalización⁸². Posteriormente, el mismo grupo identificó el patrón de resistencia al vismodegib relacionado con la sustitución de un aminoácido en un residuo de ácido aspártico conservado del receptor serpentine Smoothened (SMO), lugar de unión del medicamento que no afecta la transmisión de señales de Hh pero interrumpe su capacidad de unión⁸³. Desde entonces, se han desarrollado varios estudios que han confirmado la eficacia, seguridad y el patrón de resistencia al vismodegib en pacientes con meduloblastoma (NCT01601184, NCT01239316, NCT00939484, NCT00822458)⁸⁴.

Beier y colaboradores demostraron que la TMZ es incapaz de inducir la muerte de las células CD133⁺, pero inhibe eficazmente la proliferación reduciendo su metabolismo in vitro en un 72% después de siete días de incubación⁷¹. Dependiendo del subtipo celular, la TMZ indujo arresto en la transición de G_{2-M} o detención del ciclo celular en G₂. Sin embargo, en todos los cultivos, las células en pico sub-G₀, que indican la tasa

de apoptosis, fueron inferior al 8%. De forma similar, el mismo estudio demostró que el patrón de presentación del promotor del gen MGMT no difirió entre las células CD133⁺ y las CD133⁻, pero la expresión de la proteína MGMT fue mayor entre las células negativas, lo que no permite explicar la susceptibilidad de los progenitores al alquilante⁷¹.

Los progenitores gliales y su progenie conservan un mecanismo de diferenciación homogéneo promovido por la BMP y sus ligandos, que suelen reducir la cantidad de células CD133⁺ favoreciendo el aumento de la astrogliosis y de los elementos celulares similares a las neuronas⁸⁵. Piccirillo y colaboradores encontraron en algunos modelos in vivo que el estímulo terapéutico de las diversas isoformas de la BMP retarda el crecimiento tumoral y el potencial de invasión vascular del GB⁷³; sin embargo, su utilización en seres humanos podría resultar en un efecto paradójico⁸⁶.

Como se comentó previamente, el uso de bevacizumab atenúa la capacidad de los progenitores tumorales para promover la angiogénesis, no solo a través de la regulación de la acidosis y la hipoxia, sino también por la activación de oncogenes, como el PTEN y el EGFR⁴⁹. El cediranib, un pan-inhibidor del receptor VEGF, normaliza los vasos sanguíneos del tumor en pacientes con GB recurrente, aliviando el edema perilesional y reduciendo la capacidad de reproducción de los progenitores CD133⁺ y de las células precursoras del endotelio⁵⁰. Por otra parte, el cilengitide reduce la expresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ en el microambiente tumoral, disminuyendo la capacidad migratoria y proliferativa de los precursores hasta en un 60%, efecto que parece ser dependiente de las dosis y de la coexpresión de otros antígenos de superficie en las células endoteliales (CD144 y factor de von Willebrand)⁷⁶.

Últimos hallazgos

Recientemente, Chen y colaboradores ratificaron que se necesita un pequeño número de células pluri-potenciales de estirpe glial implantadas en un murino para desarrollar un tumor⁸⁷. Empleando ratones que albergan alelos condicionales para los genes supresores de tumores NF1, p53 y PTEN, que desarrollan espontáneamente gliomas con una penetrancia del 100%, se generó un transgénico que alberga un cassette que contiene una versión modificada del herpes

simple con expresión de timidina quinasa, evento que permite temporalmente la regulación de la división de los progenitores neurales por vía sistémica utilizando ganciclovir. El estudio demostró que la exposición crónica al antiviral bloquea la neurogénesis abatiendo las células quiescentes al momento de entrar al ciclo celular. Curiosamente, las neoplasias ricas en células pluripotenciales demostraron una elevada proporción de células mitóticamente activas (elevación del KI_{67}) sin reactividad para la GFAP. Esto indica que la mayoría de los GB son ricos en células latentes capaces de regenerarse y evolucionar después de la exposición a la radioterapia más los agentes alquilantes; con el tiempo, luego del tratamiento, la población de células ricas en GFAP dan lugar a elementos que pierden progresivamente la pluripotencialidad, es decir, la expresión de nestina y la latencia relativa. En adición, los autores encontraron en los modelos endógenos de glioma que la temozolamida afecta parcialmente los derivados celulares en proliferación activa, pero no el segmento de células quiescentes positivas para la GFAP. Una hipótesis derivada de este evento podría hacer que la erradicación constitutiva de las células madre permitiera controlar el surgimiento de nuevos

tumores, intervención dominada por la exposición continua al ganciclovir⁸⁸.

