



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

Análisis de la implicación de los
microRNAs en la diferenciación de las
células madre tumorales de glioblastoma
multiforme

Beatriz Aldaz Arrieta

Pamplona, 2011

Servicio de Publicaciones de la Universidad de Navarra

ISBN 978-84-8081-287-0

Memoria presentada por D^a. Beatriz Aldaz Arrieta para
optar al grado de Doctor por la Universidad de Navarra.

Pamplona, noviembre de 2011



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

José Ángel Martínez-Climent, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor contratado Doctor de la Universidad de Navarra y Director del Laboratorio de Oncología Molecular del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra.

Raquel Malumbres Equísoain, Doctora en Bioquímica, Colaboradora de Investigación del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra.

CERTIFICAMOS: que el trabajo titulado: “Análisis de la implicación de los microRNAs en la diferenciación de las células madre de tumor cerebral de glioblastoma multiforme” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Oncología Molecular del Centro de Investigación Médica Aplicada de la Universidad de Navarra por Beatriz Aldaz Arrieta, Licenciada en Biología y Bioquímica, para optar al título de Doctor por la Universidad de Navarra.

Consideramos que este trabajo reúne los requisitos necesarios para que la interesada pueda optar al citado título.

Pamplona, noviembre de 2011

José Ángel Martínez-Climent

Raquel Malumbres Equísoain

Esta tesis se ha llevado a cabo con la ayuda de una beca de la Fundación para la Investigación Médica Aplicada y una beca predoctoral de formación en investigación del Instituto de Salud Carlos III.

A mi madre y a mi padre.

A mi hermano.

Quiero agradecer desde aquí a todas y cada una de las personas que me han ayudado tanto profesional como personalmente a la realización de esta tesis, todas habeis contribuido a que esto finalmente fuera posible. Es imposible resumir tantos nombres en un par de folios...Muchísimas gracias a todos.

Este trabajo se ha podido desarrollar gracias a la ayuda económica de la Fundación para la Investigación Médica Aplicada y del Instituto de Salud Carlos III.

José Ángel, muchas gracias por haberme dado la oportunidad de poder realizar la tesis en tu laboratorio, una gran experiencia. Gracias por toda la confianza que has depositado en mi a lo largo de estos años y por haberme apoyado frente a las adversidades siempre que lo he necesitado.

Raquel, gracias por haberme ayudado tanto en la realización de esta tesis, a todos los niveles; por intentar transmitirme tu tranquilidad "zen" en mis momentos de agobio y sobre todo por tu ayuda en el período final de redacción de la tesis. Contigo, los momentos malos eran menos malos, muchas gracias de todo corazón.

Gracias a todas las personas del laboratorio 1.08, grandes compañeros, que siempre me han ayudado a superar los malos momentos y a compartir las alegrías. A todos los que han pasado por el laboratorio durante estos años, de todos me llevo un gran recuerdo, con momentos memorables: Izaskun, Jose, José Ignacio, Lorena,... Y a los actuales, qué habría hecho sin vosotros! Sois mi segunda familia: Carol, Elena, Vicente, Meli, Fer, Sergio... Me gustaría agradecer en especial a Ainara, toda su ayuda a lo largo de estos años con los ratones, porque siempre me has ayudado cuando te lo he pedido y siempre con una sonrisa, muchas gracias de verdad. Eloy, gracias a ti también por tu ayuda en los momentos que la he necesitado, te lo agradezco enormemente. Gracias a Kris y a Amagoyis, por los grandes momentos que hemos compartido

durantes esos oasis que son las comidas en el punto de encuentro, por haberme apoyado y escuchado, y por tener siempre una sonrisa y pasarlo tan bien juntas. Gracias a mis compañeros de fatigas, Angie baby y Javi, por habernos apoyado tanto mutuamente a lo largo de esta montaña rusa emocional que es una tesis...y como dice Javi: "todo va a salir bien, ya verás". Gracias en especial a los dos últimos fichajes de la temporada, Menus y Aizea, por ser cómo sois, porque me habeis dado vuestra amistad y vuestro cariño, y vuestra locura también! Me alegro mucho de haberos conocido y espero que sigamos manteniendo esta amistad durante muchos años.

Me gustaría también agradecer a todas las personas de la planta de Oncología y del resto de áreas toda su ayuda cuando la he necesitado, y su interés y cariño en muchos casos. Después de tanto tiempo, ésta es como mi segunda casa.

Muchas gracias a Marta Alonso, por haber estado siempre dispuesta a ayudarme y a animarme en los momentos difíciles. Es una suerte haber contado con tu ayuda en este proyecto, muchas gracias.

Muchas gracias a Ricardo Diez Valle y Sonia Tejada, por haberme enseñado la parte clínica de esta enfermedad con tanta amabilidad, he aprendido mucho de vosotros, gracias.

Muchas gracias a Daniel Lim y a los miembros de su laboratorio, porque la estancia en San Francisco fue una experiencia maravillosa a todos los niveles, gracias por todo lo que aprendí con vosotros, de la ciencia y de la vida en general. Y hablando de San Francisco, muchas gracias Almu, la estancia allí contigo junto con Chelsea y Kelly, fue algo increíble que nunca podré olvidar, y en gran parte es por ti, gracias.

Gracias Lydia, por apoyarme y siempre haber intentado entenderme a pesar de que este mundo de la ciencia sea tan difícil de entender. Me has ayudado mucho

escuchándome siempre que lo he necesitado, me siento afortunada de tenerte como amiga. También a Adri, Itsaso y Lucía, por haberme apoyado durante todo este tiempo.

Gracias a todas mis amigas de la carrera, Miriam, Sara, Laura, Patri O, Adri...porque vosotras sabéis lo qué es pasar por esto...muchas gracias por vuestro apoyo incondicional y vuestra amistad. Gracias a todos mis amigos: Isa, Caye, Carlota, Luci, Adri, Cris, Raquel, Rafa, Iñigo, Aitor, y tantos otros...que siempre habeis hecho que me olvidara de los problemas de la tesis y me lo pasara en grande con vosotros.

Gracias a toda mi familia, y en especial a mis tías M^a Paz, M^a Jesús y Charo, que siempre se han preocupado por mi y me han dado su cariño y su apoyo. Gracias tía Tere por tener siempre tanta confianza en mi, cuando yo no creía en mi, tú siempre me devolvías esa confianza perdida, muchas gracias. Y especialmente, muchas gracias a mi tía Celi, por cuidarnos tan bien y ser tan generosa con nosotros.

Muchas gracias a mis padres, porque siempre me han transmitido los valores importantes de la vida: el trabajo, el sacrificio, la honestidad y la alegría. Por hacerme saber con sus palabras y sus actos que todo lo que vale la pena en la vida requiere siempre un gran esfuerzo. Y ellos siempre lo han hecho por mi. Muchas gracias de todo corazón, por vuestro apoyo y vuestro amor. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

Muchas gracias Enrique, por haberme ayudado, escuchado y apoyado siempre que lo he necesitado, eres un hermano genial.

Josema, muchas gracias por toda la ayuda que me has brindado en esta tesis, muchas veces sin siquiera pedirla, eres una gran persona. Sin ti, todo habría sido muy diferente, has convertido una etapa gris en un cielo luminoso y te estaré eternamente agradecida por eso.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	15
INTRODUCCIÓN.....	25
I.1. Glioblastoma multiforme (GBM).....	27
I.1.1. Características de los tumores cerebrales malignos	27
I.1.1.1. Clasificación morfológica de los tumores del SNC	27
I.1.1.2. Epidemiología de los tumores cerebrales.....	30
I.1.2. Características del glioblastoma multiforme (GBM).....	31
I.1.2.1. Patología molecular del GBM y otros gliomas malignos	32
I.1.2.2. Subclases moleculares de glioma.....	36
I.2. Células madre en el Sistema Nervioso Central (SNC) adulto:.....	38
I.2.1. Neurogénesis en el SNC maduro	40
I.3. Células madre tumorales de cáncer cerebral (BTSCs).....	43
I.3.1. Introducción a la hipótesis de la célula madre de cáncer	43
I.3.2. Diferentes modelos de formación tumoral	45
I.3.2.1. Modelo "estocástico".....	48
I.3.2.2. Modelo "reina"	48
I.3.2.3. Modelo "jerárquico"	48
I.3.2.4. Modelo "de plasticidad"	49
I.3.3. Definición de célula madre de tumor cerebral (BTSC).....	49
I.3.4. Aislamiento de células madre neurales y células madre tumorales mediante cultivo de neuroesferas	52
I.3.5. Caracterización de las células madre de tumor cerebral	54
I.3.6. Marcadores antigénicos de células madre de tumor cerebral.....	56
I.3.6.1. CD133	57

I.3.6.2. Nestina (NES)	59
I.3.6.3. CD44	60
I.3.6.4. Vimentina (VIM).....	60
I.3.6.5. CD15	61
I.3.6.6. A2B5	61
I.3.7. Marcadores moleculares de células madre de tumor cerebral.....	62
I.3.7.1. BMI1	62
I.3.7.2. SOX2.....	62
I.3.7.3. MELK.....	63
I.3.7.4. Proteínas de la ruta NOTCH	63
I.3.7.5. Mushasi-1	64
I.3.8. Marcadores de diferenciación de células BTSCs	64
I.3.8.1. Diferenciación astrocítica.....	66
I.3.8.1.1. GFAP.....	66
I.3.8.2. Diferenciación neuronal	67
I.3.8.2.1. MAP2	67
I.3.8.2.2. III- β -Tubulina (TUBB3 / TuJ1).....	67
I.3.8.3. Diferenciación oligodendrocítica	69
I.3.8.3.1. Galactocerebrosidasa (GALC)	70
I.3.8.3.2. O4.....	70
I.3.9. Posible origen de las BTSCs	70
I.3.9.1. Rutas de señalización comunes implicadas en la génesis del GBM y en NSCs	71
I.3.9.2. Papel del nicho de las células madre de tumor cerebral.....	73
I.4. Terapia del GBM.....	74

I.4.1. Opciones actuales de terapia del GBM	74
I.4.2. Las células madre de tumor cerebral como posible diana terapéutica	75
I.4.2.1. Inhibición de las rutas de señalización de las BTSCs	78
I.4.2.2. Diferenciación de BTSCs	78
I.4.2.3. Eliminación del soporte del nicho vascular	79
I.5. MicroRNAs	80
I.5.1. Descubrimiento y características de los microRNAs	80
I.5.2. Biogénesis de miRNAs y su regulación	81
I.5.3. miRNAs en el GBM	83
I.5.3.1. Estudios de perfiles de expresión de miRNAs en GBM	84
I.5.3.2. Regulación mediante miRNAs de las rutas genéticas clásicas alteradas en GBM	85
I.5.3.2.1. miRNAs sobreexpresados en GBM	86
I.5.3.2.1.1. miR-21	87
I.5.3.2.1.2. miR-221/222	88
I.5.3.2.1.3. miR-26	89
I.5.3.2.2. miRNAs infra-expresados en GBM	90
I.5.3.3. Papel de los miRNAs en la proliferación y diferenciación de GBM- BTSCs	90
I.5.3.3.1. Cluster miR-17/92	92
I.5.3.3.2. miR-124	93
I.5.3.3.3. miR-125b	93
I.5.3.3.4. miR-451	94
I.5.3.3.5. miR-9/9*	95
I.5.3.3.6. miR-128	95

I.5.3.3.7. miR-34a.....	96
I.5.3.3.8. miR-326.....	96
HIPÓTESIS	97
OBJETIVOS.....	101
MATERIAL Y MÉTODOS	105
M.1. Cultivo de neuroesferas de tumores primarios.....	107
M.2. Estudios de autorrenovación	108
M.2.1. Ensayo de autorrenovación por dilución clonal	108
M.2.2. Ensayo de autorrenovación por dilución límite	109
M.3. Generación del modelo xenotransplante de BTSCs.....	109
M.3.1. Ratones utilizados en el xenotransplante	109
M.3.2. Puesta a punto del modelo de xenotransplante tumoral murino	110
M.3.2.1. Líneas celulares.....	111
M.3.2.2. Plásmido retroviral reportero SFG-nesTGL	111
M.3.2.3. Producción retroviral.....	113
M.3.2.4. Cuantificación del título viral	115
M.3.2.5. Infección retroviral de las líneas celulares de GBM Y BTSCs.....	116
M.3.2.6. Inyección estereotáctica intracraneal	117
M.3.2.7. Estudios de bioluminiscencia <i>in vivo</i>	118
M.3.2.8. Medida de la actividad tumoral en los ratones mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET)	118
M.3.2.9. Estudios post-mortem	119
M.3.3. Xenotransplante de BTSCs	120
M.4. Extracción ácidos nucleicos (DNA y RNA)	120
M.5. RT-PCR cuantitativa.....	121

M.6. Inmunofluorescencia.....	123
M.7. Estudio de expresión mediante micrarrays de microRNA.....	125
M.7.1. Procesado de muestras	125
M.7.2. Análisis bioinformático del microarray de microRNAs	126
M.8. Ensayos de microRNA de TaqMan	127
M.9. Generación de modelos celulares de sobreexpresión e inhibición de microRNAs.....	130
M.9.1. Transfección de BTSCs	130
M.10. Estudios de viabilidad celular (MTS)	133
M.11. Estudios de muerte celular	134
M.12. Técnica de Western Blot (WB).....	134
M.13. Estudio de expresión génica mediante micrarrays de expresión.....	136
M.13.1. Análisis bioinformático del microarray de expresión.....	137
M.14. Análisis combinatorio del microarray de miRNAs junto con el microarray de expresión.....	138
M.15. Análisis estadístico.....	139
RESULTADOS	141
R.1. Obtención de BTSCs a partir de muestras quirúrgicas de GBM	143
R.1.1. Derivación de los cultivos <i>in vitro</i> de neuroesferas a partir de las muestras quirúrgicas de GBM	143
R.1.2. Análisis de la capacidad de autorrenovación de los cultivos de neuroesferas	144
R.1.2.1. Ensayo de dilución clonal	144
R.1.2.2. Cuantificación mediante ensayo de dilución límite	145
R.1.3. Análisis de la tumorigenicidad <i>in vivo</i> de las BTSCs obtenidas.....	146

R.1.3.1. Puesta a punto del modelo de xenotransplante murino intracraneal mediante inyección estereotáctica con líneas celulares de GBM	147
R.1.3.2. Inyección intracraneal de las líneas de BTSCs derivadas de muestras de pacientes de GBM.....	152
R.2. Desarrollo del modelo de diferenciación de las BTSCs obtenidas	154
R.2.1. Selección de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado ...	157
R.2.1.1. Estudio de expresión de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado a nivel de RNA mensajero en muestras control	157
R.2.1.2. Estudio de expresión de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado a nivel de RNA mensajero en las muestras de BTSCs	161
R.2.1.3. Análisis de expresión de los marcadores de BTSCs y células diferenciadas a nivel de proteína	165
R.3. Análisis de la implicación de los microRNAs en la diferenciación de BTSCs	166
R.3.1. Estudio de la expresión diferencial de microRNAs entre las líneas de BTSCs en estado indiferenciado (neuroesfera) y tras 4 y 14 días de cultivo en medio de diferenciación.....	167
R.3.1.1. <i>High-throughput screening</i> mediante microarrays de microRNAs .	167
R.3.1.2. Validación de los microRNAs diferencialmente expresados según el microarray de microRNAs.....	169
R.3.2. Estudios funcionales de los microRNAs seleccionados, mediante sobreexpresión / inhibición de estos microRNAs.....	172
R.3.2.1. Comprobación del aumento / disminución de los microRNAs tras la transfección de precursores / inhibidores de microRNAs	174

R.3.2.2. Estudio de expresión de marcadores de estado indiferenciado y diferenciado en las muestras transfectadas	179
R.3.2.2.1. Estudio de expresión de marcadores en las muestras transfectadas a nivel de RNA mensajero	180
R.3.2.2.2. Detección de los marcadores de diferenciación a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia	188
R.3.2.3. Análisis de viabilidad celular de las células transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b.....	193
R.3.2.4. Análisis de muerte celular de las células transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b.....	194
R.3.2.4.1. Análisis de muerte celular mediante citometría de flujo	194
R.3.2.4.2. Análisis de expresión de proteínas implicadas en apoptosis	198
R.3.3. Análisis de las posibles rutas moleculares implicadas en la diferenciación de las BTSCs y su relación con microRNAs que se expresan diferencialmente durante este proceso.....	200
R.3.3.1. Análisis de los cambios de expresión génica durante la diferenciación de las BTSCs mediante <i>high-throughput screening</i> con microarrays	201
R.3.3.2. Búsqueda bioinformática de posibles genes diana de los miRNA seleccionados entre los genes con expresión diferencial durante el proceso de diferenciación de las BTSCs.....	204
DISCUSIÓN.....	213
CONCLUSIONES.....	231
ABREVIATURAS	235
BIBLIOGRAFÍA.....	243

INTRODUCCIÓN

I.1. Glioblastoma multiforme (GBM)

El glioblastoma multiforme es un tipo de tumor maligno que se localiza en el cerebro.

I.1.1. Características de los tumores cerebrales malignos

Los tumores cerebrales primarios consisten en un grupo de neoplasias que derivan de varios linajes celulares diferentes. Históricamente, los tumores del sistema nervioso central (SNC) se han clasificado basándose en sus características morfológicas y, más recientemente, por sus propiedades inmunohistoquímicas. Sin embargo, en las dos últimas décadas se han producido avances sorprendentes en el estudio de la biología básica de los tumores cerebrales, especialmente respecto a los gliomas malignos y el meduloblastoma (MB), que son los cánceres cerebrales más comunes en adultos y niños, respectivamente.

I.1.1.1. Clasificación morfológica de los tumores del SNC

Las descripciones microscópicas de los tumores cerebrales comenzaron a principios del siglo diecinueve. En 1926 Bailey y Cushing (Bailey & Cushing, 1926) desarrollaron un esquema de clasificación que sentó las bases sobre las que todavía se apoya el diagnóstico patológico actual. Su sistema proponía que las neoplasias del SNC provenían de precursores gliales (pertenecientes a la glía, las células no neuronales de soporte en el SNC) o neuronales (pertenecientes a las neuronas, las unidades funcionales primarias del sistema nervioso) bloqueados en estadios de desarrollo concretos, y de ese modo surgieron conceptos como histogénesis (origen tisular o tumoral en referencia a su desarrollo y formación) y célula de origen. Mejoras

posteriores, realizadas principalmente por Kernohan (Kernohan & Mabon, 1949) y Ringertz (Ringertz, 1950) llevaron a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), que se formalizó por primera vez en 1979 (Zülch, 1979) y fue renovada en 2007 (Louis *et al.*, 2007).

Además de la agrupación morfológica de los tumores cerebrales respecto a su presunta histogénesis, los esquemas de la OMS destacan por su gradación de clases tumorales individuales (I, II, III y IV) que reflejan el comportamiento biológico de estos tumores. Los grados mas altos (grados III y IV) suelen seguir un desarrollo clínico más agresivo en ausencia de tratamiento que sus homólogos de menor grado (grados I y II). Asimismo, aunque la clasificación de la OMS sigue basándose firmemente en los criterios morfológicos, se ha ido integrando información molecular relevante a lo largo del tiempo.

La mayoría de los gliomas (supuestamente derivados bien de glía madura o bien de precursores menos diferenciados) se infiltran de forma difusa en el tejido cerebral circundante (Figura I.1). Estos tumores conforman un amplio grupo diagnóstico, que la OMS divide en categorías astrocíticas, oligodendrogiales y mixtas (oligoastrocíticas) (Louis *et al.*, 2007), dando lugar a la siguiente clasificación:

1. Tumores astrocíticos

- Astrocitoma difuso (grado II)
- Astrocitoma anaplásico (grado III)
- Glioblastoma multiforme (GBM, grado IV)

2. Oligodendrogiales

- Oligodendroglioma

3. Gliomas mixtos
 - Oligoastrocitoma
4. Tumores ependimarios
 - Ependimoma
5. Tumores neuronales y mixtos
 - Gangliocitoma
6. Tumores gliales / neuronales
 - Tumor neuroepitelial disembrionario
 - Ganglioglioma
7. Tumores embrionarios
 - Meduloepitelioma
 - Ependimoblastoma
 - Neuroblastoma
8. Tumores neuroectodérmicos primitivos
 - Meduloblastoma (MB)

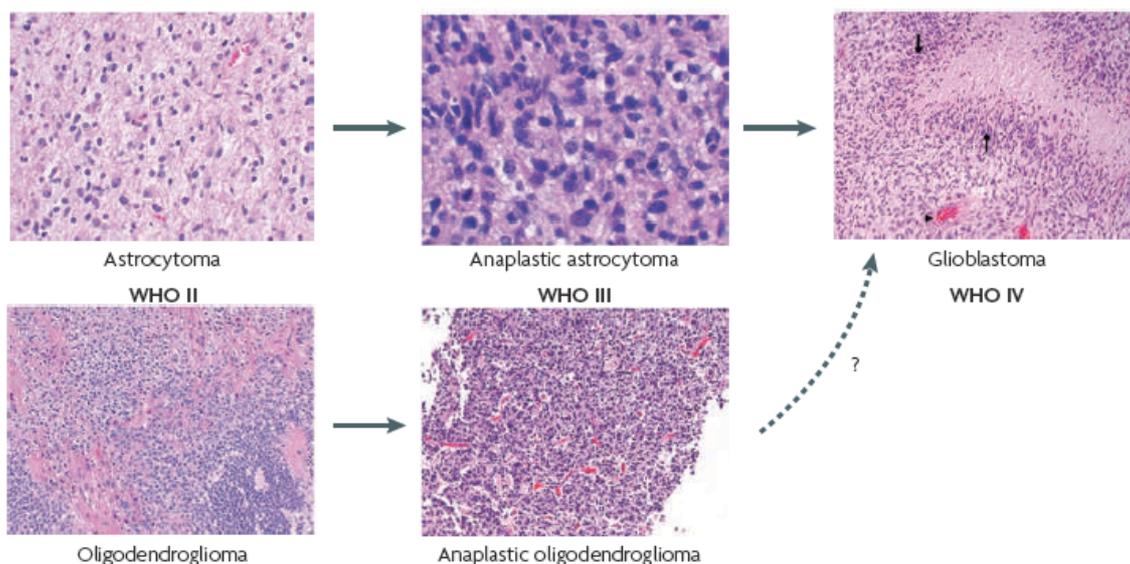


Figura 1.1. Morfología de los gliomas astrocíticos y oligodendrogiales. Micrografías representativas de cada clase tumoral. Se indican las características histológicas distintivas del GBM, como la proliferación microvascular (punta de flecha negra) y la necrosis en pseudoempalizada (flecha negra) (Huse & Holland, 2010).

La presencia de características histológicas como la atipia nuclear, el aumento de proliferación, la proliferación microvascular y la necrosis, dan como resultado una clasificación de alto grado, correspondiente a astrocitoma anaplásico o glioblastoma.

I.1.1.2. Epidemiología de los tumores cerebrales

La incidencia de tumores cerebrales malignos en niños y adultos ha aumentado progresivamente en los últimos 25 años (Jukich *et al.*, 2001; Deorah *et al.*, 2006; Deltour *et al.*, 2009; Pirouzmand & Sadanand, 2007; Smith *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2004). Aunque parte de este incremento podría ser resultado de una mejora de las técnicas de neuro-imagen y el acceso a la atención médica (Schwartzbaum *et al.*, 2006), los estudios epidemiológicos y la variabilidad geográfica de los casos sugieren que la etiología de los tumores cerebrales podría estar asociada con factores ambientales y la exposición a carcinógenos. Por otra parte, las mutaciones genéticas familiares, enfermedades del sistema inmune y la irradiación de alta dosis son causas conocidas de

los tumores cerebrales, aunque probablemente sólo sean responsables de un bajo porcentaje de los casos (Schwartzbaum *et al.*, 2006; Wrensch *et al.*, 2002; Fisher *et al.*, 2007).