La controversia sigue abierta, en especial, cuando muchas de las plataformas in vivo de orden animal no son reproducibles en la práctica clínica regular. Hace 12 años, Rainov reportó los resultados de un experimento clínico fase III que incluyó el uso de la timidina quinasa del virus herpes tipo I más ganciclovir como terapia farmacogenómica adyuvante a la resección quirúrgica más radioterapia en pacientes con glioblastoma de novo²⁸. Tras la inclusión de 248 sujetos, la supervivencia libre de progresión (SLP) en el grupo de intervención fue de 180 días en comparación con 183 para quienes solo recibieron la teleterapia (control). De forma similar, la mediana de supervivencia global (SG) fue 365 días contra 354 días para los mismos brazos, y la tasa de supervivientes a 12 meses fue del 50% y 55%, respectivamente. Todas las diferencias no fueron significativas, en especial, por la baja penetración de la timidina quinasa viral en las células tumorales. Además, el modo de inyección manual de los vectores de las células con un fenotipo similar al de los fibroblastos no migratorios limitó la distribución de la intervención en el tumor⁸⁹.

Referencias

1. CBTRUS 2000-2004 data. United States population estimates by 5-year age group were obtained from United States census; estimates available at <www.census.gov>.
2. Ries LA, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, et al., editors. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute, Bethesda, MD, in <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/>, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2008.
3. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 2.0. IARC Cancer Base N° 5. Lyon, IARC Press, 2004. Limited version available from: URL: <http://www.depdb.iarc.fr/globocan2002.htm>.
4. Stupp R, Roila F; ESMO Guidelines Working Group. Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2008;19 Suppl 2:ii83-5.
5. Gilbert MR. Designing clinical trials for brain tumors: the next generation. *Curr Oncol Rep*. 2007;9(1):49-54.
6. Buckner JC. Factors influencing survival in high grade gliomas. *Semin Oncol*. 2003;30(6 Suppl 19):10-4.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-96.
8. Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, Jaeckle KA, Kyritsis AP, Prados MD, et al. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol*. 1999;17:2572-8.
9. Gilbertson RJ, Rich JN. Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):733-6.
10. Nam DH, Park K, Suh YL, Kim JH. Expression of VEGF and brain specific angiogenesis inhibitor-1 in glioblastoma: prognostic significance. *Oncol Rep*. 2004;11(4):863-9.
11. Knizetova P, Darling JL, Bartek J. Vascular endothelial growth factor in astroglia stem cell biology and response to therapy. *J Cell Mol Med*. 2008;12(1):111-25.
12. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414(6859):105-11.
13. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;51(1):1-28.
14. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med*. 1997;3(7):730-7.
15. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:399-421.

16. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:223-50.
17. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703-16.
18. Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA, Morassutti D, et al. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron.* 1994;13(5):1071-82.
19. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature.* 2004;427(6976):740-4.
20. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997;17(13):5046-61.
21. Zhenju J, Lenhard R. Telomeres and telomerase in cancer stem cell. *Eur J Cancer.* 2006;42:1197-1203.
22. Kania G, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, et al. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells.* 2005;23(6):791-804.
23. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396-401.
24. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011-21.
25. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 2006;444(7120):756-60.
26. Rich JN. Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res.* 2007;67(19):8980-4.
26. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 2004;64(19):7011-21.
27. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer.* 2006;5:67-78.
28. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res.* 2004;64(20):7183-90.
29. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(6):425-36.
30. Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res.* 2008;33(12):2407-15.
31. Gu H, Wang S, Messam CA, Yao Z. Distribution of nestin immunoreactivity in the normal adult human forebrain. *Brain Res.* 2002;943(2):174-80.
32. Holmin S, Almqvist P, Lendahl U, Mathiesen T. Adult nestin-expressing subependymal cells differentiate to astrocytes in response to brain injury. *Eur J Neurosci.* 1997;9(1):65-75.
33. Dahlstrand J, Collins VP, Lendahl U. Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors. *Cancer Res.* 1992;52(19):5334-41.
34. Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell.* 2002;1(3):269-77.
35. Erlandsson A, Enarsson M, Forsberg-Nilsson K. Immature neurons from CNS stem cells proliferate in response to platelet-derived growth factor. *J Neurosci.* 2001;21(10):3483-91.
36. Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron.* 2007;53(4):503-17.
37. Hitoshi S, Seaberg RM, Kosciak C, Alexson T, Kusunoki S, Kanazawa I, et al. Primitive neural stem cells from the mammalian epiblast differentiate to definitive neural stem cells under the control of Notch signalling. *Genes Dev.* 2004;18(15):1806-11.
38. Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron.* 2001;29(1):45-55.
39. Zhang XP, Zheng G, Zou L, Liu HL, Hou LH, Zhou P. Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;307(1-2):101-8.
40. Purow BW, Haque RM, Noel MW, Su Q, Burdick MJ, Lee J, et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(6):2353-63.
41. Miele L. Notch signaling. *Clin Can Res.* 2006;12(4):1074-9.
42. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003;63(18):5821-8.
43. Assanah M, Lochhead R, Ogdan A, Bruce J, Goldman J, Canoll P. Glial progenitors in adult white matter are driven to form malignant gliomas by platelet-derived growth factor-expressing retroviruses. *J Neurosci.* 2006;26(25):6781-90.
44. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Can.* 2008;8(10):755-68.
45. Garcion E, Halilagic A, Faissner A, French-Constant C. Generation of an environmental niche for neural stem cell development by the extracellular matrix molecule tenascin C. *Development.* 2004;131(14):3423-32.
46. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006;441(7097):1075-9.
47. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007;11(1):69-82.
48. Leon SP, Folkerth RD, Black PM. Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer.* 1996;77(2):362-72.
49. Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2006;66(16):7843-8.
50. Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, et al. AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer Cell.* 2007;11(1):83-95.