Pese a que los tumores cerebrales representan una minoría de los casos de cáncer, con una incidencia de 14,8 tumores cerebrales por cada 100.000 personas al año en Estados Unidos, y prácticamente la mitad de ellos son diagnosticados como benignos, las formas malignas de tumor cerebral presentan una perspectiva devastadora en cuanto a morbilidad y mortalidad (Buckner *et al.*, 2007). Los tumores cerebrales más malignos son los gliomas, y dentro de los gliomas, el glioblastoma multiforme (GBM) es el más común, representando el 40% de todos los tumores malignos primarios del sistema nervioso central (Miller & Perry, 2007). Este tumor se presenta principalmente en adultos, mientras que en niños son más frecuentes los meduloblastomas y los astrocitomas (Vescovi *et al.*, 2006).

I.1.2. Características del glioblastoma multiforme (GBM)

El glioblastoma es la variante más maligna de glioma difuso, con una mediana de supervivencia global de alrededor de 12-15 meses (Daumas-Duport *et al.*, 1988). En la mayoría de los casos surge *de novo* (glioblastoma primario), pero también puede evolucionar a partir de neoplasias astrocíticas de grado bajo (glioblastoma secundario) (Behin *et al.*, 2003). El término "multiforme" hace referencia a la naturaleza heterogénea de este tipo de tumor y a su variada composición histológica (Burger & Kleihues, 1989). Esta heterogeneidad celular incluye tipos celulares diferenciados con morfología estrellada y expresión de marcadores como GFAP y S100, así como otros tipos celulares indiferenciados, más pequeños y redondeados, mezclados con elementos del estroma tales como proliferación celular microvascular, astrocitos reactivos,

microglía y otros infiltrados del sistema inmune (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). Una de las características más importantes del glioblastoma multiforme es su patrón de distribución difusa por el tejido, que resulta en una extensa diseminación de las células tumorales dentro del cerebro, lo que dificulta su resección quirúrgica completa (Holland, 2000). Actualmente el tratamiento estándar para el GBM consiste en la resección quirúrgica del tumor, seguida de una combinación de radioterapia y quimioterapia para eliminar las células tumorales que hayan podido quedar infiltradas en el parénquima cerebral (Stupp *et al.*, 2005). Debido a la dificultad de eliminar todas las células tumorales y a la agresividad de estos tumores, el GBM tiene mal pronóstico y la mediana de supervivencia tratando al paciente con una combinación de quimio (temozolamida, TMZ) y radioterapia tras la resección quirúrgica es de 15 meses (Stupp *et al.*, 2005; Wen & Kesari, 2008). La supervivencia a 5 años de estos pacientes es del 9,8% (Stupp *et al.*, 2009). A causa de estos pronósticos tan pobres, el objetivo fundamental de las investigaciones en este tumor se basa en desentrañar las bases biológicas para desarrollar nuevos tratamientos más efectivos. Así, es fundamental entender las rutas moleculares esenciales en la proliferación, supervivencia e invasión tumoral para diseñar terapias efectivas. Otro campo emergente de investigación es el del desarrollo de modelos precisos de las poblaciones celulares y procesos morfogénicos que dan lugar a las poblaciones heterogéneas de células dentro del tumor. En ambos campos de estudio, las células madre del tumor cerebral representan un concepto central (Laks *et al.*, 2010) como se detalla en el apartado I.3.2.

I.1.2.1. Patología molecular del GBM y otros gliomas malignos

Existen numerosas alteraciones moleculares que se han relacionado con la biología subyacente al glioma difuso y que afectan a vías de transducción de señales que regulan la proliferación celular (Figura I.2).

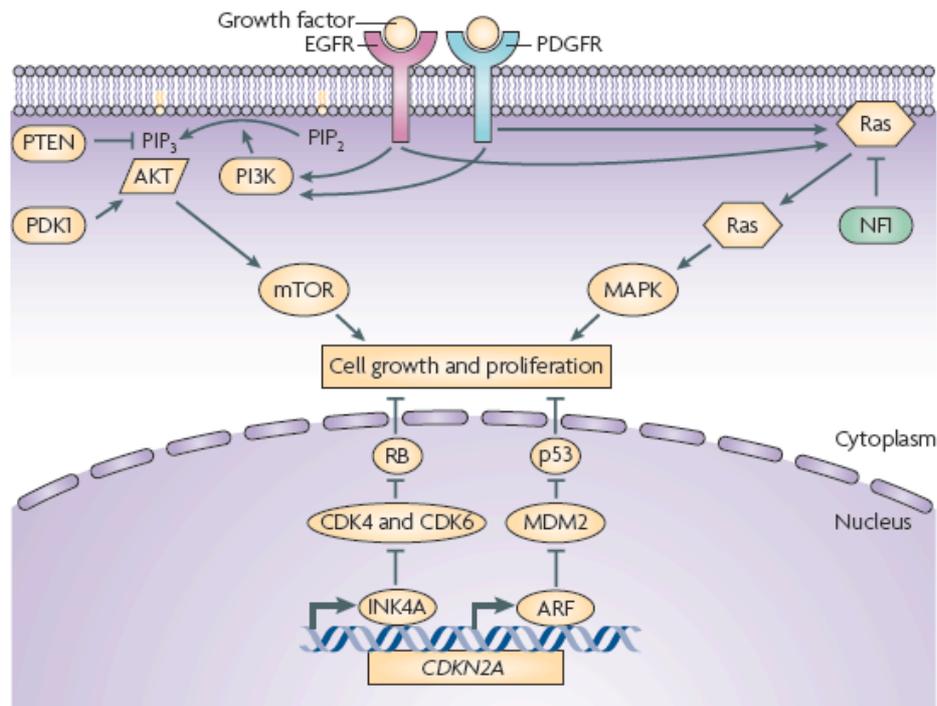


Figura I.2. Esquema de las rutas moleculares más importantes en la patogénesis del glioma.

Las vías de señalización PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK son muy importantes en la biología de los gliomas. Las alteraciones a nivel genómico que pueden aparecer en tres proteínas que participan en las vías PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK: EGFR, PDGFR y NF1, permiten caracterizar distintos subtipos de GBM (ver I.1.2.2). También son comunes los fallos en las rutas de los supresores tumorales RB y p53 (Huse & Holland, 2010).

Resultan de especial interés las vías de señalización PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK, que propagan la señal recibida por receptores tirosin-quinasa (RTKs), tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Las alteraciones que provocan la activación constitutiva de estas vías tienen un papel importante en el desarrollo de los gliomas, así como de otros cánceres. Se han estudiado extensamente las alteraciones en el receptor de crecimiento epidérmico EGFR, ya que en estudios iniciales el GBM primario se asoció con amplificaciones genómicas y mutaciones de la secuencia génica activadoras de *EGFR* (Libermann *et al.*, 1985; Libermann *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 1992), siendo la más frecuente la deleción variante III (vIII) que se halló en el 20-30% de GBM primarios y en el 50-60% de los casos con amplificación de *EGFR* (Frederick

et al., 2000; Sugawa *et al.*, 1990). También se ha demostrado la implicación de otros RTKs en la gliomagénesis, incluyendo el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas- α (PDGFR α), cuya señalización aumentada se observa en los tumores astrocíticos de bajo grado y oligodendrogiales, así como en un subconjunto significativo de GBMs (Di Rocco *et al.*, 1998; Westermarck *et al.*, 1995). Aunque las mutaciones activadoras en *PDGFRA* no son comunes (Clarke & Dirks, 2003), sí que es frecuente la co-expresión del receptor y su ligando, habitualmente PDGFB, que desencadena bucles autocrinos o paracrinos que promueven el crecimiento celular. Además es frecuente encontrar la desregulación de otros componentes moleculares de las rutas PI3K-AKT-mTOR y Ras-MAPK en los gliomas malignos (Guha *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2004). De entre estas alteraciones, la más común es la pérdida funcional del supresor tumoral *PTEN* (Li *et al.*, 1997), un regulador negativo primario de la señalización PI3K-AKT-mTOR (Cairncross *et al.*, 1998; James *et al.*, 1988). Se ha demostrado que la pérdida de *PTEN* facilita la formación de gliomas (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008). Varios modelos murinos han reforzado el papel central de otras proteínas implicadas en la transducción de señales de los receptores RTK en la patogénesis del glioma maligno, tanto si la señalización está alterada a nivel del propio RTK (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2003; Shih *et al.*, 2004; Uhrbom *et al.*, 2002; Uhrbom *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 2009) o de sus proteínas efectoras (como KRAS y/o AKT) (Ding *et al.*, 2003; Ding *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2000). Por ejemplo, se ha demostrado que deleciones del supresor tumoral asociado a la neurofibromatosis tipo 1, neurofibromina 1 (*NFI*), un regulador negativo de la señalización RAS, son capaces de inducir la gliomagénesis en ratón (Kwon *et al.*, 2008; Reilly *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005; Alcantara Llaguno *et al.*, 2009).

Otros supresores tumorales también se encuentran alterados en la gliomagénesis, particularmente componentes de las rutas de P53 y Retinoblastoma (RB). Las mutaciones en el gen *TP53* se relacionaron por primera vez con la gliomagénesis hace 20 años, debido al aumento de desarrollo de gliomas (astrocitomas en la mayoría de los casos) en pacientes con síndrome de Li-Fraumeni, un raro desorden hereditario causado por mutaciones en *TP53* (Malkin *et al.*, 1990; Srivastava *et al.*, 1990). Investigaciones posteriores descubrieron que las mutaciones de *TP53* eran una característica frecuente en los tumores astrocíticos esporádicos de grado bajo y glioblastomas secundarios (Louis, 1994). Asimismo se ha demostrado que la ruta supresora tumoral de RB se encuentra defectuosa en un 78% de GBM primarios (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), bien por mutaciones inactivadoras del propio gen *RBI* o por amplificaciones de sus reguladores negativos *CDK4* (quinasa dependiente de ciclina 4) o, menos habitualmente, *CDK6* (quinasa dependiente de ciclina 6) (Costello *et al.*, 1997; Henson *et al.*, 1994; Reifengerger *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2001). De forma análoga, se ha descrito la amplificación de los antagonistas de P53, *MDM2* y *MDM4* en distintos subconjuntos de GBMs con *TP53* intacto, así como mutaciones inactivadoras y/o deleciones en el *locus* de *CDKN2A* que codifica para dos proteínas, INK4A y ARF, que son reguladores positivos de RB y P53, respectivamente. También se han identificado recientemente, mediante análisis de la secuencia del genoma completo, polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) que suponen factores de riesgo para la gliomagénesis en *CDKN2A* y en el gen adyacente *CDKN2B* (Shete *et al.*, 2009; Wrensch *et al.*, 2009). Estos estudios también han relacionado SNPs en otros genes con una mayor incidencia de gliomas, como por ejemplo en el gen de la helicasa 1 reguladora de la elongación de los telómeros (*RTEL1*) y en el de la retrotranscriptasa telomerasa (*TERT*).

Diversos modelos murinos han proporcionado más evidencias respecto a la importancia de las alteraciones de P53 y RB en la gliomagénesis, demostrando que la pérdida de cualquiera de estos supresores tumorales puede iniciar directamente la formación de glioma, disminuir la latencia libre de enfermedad y/o aumentar el grado tumoral, en varios contextos experimentales (Dai *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; Reilly *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005; Marino *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2008).

I.1.2.2. Subclases moleculares de glioma

En estos últimos años, el estudio de los perfiles transcripcionales de los tumores ha permitido descifrar las relaciones entre la biología de los gliomas y los estadios de desarrollo neuroglial (Phillips *et al.*, 2006; Brennan *et al.*, 2009; Verhaak *et al.*, 2010) (Tabla I.1). De esta forma, se ha podido clasificar los gliomas malignos grados III y IV en 3 subtipos: proneural, proliferativo y mesenquimal, según su semejanza de firmas de expresión génica con cerebro fetal y adulto (proneural), células madre hematopoyéticas (proliferativo) y varios tejidos blandos (mesenquimal), tales como hueso, tejido sinovial, músculo liso y astrocitos fetales. En estos estudios se halló que prácticamente todos los tumores de grado III de la OMS pertenecen a la categoría proneural, junto con un subgrupo de GBM de pacientes jóvenes con cursos clínicos prolongados. Por otro lado, los tumores recurrentes parecen cambiar su firma de mRNA inicial hacia un perfil mesenquimal.

En otro estudio que utilizó los datos de la asociación *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) se obtuvieron patrones similares en GBM primarios (Verhaak *et al.*, 2010). Además de confirmar las firmas proneural y mesenquimal, se identificaron dos patrones adicionales denominados clásico y neural (Tabla I.1). Cabe destacar que al integrar

estos resultados con los datos de número de copia, transcripcionales, de secuenciación y proteómicos, los subgrupos de GBM se correlacionan de forma efectiva con las alteraciones características de las redes de señalización centrales (Brennan *et al.*, 2009; Verhaak *et al.*, 2010). Las diferentes categorías están fuertemente asociadas a las alteraciones genómicas distintivas. La categoría clásica, con alteraciones de EGFR (25-30%); la categoría proneural, con lesiones de PDGFR e IDH1 o IDH2 (25-30%); y el subgrupo mesenquimal con alteraciones de NF1 (30-40%) (Tabla I.1 y Figura I.2). Este hecho sugiere que a pesar de la heterogeneidad genómica los gliomas que expresan perfiles de expresión similares presentan principalmente alteraciones en las mismas rutas de señalización y por lo tanto podrían ser susceptibles al mismo tipo de terapia dirigida (Huse & Holland, 2010).

Analysis of WHO grade III and IV glioma variants ⁸⁸	Analysis of primary glioblastomas ⁹¹	Analysis of primary glioblastomas, some WHO grade II and III gliomas and secondary glioblastomas ⁹⁰	Canonical genomic aberration	Relevant mouse model
Proneural	Proneural	PDGF	<ul style="list-style-type: none"> • PDGFR amplification or mutation • IDH1 or IDH2 mutation 	Localized PDGFB expression combined with genetically engineered tumour suppression loss ¹⁷⁴
Mesenchymal*	Mesenchymal	NF1	NF1 deletion or mutation	Localized deletion of <i>Nf1</i> and <i>Trp53</i> in the mouse SVZ ⁶⁵
	Classical	EGFR	EGFR amplification or mutation	Localized EGFR vIII expression combined with genetically engineered tumour suppressor loss ⁵⁹
Subclass not defined in this study	Neural	Unclassified	Unknown	None

Tabla I.1 Subclases moleculares de glioma maligno definidas a partir de diferentes estudios. *La relación entre los *clusters* mesenquimales definido por Phillips *et al.* y estudios posteriores, no está definida tan claramente como en el *cluster* proneural (Huse & Holland, 2010).

I.2. Células madre en el Sistema Nervioso Central (SNC)

adulto:

Durante mucho tiempo se asumió que el SNC carecía de renovación celular significativa, sugiriendo que a partir de la edad adulta no se generaban apenas nuevas neuronas, y defendiendo el que no existían células madre en el cerebro en la edad adulta.

Ya en la década de 1960 se encontraron indicios de que esta idea podía ser errónea, a raíz de la descripción de la génesis de nuevas células cerebrales funcionales (neurogénesis) en el SNC mamífero adulto (Altman & Das, 1965; Altman, 1966; Dacey & Wallace, 1974). A principios de la década de 1990, siguiendo el trabajo pionero del laboratorio de Fernando Nottebohm que demostró la relevancia funcional de la neurogénesis adulta en ruisiños (Nottebohm, 2004), Reynolds y Weiss describieron el aislamiento de células madre neurales a partir del cerebro de ratones adultos (Reynolds & Weiss, 1992). Varios estudios posteriores confirmaron la neurogénesis persistente en el cerebro adulto de roedores, musarañas (Gould *et al.*, 1997), monos (Gould *et al.*, 1998) y humanos (Eriksson *et al.*, 1998) (revisado en (Lie *et al.*, 2004)). Finalmente se demostró que la neogénesis de células maduras persiste durante la vida adulta dentro de regiones cerebrales concretas, principalmente en la circunvolución dentada del hipocampo y la zona subventricular de los ventrículos laterales del prosencéfalo (Figura I.3). Este es el proceso más importante para la generación e integración de nuevas neuronas en el circuito neuronal pre-existente, y es crucial para el mantenimiento de la integridad, plasticidad y función óptima del cerebro (Ming & Song, 2005).

La consecuencia más importante de la neurogénesis adulta continua es la presencia de células madre y progenitoras, indiferenciadas y mitóticamente activas,

dentro de regiones concretas del cerebro maduro. La estructura general del proceso neogénico celular en el cerebro humano adulto, su compartimentación celular y su organización fundamental en una jerarquía de linajes dentro de las áreas neogénicas, son comparables a las de otros tejidos renovables (Vescovi *et al.*, 2006) (Figura I.4.a).

Las células madre neurales presentan las características propias de otras células madre responsables de renovar diferentes tejidos en un organismo: son células altamente indiferenciadas, dotadas de un extenso potencial proliferativo que les permite encargarse del proceso de homeostasia celular en el tejido a lo largo de la vida del organismo. A menudo las células madre producen todo el abanico de tipos celulares maduros que se encuentran en el tejido de origen (multipotencia). De manera destacada, poseen capacidad de autorrenovación (habilidad de mantener su número a un nivel constante en los tejidos adultos a lo largo de la vida). Las células madre pueden llevar a cabo la autorrenovación mediante divisiones asimétricas, en las cuales se genera una copia de la célula madre inicial, junto con un progenitor más maduro. Se alcanza este mismo resultado cuando, dentro de un conjunto (*pool*) dado de células madre, ocurre el mismo número de ciclos celulares simétricos equivalentes, dando lugar a dos células madre o a dos progenitores más maduros (Loeffler, 1997). La capacidad de autorrenovación sirve para distinguir las células madre somáticas de sus descendientes inmediatos, los cuales constituyen el compartimento de progenitores con capacidad transitoria de división y una capacidad de autorrenovación limitada. Estos descendientes finalmente producen el conjunto de células diferenciadas del compartimento celular maduro. La interrupción de los mecanismos de regulación que controlan la autorrenovación es uno de los mecanismos principales en la génesis de las células *stem-like* iniciadoras del cáncer (Reya *et al.*, 2001; Passegue *et al.*, 2003).

I.2.1. Neurogénesis en el SNC maduro

Durante la vida adulta de un ser humano, el proceso de neurogénesis continúa tiene lugar en dos zonas localizadas del cerebro, la zona subventricular (SVZ) y la zona subgranular (SGZ) de la circunvolución dentada del hipocampo (Figura I.3). La SVZ es la mayor región neurogenética en el cerebro adulto de los mamíferos y está localizada entre el ventrículo lateral y el parénquima del estriado (Figura I.3.a).

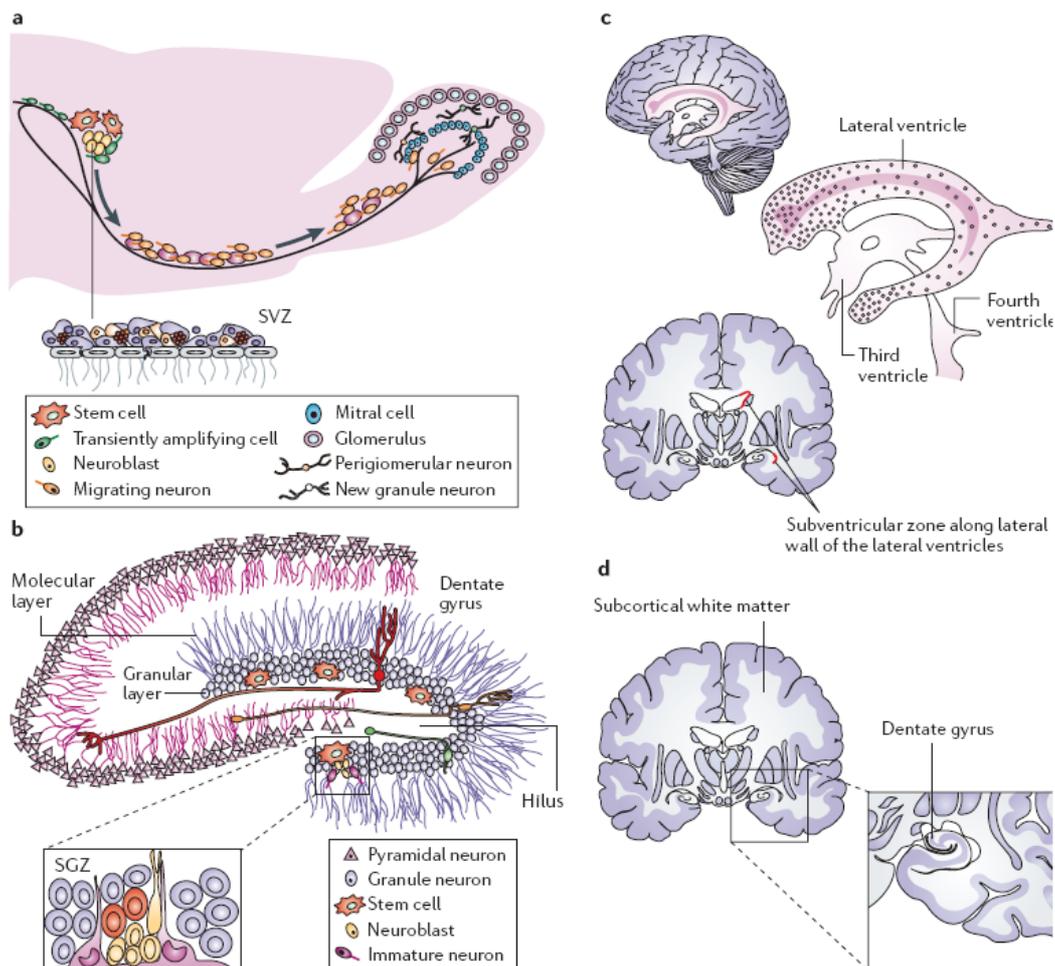


Figura I.3. Anatomía y localización de la zona subventricular y zona subgranular en roedores y humanos. **a)** Sección sagital a lo largo del ventrículo lateral que muestra el área más importante de neurogénesis adulta, la zona subventricular (SVZ) y las células que la componen. Esta región bordea los ventrículos laterales del prosencéfalo. **b)** Una zona adicional de neurogénesis adulta se encuentra en la zona subgranular (SGZ), localizada dentro de la circunvolución dentada del hipocampo. **c)** Localización de la región SVZ en el cerebro humano. **d)** La zona germinal del hipocampo adulto humano se localiza dentro de la circunvolución dentada (Vescovi *et al.*, 2006).

A pesar de controversias previas sobre su identidad, se ha identificado un subconjunto de células de la SVZ que expresan la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), un marcador astrogliar, como las células madre neurales putativas en esta región (Doetsch *et al.*, 1999) (Figura I.4.b). Estas células, denominadas células de tipo B, representan un subconjunto pequeño dentro de la población astrocitaria total en la SVZ, pero son capaces de reconstruir la estructura de neurogénesis completa cuando se eliminan el resto de células con actividad mitótica. Comparadas con células madre de otros tejidos, estas células madre neurales son relativamente quiescentes, con un período de ciclo celular estimado en 28 días. Las células madre neurales (NSCs) adultas generan células progenitoras transitoriamente en división, que se caracterizan por tener un ciclo celular de 12 horas (Morshead *et al.*, 1994). Estos progenitores se llaman células de tipo C, mantienen la capacidad multipotencial y dan lugar a progenitores más maduros, con linaje restringido a neuronas, que se denominan células de tipo A (Figura I.4.b). En ratones, estas células de tipo A migran en haces a través de la extensión rostral de la SVZ hasta el bulbo olfatorio, donde se integran como nuevas interneuronas en las capas corticales. En humanos, las nuevas células generadas no migran en haces hacia el bulbo olfatorio, sino que abandonan la región periventricular de manera individual, hacia un destino aún por determinar (Sanai *et al.*, 2004; Sanai *et al.*, 2005; Quinones-Hinojosa *et al.*, 2006).