51. Stupp R, Goldbrunner R, Neyns B, Schlegel U, Clement P, Grabenbauer GG, et al. Phase I/IIa trial of cilengitide (EMD121974) and temozolomide with concomitant radiotherapy, followed by temozolomide and cilengitide maintenance therapy in patients (pts) with newly diagnosed glioblastoma (GBM). *J Clin Oncol.* 2007;25(18S):2000.
52. Sotelo C. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol.* 2004;72(5):295-339.
53. Fan X, Eberhart CG. Medulloblastoma Stem Cells. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2821-7.
54. Wang VY, Rose MF, Zoghbi HY. Math1 expression redefines the rhombic lip derivatives and reveals novel lineages within the brainstem and cerebellum. *Neuron.* 2005;48(1):31-43.
55. Lee Y, Miller HL, Jensen P, Hernan R, Connelly M, Wetmore C, et al. A molecular fingerprint for medulloblastoma. *Cancer Res.* 2003;63(17):5428-37.
56. Dahmane N, Sánchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, et al. The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis. *Development.* 2001;128(24):5201-12.
57. Yang ZJ, Ellis T, Markant SL, Read TA, Kessler JD, Bourboulas M, et al. The cellular origin of Patched associated medulloblastoma. *Neuro-Oncology.* 2007;9:559.
58. Sasai K, Romer JT, Kimura H, Eberhart DE, Rice DS, Curran T. Medulloblastomas derived from Cxcr6 mutant mice respond to treatment with a smoothed inhibitor. *Cancer Res.* 2007;67(8):3871-7.
59. Schüller U, Rowitch DH. Beta-catenin function is required for cerebellar morphogenesis. *Brain Res.* 2007;1140:161-9.
60. Koch A, Hrychuk A, Hartmann W, Waha A, Mikeska T, Waha A, et al. Mutations of the Wnt antagonist AXIN2 (Conductin) result in TCF-dependent transcription in medulloblastomas. *Int J Cancer.* 2007;121(2):284-91.
61. Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, et al. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle.* 2006;5(22):2666-70.
62. Dakubo GD, Mazerolle CJ, Wallace VA. Expression of Notch and Wnt pathway components and activation of Notch signaling in medulloblastomas from heterozygous patched mice. *J Neurooncol.* 2006;79(3):221-7.
63. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell.* 2007;129(3):465-72.
64. Wechsler-Reya R, Read TA. Medulloblastomas from patched mutant mice are propagated by a CD15(+)/CD133- neural progenitor. *Neuro-Oncology.* 2007;9:559.
65. Banna GL, Pallini R, Ricci-Vitiani L, Signore M, Lombardi D, Martini M, et al. High prognostic potential of glioblastoma stem cell analysis. *J Clin Oncol.* 2007;25(18S):10580.
66. Spira AI, Carducci MA. Differentiation therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2003;3(4):338-43.
67. Massard C, Deutsch E, Soria JC. Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol.* 2006;17(11):1620-4.
68. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;51(1):1-28.
69. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG—GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol.* 2007;17(2):165-72.
70. Chearwae W, Bright JJ. PPARgamma agonists inhibit growth and expansion of CD133+ brain tumour stem cells. *Br J Cancer.* 2008;99(12):2044-53.
71. Beier D, Röhrl S, Pillai DR, Schwarz S, Kunz-Schughart LA, Leukel P, et al. Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res.* 2008;68(14):5706-15.
72. Guzman ML, Rossi RM, Karnischky L, Li X, Peterson DR, Howard DS, et al. The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood.* 2005;105(11):4163-9.
73. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature.* 2006;444(7120):761-5.
74. Dresemann G, Hosius C, Lilienthal J, Schleyer E, Bogdan U, Weller M, et al. Treatment failure due to intracerebral stem cell-like behavior of glioblastoma (GBM) cells: A reason for targeted maintenance therapy with imatinib (I) and hydroxyurea (H)? An analysis of study DE21 and DE40 (Ambrosia). *J Clin Oncol.* 2008;26:2048.
75. Schatton T, Murphy GF, Frank NY, Yamaura K, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008;451(7176):345-9.
76. Loges S, Butzal M, Otten J, Schweizer M, Fischer U, Bokemeyer C, et al. Cilengitide inhibits proliferation and differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;357(4):1016-20.
77. Hambardzumyan D, Becher OJ, Rosenblum MK, Pandolfi PP, Manova-Todorova K, Holland EC. PI3K pathway regulates survival of cancer stem cells residing in the perivascular niche following radiation in medulloblastoma in vivo. *Genes Dev.* 2008;22(4):436-48.
78. Lu J, Zhang F, Zhao D, Hong L, Min J, Zhang L, et al. ATRA-inhibited proliferation in glioma cells is associated with subcellular redistribution of beta-catenin via up-regulation of Axin. *J Neurooncol.* 2008;87(3):271-7.
79. Spiller SE, Ditzler SH, Pullar BJ, Olson JM. Response of preclinical medulloblastoma models to combination therapy with 13-cis retinoic acid and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *J Neurooncol.* 2008;87(2):133-41.
80. Sauvageot CM, Weatherbee JL, Kesari S, Winters SE, Barnes J, Dellagatta J, et al. Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro Oncol.* 2009;11(2):109-21.
81. Bar EE, Chaudhry A, Lin A, Fan X, Schreck K, Matsui W, et al. Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma. *Stem Cells.* 2007;25(10):2524-33.
82. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med.* 2009;361(12):1173-8.
83. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, et al. Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma. *Science.* 2009;326(5952):572-4.
84. LoRusso PM, Rudin CM, Reddy JC, Tibes R, Weiss GJ, Borad MJ, et al. Phase I trial of hedgehog pathway inhibitor

- vismodegib (GDC-0449) in patients with refractory, locally advanced or metastatic solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2502-11.
- 85.** Li Z, Wang H, Eyster CE, Hjelmeland AB, Rich JN. Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. *J Biol Chem.* 2009;284(25):16705-9.
- 86.** Lee J, Son MJ, Woolard K, Donin NM, Li A, Cheng CH, et al. Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells. *Cancer Cell.* 2008;13(1):69-80.
- 87.** Chen J, McKay RM, Parada LF. Malignant glioma: lessons from genomics, mouse models, and stem cells. *Cell.* 2012;149(1):36-47.
- 88.** Chen J, Li Y, Yu TS, McKay RM, Burns DK, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 2012;488(7412):522-6.
- 89.** Rainov NG. A phase III clinical evaluation of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and ganciclovir gene therapy as an adjuvant to surgical resection and radiation in adults with previously untreated glioblastoma multiforme. *Hum Gene Ther.* 2000;11(17):2389-401.