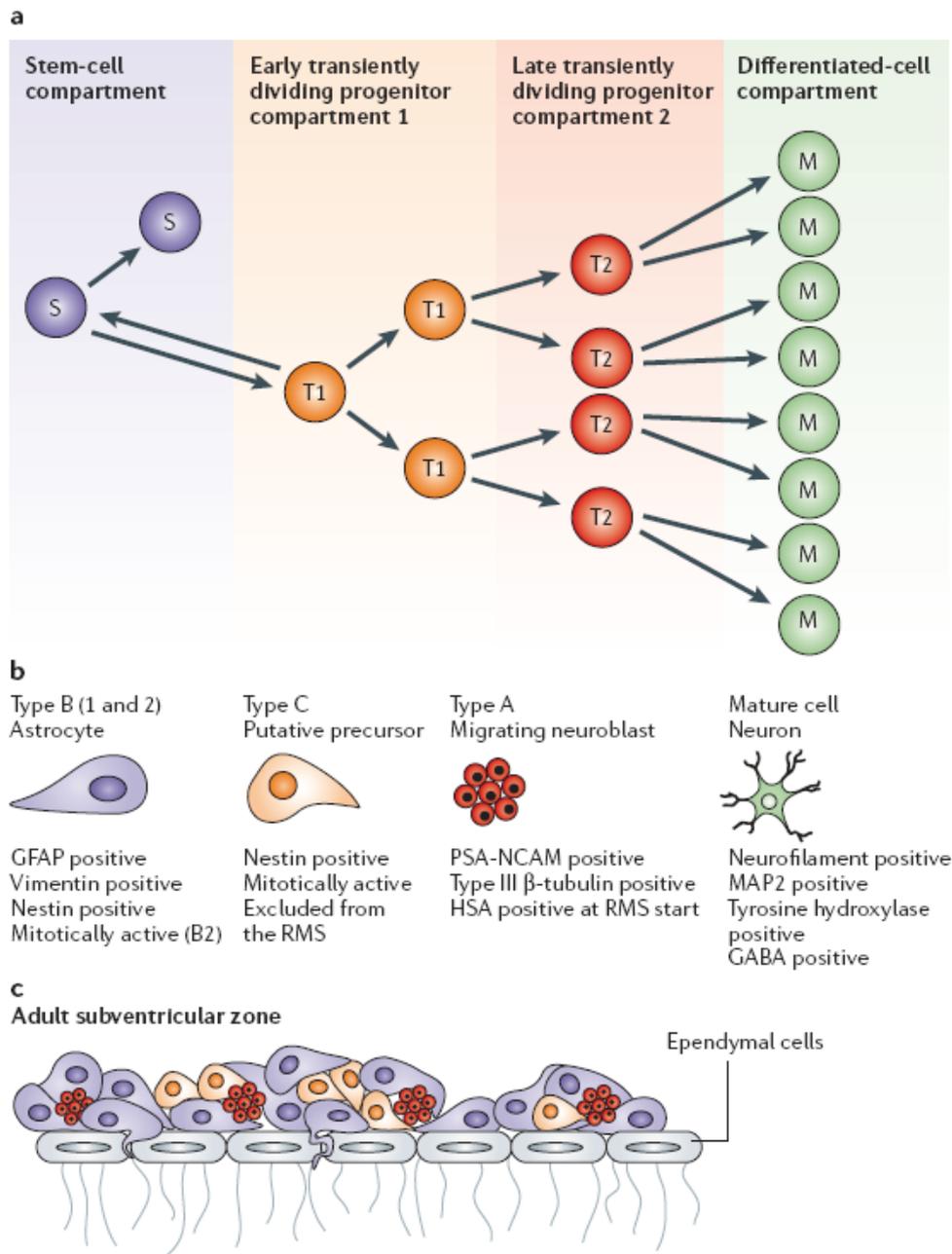


Figura I.4. Organización jerárquica de los compartimentos funcionales en la región SVZ.

a) Descripción del compartimento de célula madre (morado), compartimento de progenitores tempranos de división transitoria (naranja), compartimento de progenitores tardíos de división transitoria (rojo) y compartimento de células diferenciadas (verde). **b)** La región SVZ está compuesta por tres tipos celulares principales: los astrocitos tipo B multipotentes han sido identificados como las células madre de la SVZ, dan lugar a células precursoras transitoriamente proliferativas con un ciclo celular rápido, denominadas precursoras tipo C, que finalmente generan neuroblastos tipo A que siguen presentando mitosis activa. Dichas células tipo A se dividen, migran y son capaces de integrarse como nuevas interneuronas. **c)** Estructura de la zona subventricular, que muestra cómo se organizan los distintos precursores en el neuroepitelio germinal de la mayor región neurogénica del cerebro adulto. GABA, ácido γ -aminobutírico; GFAP, proteína ácida fibrilar de la glía; HSA, antígeno estable al calor; MAP2, proteína 2

asociada a microtúbulos; NCAM-1, molécula de adhesión de célula neural 1; PSA, ácido polisiálico, RMS, corriente migratoria rostral (Vescovi *et al.*, 2006).

Existe otro sistema de neurogénesis jerárquica similar en la SGZ de roedores (Seri *et al.*, 2001; Seri *et al.*, 2004) (Figura I.3.b) y humanos (Eriksson *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2000) (Figura I.3.d). La SGZ se localiza entre la capa granular del hipocampo y el *hilus*, y contiene astrocitos que forman focos de células en proliferación asociados íntimamente con vasos sanguíneos. De forma similar a la SVZ, los astrocitos de la SGZ actúan como células madre neurales y dan lugar a progenitores en división temporal, que se denominan células tipo D, a partir de las cuales se generan nuevos precursores neuronales que migran una corta distancia para integrarse funcionalmente a la capa de células granulares (revisado en (Ming & Song, 2005)).

El hecho de que perduren regiones germinales con compartimentos de células madre neurales y progenitores en división temporal en el SNC adulto apoya la idea de que las células neurales maduras no son la única fuente posible de células tumorales en el cerebro adulto de los mamíferos (Vescovi *et al.*, 2006), sugiriendo que estas células madre/progenitoras podrían transformarse dando lugar a las células madre tumorales.

I.3. Células madre tumorales de cáncer cerebral (BTSCs)

A raíz del descubrimiento de la existencia de las células madre neurales, se comenzó a hipotetizar con la posible presencia de células con características similares que formen parte de la masa de los tumores.

I.3.1. Introducción a la hipótesis de la célula madre de cáncer

El nuevo concepto de que un pequeño subconjunto de células dentro de los tumores pueden poseer la capacidad de producir todas las subpoblaciones celulares que

forman parte del tumor y de regenerar nuevos tumores se ha denominado la hipótesis de las células madre de cáncer (Reya *et al.*, 2001). Este postulado implica que la mayoría de células dentro de un tumor sólido son progenie de estas células madre, no poseen capacidad de autorrenovación y su capacidad proliferativa es limitada, de manera que son incapaces de generar nuevos tumores.

Los términos células propagadoras de cáncer (CPCs), células madre de cáncer (CSCs, por sus siglas en inglés), células tumorales similares a célula madre o células iniciadoras de tumor (TICs, por sus siglas en inglés) se han utilizado indistintamente para describir a las células tumorales con propiedades similares a las de las células madre (Reilly *et al.*, 2008). En los gliomas malignos y otros tumores cerebrales se suelen denominar “células madre tumorales de cáncer cerebral” (BTSCs, por sus siglas en inglés), término que emplearemos en el presente trabajo.

Aunque las BTSCs se encarguen de regenerar todas las células de un tumor, eso no significa que el origen de dicho tumor sea siempre una célula madre neural que ha sufrido una transformación tumoral. También es posible que otras células sean las iniciadoras del tumor y que sufran una acumulación de mutaciones que les confieran la capacidad de autorrenovación necesaria para convertirse en BTSCs (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). En este sentido, se admite que existen células iniciadoras de un tumor que se identifican en los estadios tempranos del desarrollo tumoral y que no han adquirido la capacidad tumorigénica completa, mientras que las BTSCs se aíslan de tumores malignos terminales y son células altamente tumorigénicas en ensayos de xenotransplante. Las propiedades más malignas de las BTSCs se deben a sus numerosas mutaciones, mientras que las células iniciadoras del tumor representan una población celular temprana en el proceso de transformación (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.3.2. Diferentes modelos de formación tumoral

Diferentes células del SNC podrían ser potencialmente células de origen para el inicio del desarrollo tumoral (Figura I.5).

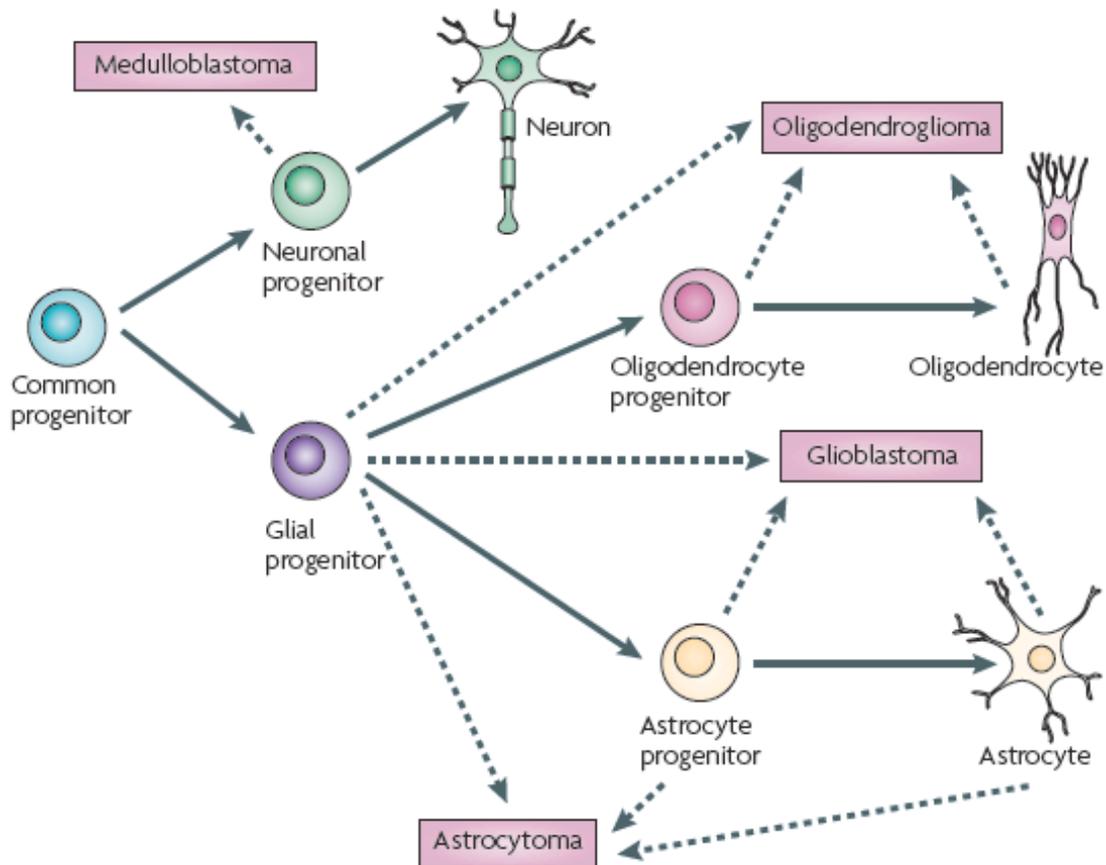


Figura I.5. Posibles células de inicio del tumor situadas en el árbol de linaje neuroglial. Se cree que distintos tumores del SNC pueden originarse a partir de progenitores gliales y neuronales restringidos. Aunque se desconoce la célula de origen concreta para las diferentes variantes de glioma difuso y meduloblastoma, se indica una selección de posibles candidatos (flechas punteadas) (Huse & Holland, 2010).

Como se ha comentado, una secuencia de alteraciones genéticas y/o epigenéticas conlleva al desarrollo de una población de células tumorales tempranas llamadas células iniciadoras de tumor. Mutaciones estocásticas transformadoras posteriores producen poblaciones celulares progresivamente más malignas a través de un "ecosistema neoplásico" en evolución. Se han propuesto varios modelos para explicar cómo estas

células transformadas pueden propagarse y generar la masa tumoral (Figura I.6). No es preciso aplicar un sólo modelo a cada tipo tumoral, sino que diferentes modelos pueden tomar parte en distintos estadios de la progresión maligna de un tumor (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

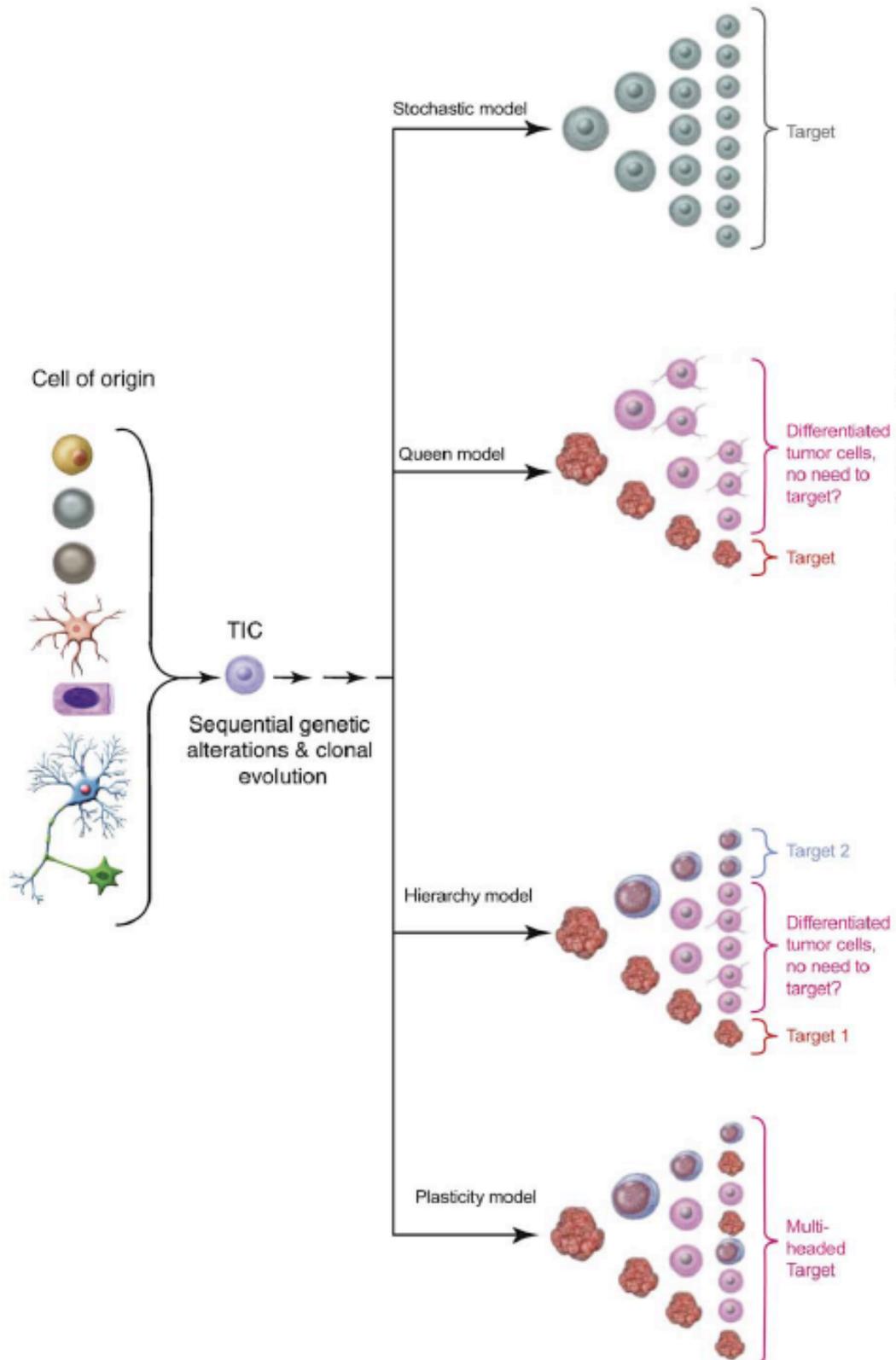


Figura I.6. Representación esquemática de los distintos modelos de generación de tumores a partir de la célula de inicio. (TIC, célula iniciadora de tumor, del inglés *tumour initiating cell*) (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.3.2.1. Modelo "estocástico"

En el modelo estocástico, la masa tumoral se genera a partir de clones de células tumorales indiferenciadas que han ido acumulando secuencialmente un número de mutaciones estocásticas transformadoras, dando lugar a una única diana terapéutica. En este modelo se asume que virtualmente cada célula del tumor es capaz de regenerar el tumor. (Figura I.6)

I.3.2.2. Modelo "reina"

En el modelo "reina", las BTSCs son las responsables de la generación completa del tumor (hipótesis de las células madre de cáncer). Las BTSCs pueden generar células tumorales indiferenciadas y células tumorales diferenciadas terminalmente (TDCs, células con prolongaciones cortas en la Figura I.6). De esta forma, terapias dirigidas contra las BTSCs podrían eliminar toda la masa tumoral. En este modelo, las BTSCs pueden ser células *stem-like*, células transitoriamente amplificadoras (TAC)-*like* o *progenitor-like*. La naturaleza toti-, multi- o mono-potente de las células reina influirá sobre la heterogeneidad y el tipo de marcadores de linaje expresados por el tumor. El potencial de diferenciación de las BTSCs no necesariamente refleja el de la célula de origen, es decir, un comportamiento *stem-like* no significa que el origen sea una célula madre, sino que la célula puede haber adquirido las características de célula madre tumoral debido a la acumulación de mutaciones.

I.3.2.3. Modelo "jerárquico"

El modelo jerárquico introduce el concepto de que los tumores consisten en una jerarquía de células tumorales diversas, con potencial de generación tumoral o mantenimiento tumoral, incluyendo BTSCs (con características *stem-like*, TAC-*like*, y/o

progenitor-like), células tumorales indiferenciadas y TDCs (Figura I.6.). Las terapias dirigidas en este modelo requieren dirigirse a varios tipos de células (BTSCs y células tumorales indiferenciadas).

I.3.2.4. Modelo "de plasticidad"

En el modelo "de plasticidad" existe una jerarquía de diversas células tumorales, y todas ellas podrían desdiferenciarse para dar lugar a la propagación tumoral (Figura I.6). Las estrategias terapéuticas en este modelo son similares a las del modelo jerárquico, excepto que la terapia debería dirigirse a cada célula tumoral, incluyendo las TDCs, ya que todas poseen el potencial de desdiferenciarse y crear nuevas células tumorales propagadoras del tumor.

I.3.3. Definición de célula madre de tumor cerebral (BTSC)

La definición de células madre de tumor cerebral se aplica a menudo de manera laxa, incluyendo frecuentemente células con capacidad de autorrenovación y diferenciación desconocida o limitada, en ausencia de una comprobación de su capacidad iniciadora de cáncer. Esta falta de rigor en la caracterización de las células madre de tumor cerebral crea confusión, agrupando células con características de tumor cerebral auténticas junto con células que no satisfacen estos criterios. La consecuencia de esta situación es la asignación de propiedades divergentes y contradictorias a células con diferentes naturalezas e identidades que son denominadas conjuntamente células madre de tumor cerebral. El desarrollo de una definición rigurosa y su aplicación a través del campo estandarizaría y guiaría el trabajo futuro, permitiendo a los grupos comparar y contrastar sus hallazgos, basándose en un criterio razonable y aceptado por la mayoría. Con este objetivo, Vescovi y colaboradores propusieron en 2006 que el

término célula madre de tumor cerebral sólo se aplicara a las células con las características cardinales que se mencionan a continuación (Vescovi *et al.*, 2006).

1. Capacidad de iniciación tumoral al implantarse de manera ortotópica (los tumores deberían ser una fenocopia del tumor de origen).
2. Capacidad de autorrenovación extensiva, demostrada bien *ex vivo* (mostrando análisis de clonogenicidad secuencial y cinética de poblaciones (Gritti *et al.*, 1996; Galli *et al.*, 2004)) o bien *in vivo* (mediante trasplante ortotópico seriado) (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004)).
3. Alteraciones genéticas o cariotípicas.
4. Propiedades de diferenciación aberrantes.
5. Capacidad de generar células terminales no tumorales.
6. Capacidad de diferenciación multilinaje (no es una característica definitoria en todas las circunstancias).

Las BTSCs se han aislado de diferentes tipos tumorales, incluyendo tumores cerebrales primarios como el GBM, el MB y el ependimoma (Singh *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Hemmati *et al.*, 2003), localizados en diferentes puntos del SNC (Figura I.7).

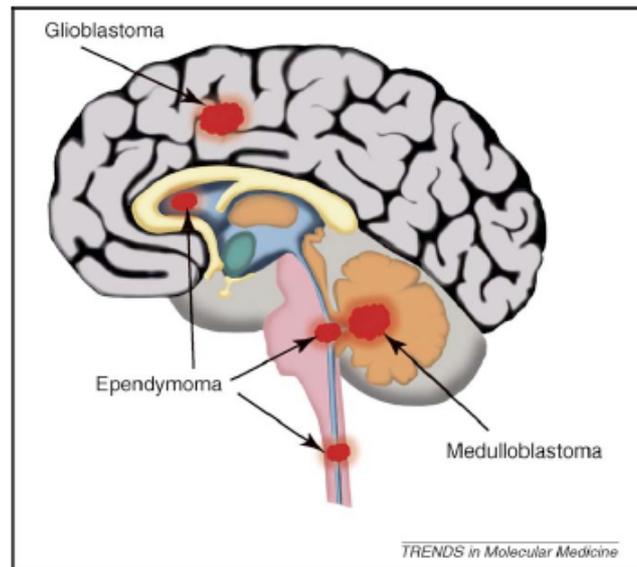


Figura I.7. Localización de GBM, MB y ependimomas en el sistema nervioso central. (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

Estas células constituyen una fracción variable de la población celular total dentro de los tumores cerebrales que pueden potencialmente regenerar el tumor completo. Comparten características semejantes a las de las NSCs no transformadas, como son la autorrenovación (pueden dividirse y generar células madre con capacidades idénticas a la célula parental) y la capacidad de proliferación para generar una extensa progenie. La multipotencia (capacidad de diferenciación a múltiples tipos celulares) no es un requerimiento para las BTSCs porque algunos tipos tumorales pueden presentar un único estadio de diferenciación (Ver modelo "Reina" en la Figura I.6). El ensayo de referencia para la evaluación funcional de la autorrenovación y la propagación tumoral de las BTSCs es la capacidad de propagarse seriadamente en un estadio indiferenciado y generar tumores en animales al transplantarlas (Clarke *et al.*, 2006). Las BTSCs se aíslan a partir de tumores mediante disociación y propagación como neuroesferas en un medio específico (ver I.3.4). En muchos casos expresan marcadores de superficie de NSCs como Nestina y CD133 (Bao *et al.*, 2006a) (ver I.3.5).

I.3.4. Aislamiento de células madre neurales y células madre tumorales mediante cultivo de neuroesferas

Una característica de las NSCs adultas y BTSCs es su gran capacidad para expandirse cuando se cultivan en presencia de los factores de crecimiento adecuados, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Reynolds & Weiss, 1992; Doetsch *et al.*, 1999; Doetsch *et al.*, 2002) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) (Gritti *et al.*, 1996; Gritti *et al.*, 1999). Reynolds y Weiss consiguieron cultivar células madre neurales adultas por primera vez en 1992, aislando una pequeña población de células (< 0,1 % de células totales) a partir del estriado adulto. Para ello utilizaron un sistema de cultivo líquido selectivo, libre de suero, en el que la mayoría de células en diferenciación o diferenciadas mueren rápidamente debido a la falta de suero y la baja densidad celular, mientras que las NSCs responden a los mitógenos EGF y FGF2, se dividen y generan clones multipotentes de células *in vitro* en forma de agregados celulares en suspensión, denominados neuroesferas (Reynolds & Weiss, 1992) que pueden ser disociadas de nuevo consiguiendo una suspensión de células individuales y replaqueadas con medio fresco formando así neuroesferas secundarias. Este proceso puede repetirse en forma de subcultivo seriado, lo que da como resultado un aumento exponencial del número total de células madre (Reynolds & Rietze, 2005). En estas condiciones, los precursores que responden a EGF y FGF2 pueden ser expandidos indefinidamente con escaso cambio en su crecimiento o en sus características de diferenciación (Gritti *et al.*, 1996; Gritti *et al.*, 1999; Reynolds & Weiss, 1996; Vescovi *et al.*, 1999). En el momento en que se eliminan los mitógenos del medio, la progenie de precursores en proliferación puede ser diferenciada hacia neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, los cuales representan los tres tipos celulares primarios que se encuentran en el SNC de los mamíferos adultos. Así, los cultivos de neuroesferas

confirmaron la existencia de la célula madre neural adulta, ya que estas células poseen las características fundamentales de las células madre: autorrenovación, generación de una extensa progenie y capacidad de dar lugar a los tipos celulares primarios del tejido del que se obtienen (Reynolds & Weiss, 1992; Gritti *et al.*, 1999; Galli *et al.*, 2002; Parras *et al.*, 2004; Soria *et al.*, 2004). Este mismo proceso se puede llevar a cabo a partir de muestras de tumores cerebrales para dar lugar a cultivos de neuroesferas de BTSCs (Figura I.8)

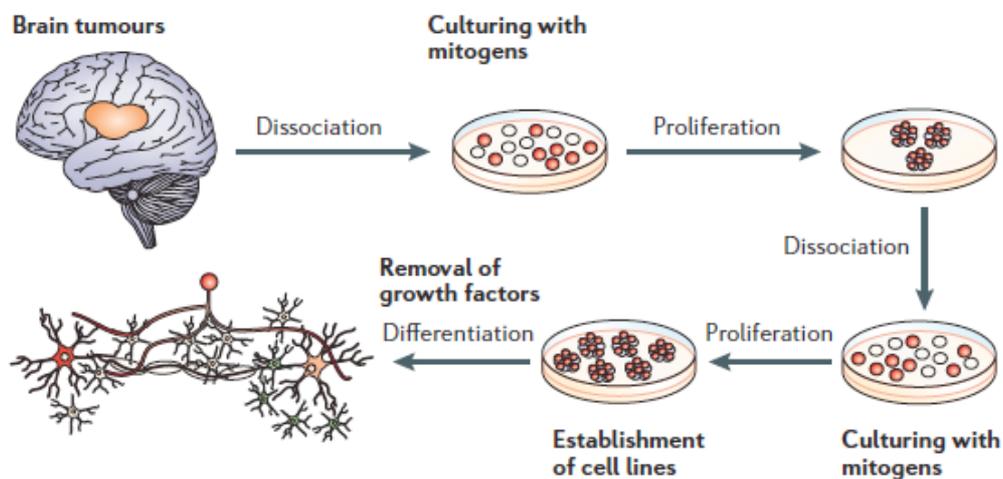


Figura I.8. Aislamiento y perpetuación de células madre de tumor cerebral en cultivo. Se detallan los distintos pasos que conlleva el aislamiento de BTSCs mediante el cultivo de neuroesferas. El contenido de células madre que se obtiene con este sistema es variable y depende del estado del cultivo. El título de células madre es extremadamente alto (aunque nunca llega a la pureza absoluta) después de la disociación y el re-plaqueo (que selecciona negativamente otras células en favor de las células madre neurales), pero tiende a descender progresivamente hasta que se realiza el siguiente pase de subcultivo. Este hecho se debe a la producción de precursores más maduros que ocurre espontáneamente durante la proliferación celular y la formación de neuroesferas (Vescovi *et al.*, 2006).

La primera evidencia de la existencia de células con características de célula madre en los tumores cerebrales humanos fue obtenida por el grupo de Steindler (Ignatova *et al.*, 2002), quienes aislaron precursores clonogénicos formadores de neuroesferas a partir de muestras de GBM. Estas células expresaban algunos marcadores propios de NSCs cuando se mantenían como neuroesferas, y marcadores

neuronales y astrogiales al diferenciarse. Posteriormente dos grupos independientes ampliaron estos descubrimientos, mostrando que tanto el GBM como el MB contienen células formadoras de neuroesferas que pueden dar lugar a células similares a neuronas y astroglia (Hemmati *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2003). Estos hallazgos fueron de enorme relevancia. En primer lugar, confirmaron que diferentes tumores cerebrales contienen precursores neurales transformados e indiferenciados que responden a los mismos mitógenos que activan a las células madre neurales adultas. En segundo lugar, indicaron que las células tumorales similares a célula madre poseen algunas de las características de células madre neurales. Sin embargo, estas observaciones no demuestran si las células similares a célula madre que se derivan de estos tumores poseen capacidad de iniciación tumoral como se esperaría de las células madre de tumor cerebral (Vescovi *et al.*, 2006).

I.3.5. Caracterización de las células madre de tumor cerebral

Galli y colaboradores demostraron que los progenitores clonogénicos formadores de neuroesferas aislados a partir de GBM humano adulto (Galli *et al.*, 2004), además de poseer las características esenciales de célula madre *in vitro* de autorrenovación extensiva, multipotencia y generación de abundante progenie, cuando se derivaban clonalmente eran capaces de iniciar nuevos tumores al transplantarse en el cuerpo estriado de ratones inmunodeficientes adultos (Galli *et al.*, 2004). Estos tumores presentaban las características clásicas del GBM *in vivo*, tales como gran capacidad de migración e infiltración, lo que indicaba que las células madre del tumor cerebral aisladas podían recapitular las características histológicas del GBM *in vivo*. Por otra parte, estas células podían ser re-aisladas a partir de estos tumores y podían reestablecer líneas de células madre secundarias con las mismas características funcionales que las

líneas celulares parentales. Además, estas células del tumor cerebral secundarias eran capaces de dar lugar a nuevos tumores después de transplantarse intracranealmente, lo que demostró su capacidad de autorrenovación *in vivo* (Vescovi *et al.*, 2006). El hecho de que esta población de células poseyera características propias de las células madre, fue el origen de la hipótesis de la existencia de células madre de tumor cerebral (Galli *et al.*, 2004). Un estudio llevado a cabo por el grupo de Dirks en 2004, describió la presencia de precursores iniciadores de tumor CD133⁺ (ver I.3.6.1) con capacidad de autorrenovación en los cultivos de neuroesferas a corto plazo que se habían establecido a partir de GBM y MB (Singh *et al.*, 2004). Se demostró que la fracción CD133⁻ carecía de capacidad tumorigénica. A pesar de que la identidad real de las células madre iniciadoras de tumor en los cultivos de neuroesferas, así como en las poblaciones CD133⁺, permanece sin establecer de forma concluyente, estos descubrimientos apoyan la existencia de las células madre de tumor cerebral en el GBM humano. Esta teoría se expandió rápidamente y existen otros estudios que apoyan la visión de que las células iniciadoras de cáncer en el GBM y el MB son las células madre de tumor cerebral (Tunici *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004).

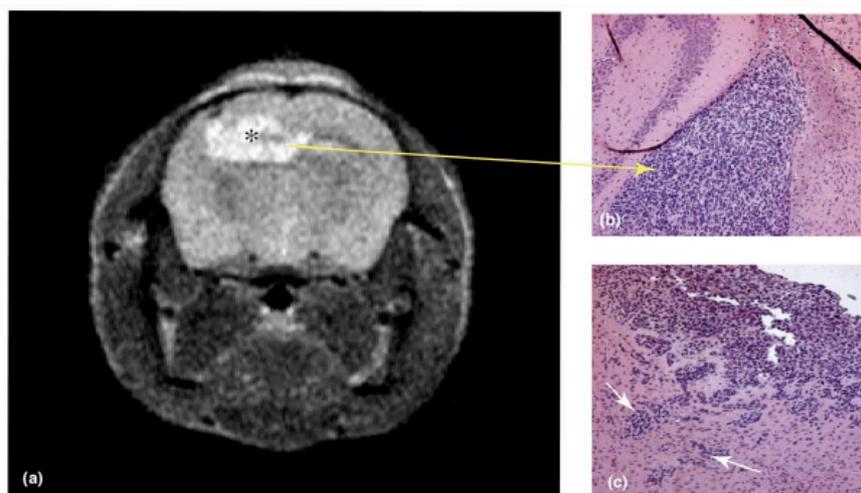


Figura I.9. Xenotransplante de GBM humano generado en un ratón atímico *nu/nu* de 8

semanas tras la implantación intracraneal de neuroesferas derivadas de un espécimen de GBM resecado. **a)** Imagen de resonancia magnética (MRI) ponderada en T₂ que muestra el xenotransplante en el cerebro murino (señalado con *). **b)** Detalle del xenotransplante (señalado por la flecha) en un corte del cerebro murino teñido con hematoxilina/eosina. **c)** Sección del cerebro murino teñida con hematoxilina/eosina en la que se observa la invasión del xenotransplante de GBM humano hacia el cerebro circundante (señalado por flechas) (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

La purificación de BTSCs de gliomas malignos puede asimismo conseguirse basándose en su capacidad para expulsar la tinción Hoescht 33342, una técnica denominada de aislamiento de la población lateral (*side population*, SP) (Kondo *et al.*, 2004). Las células de la SP derivadas de GBM o de la línea celular de glioma de rata C6 forman tumores agresivos en ratones inmunodeprimidos y pueden propagarse *in vitro* como neuroesferas. Las células de SP expresan varios transportadores ABC (*ATP-binding cassette*), lo que probablemente explica por qué no se tiñen con la tinción Hoescht y su resistencia a los fármacos, ya que estas bombas transportadoras los expulsan fuera de la célula.

I.3.6. Marcadores antigénicos de células madre de tumor cerebral

La identificación y aislamiento de las BSTCs continúa siendo una labor confusa, debido a que el término "célula madre de tumor cerebral" se aplica a menudo a células que se han identificado por diferentes métodos y criterios, y que presentan características varias. Pese a que esto es probablemente una consecuencia de la identificación relativamente reciente de estas células, refleja también cambios constantes en el campo de la neurobiología al intentar proporcionar una definición general de células madre neurales e identificar marcadores específicos de estas células. Los marcadores de célula madre neural más comúnmente utilizados suelen ser antígenos intracelulares (Ming & Song, 2005) (ver I.3.6). Este hecho obstaculiza el

enriquecimiento y la purificación de células madre neurales por citometría de flujo. Actualmente se han identificado antígenos de superficie celular y métodos para identificar las células madre neurales en roedores (Rietze *et al.*, 2001; Capela & Temple, 2002; Kim & Morshead, 2003) y humanos (Singh *et al.*, 2004). Estos marcadores de superficie han jugado un papel muy importante en la caracterización y clasificación del SNC, además de servir para evaluar el comportamiento biológico de los tumores cerebrales y como marcadores pronósticos (Pilkington & Lantos, 1994). Sin embargo, y a pesar de las modificaciones que puedan sufrir las células madre tumorales en cultivo, hasta 2006 todos los estudios que han descrito el aislamiento y caracterización de BTSCs utilizaron el ensayo de neuroesferas. Desafortunadamente, en estos momentos ningún marcador celular es definitivo en la identificación de las BTSCs, ya que no todas las células tumorales que expresan cierto marcador son BTSCs, y no todas las BTSCs expresan marcadores conocidos (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). Entre los anticuerpos válidos para detectar poblaciones de células madre y determinar su linaje, se encuentran: CD133, Nestina, Mushashi-1 y CD44 .

I.3.6.1. CD133

CD133 (*Cluster of differentiation* 133), también conocido como Prominina-1, es una glicoproteína de superficie celular de 120 KDa con 5 dominios transmembrana, localizada en las prolongaciones celulares. Fue descrita originalmente como un marcador de células madre y progenitoras hematopoyéticas, así como del neuroepitelio murino (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Weigmann *et al.*, 1997). Esta proteína sirve como marcadora de los precursores neurales humanos normales (Uchida *et al.*, 2000; Corbeil *et al.*, 1998; Tamaki *et al.*, 2002) y puede utilizarse para el enriquecimiento de células tumorales similares a célula madre a partir de tumores cerebrales (Singh *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2003), siendo el marcador de superficie

celular más estudiado para BTSCs (Figura I.10). Más recientemente se ha demostrado que también está presente en las células madre neurales embrionarias humanas normales, así como células adultas endimarias, células precursoras endoteliales funcionales y CSCs (del inglés, *cancer stem cells*) de los tumores de colon (Uchida *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2007; Peichev *et al.*, 2000; Pfenninger *et al.*, 2007).

Se han detectado y aislado BTSCs positivas para CD133, mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo, a partir de los tumores GBM, MB y endimoma, y se ha demostrado que estas células generan tumores agresivos en el cerebro murino tras la inoculación de un bajo número (Singh *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005; Hemmati *et al.*, 2003). En pacientes con GBM, el porcentaje de células que expresan CD133 se relaciona con la supervivencia del paciente y el riesgo de recaída tumoral (Zeppernick *et al.*, 2008).

La utilidad de CD133 en el aislamiento de células con propiedades de BTSC ha sido confirmada por múltiples grupos de investigación (Bao *et al.*, 2006a; Piccirillo *et al.*, 2006; Calabrese *et al.*, 2007). Sin embargo, no está totalmente aclarado si el marcador CD133 identifica las BTSCs o si, por el contrario, marca un subconjunto de células con mayor habilidad para evadir al sistema inmune residual en cepas de ratones parcialmente inmunodeficientes como la cepa *nu/nu* (Quintana *et al.*, 2008). La subpoblación de células CD133⁻ aislada a partir de los tumores de GBM primarios puede a su vez formar tumores ortotópicos, pero es menos eficaz en la iniciación del tumor (Beier *et al.*, 2007; Sakariassen *et al.*, 2006). Este hecho podría deberse a la existencia de otros tipos de BTSCs carentes de CD133, o a que la expresión de CD133 en las BTSCs estuviera regulada dinámicamente y se viera afectada por diferentes parámetros, tales como el método de cultivo celular (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

Se conoce poco acerca de la regulación génica de CD133 y si juega un papel importante en el mantenimiento del fenotipo de célula madre.

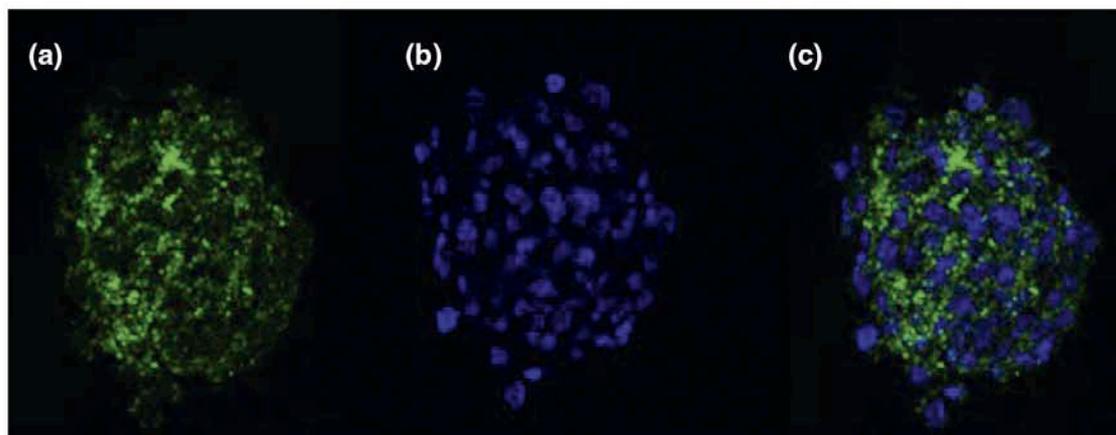


Figura I.10. Imagen confocal de una única neuroesfera derivada de un espécimen de tumor GBM humano fresco. a) Las células BTSCs se incubaron con un anticuerpo anti-CD133 marcado con fluorescencia verde, **b)** tinción nuclear azul con DAPI y **c)** supeposición de las dos imágenes anteriores (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.3.6.2. Nestina (NES)

La Nestina (NES) es una proteína de los filamentos intermedios que se expresa en las células indiferenciadas del cerebro durante el desarrollo de los mamíferos. Postnatalmente, su expresión se limita a la zona subventricular y el endotelio vascular. La proteína Nestina es un marcador reconocido de NSCs y BTSCs (Reynolds & Weiss, 1992; Dahlstrand *et al.*, 1992; Lendahl *et al.*, 1990). Todas las células progenitoras gliales (PGCs) de linaje restringido en el SNC y los astrocitos expresan Nestina. Se ha comprobado que la sobreexpresión de oncogenes bajo el control del promotor de Nestina produce tumores en el cerebro murino (Holland *et al.*, 2000). Con respecto a su regulación, la expresión de Nestina aumenta en respuesta a la activación de la ruta de señalización NOTCH en BTSCs (Fan *et al.*, 2006). Sin embargo, la expresión de Nestina es variable y no es específica de las BTSCs (Hadjipanayis & Van Meir, 2009). También se detecta en las poblaciones de células proliferativas e indiferenciadas de las

neoplasias tempranas inducidas por N-etil-N-nitrosourea (ENU) (Jang *et al.*, 2004) y se ha comprobado su expresión en tumores cerebrales pediátricos (Almqvist *et al.*, 2002), así como en cultivos derivados de tumores supratentoriales de neuroectodermo primitivo (sPNETs) (Fults *et al.*, 1992).

I.3.6.3. CD44

CD44 (*Cluster of differentiation 44*) es una molécula de adhesión celular, descrita originalmente como receptor del *homing* de linfocitos, que tiene dos isoformas con pesos moleculares de 80-90 Kda y 150 Kda respectivamente. La isoforma con bajo peso molecular media la unión al ácido hialurónico (HA), que está presente a una concentración relativamente alta dentro del SNC. CD44 se expresa en los astrocitos normales, reactivos y neoplásicos y se sobreexpresa en los tumores del SNC (Pilkington *et al.*, 1993; Rooprai *et al.*, 1999), mediando la adhesión celular e invasión en el glioma (Merzak *et al.*, 1994). La expresión positiva de CD44, junto con una baja expresión de CD24, se ha usado como herramienta en la identificación de células madre de cáncer mediante citometría de flujo (Al-Hajj & Clarke, 2004).

I.3.6.4. Vimentina (VIM)

La Vimentina (VIM) es una proteína de filamento intermedio (IF) de tipo III expresada por las células mesenquimales. Las proteínas IF se encuentran en todas las células de los metazoos (Eriksson *et al.*, 2009) así como en las bacterias (Cabeen & Jacobs-Wagner, 2010). Las proteínas IF componen el citoesqueleto, junto con los microtúbulos basados en tubulinas y los microfilamentos basados en actinas. Todas las proteínas IF se expresan de forma altamente regulada durante el desarrollo y la Vimentina es el componente principal del citoesqueleto de las células mesenquimales. Por esta razón, la Vimentina se usa habitualmente como marcador de células derivadas

del mesénquima o células en proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) durante el desarrollo normal y el proceso metastático. La Vimentina apoya la integridad estructural mecánica de las células quiescentes y participa en los procesos de adhesión, migración, supervivencia y señalización celular mediante un ensamblaje/desensamblaje dinámico en células activadas (Lahat *et al.*, 2010).

Se ha utilizado la Vimentina como marcador de tumores de tipo sarcoma, debido a su origen mesenquimal (Leader *et al.*, 1987). Con respecto a los tumores cerebrales, se ha descrito que la co-expresión de Nestina y Vimentina en ausencia de GFAP, sirve como marcador de un tipo celular del astrocitoma con una motilidad aumentada y mayor potencial invasivo (Rutka *et al.*, 1999).

I.3.6.5. CD15

Se ha demostrado que CD15 (*Cluster of differentiation 15*), conocido también como Lewis X (Lex) o antígeno-1 específico de estadio embrionario (SSEA-1), es un marcador de células de tipo B y C en la SVZ adulta, células precursoras granulares normales y células de MB (Capela & Temple, 2002; Read *et al.*, 2009).

I.3.6.6. A2B5

A2B5 es un antígeno de tipo gangliósido, se encuentra presente en una población de BTSCs negativas para CD133 que son capaces de propagar tumores (Ogden *et al.*, 2008). Sirve como marcador de todas las células precursoras de linaje glial restringido, tanto en animales en desarrollo como adultos.

I.3.7. Marcadores moleculares de células madre de tumor cerebral

Se han identificado diversos marcadores intracelulares en las BTSCs, incluyendo proteínas de unión a RNA, oncogenes, factores de transcripción, reguladores del ciclo celular y proteínas de rutas de señalización.

I.3.7.1. BMI1

B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog (BMI1) es un oncogén que se expresa en MB, GBM y otros astrocitomas (Tirabosco *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2004), así como en BTSCs (Hemmati *et al.*, 2003). BMI1 es un regulador importante de las células madre que induce la proliferación al incrementar la degradación de RB mediante la represión de p16^{INK4A} (Molofsky *et al.*, 2003). p16^{INK4A} es un inhibidor de los complejos ciclina/CDK, que se encargan de fosforilar RB, inhibiendo su actividad y permitiendo la progresión del ciclo celular. En ausencia de expresión de BMI1, P16^{INK4A} bloquea la progresión del ciclo celular, reduciendo la tasa de proliferación de las NSCs. Así, BMI1 ejerce un papel importante en el mantenimiento del estado de replicación competente de las NSCs fisiológicas.

I.3.7.2. SOX2

Sex determining region Y-box 2 (SOX2) es un factor de transcripción que se expresa en las NSCs y BTSCs (Hemmati *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2006a). Este gen tiene un papel en el mantenimiento del estado de progenitores neurales. La expresión constitutiva de Sox2 en NSCs de pollo inhibe la diferenciación neuronal y tiene como consecuencia el mantenimiento de las características de célula progenitora. Por el contrario, la inhibición de la señalización de Sox2 promueve la deslaminación de las

células progenitoras neurales de la SVZ y hace que salgan del ciclo celular, lo que se asocia a una pérdida de los marcadores de progenitor y el comienzo de expresión de marcadores de diferenciación neuronal temprana (Graham *et al.*, 2003).

I.3.7.3. MELK

Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) es un regulador del ciclo celular expresado por las NSCs, y de manera más intensa por BTSCs (Nakano *et al.*, 2008). La expresión de MELK es inversamente proporcional a la supervivencia en pacientes con GBM, y se ha descrito que MELK es un componente fundamental de un módulo transcripcional en el que varios genes que regulan la fase M son regulados conjuntamente (Nakano *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2006; Badouel *et al.*, 2006). El silenciamiento *in vitro* de MELK mediante un RNA de interferencia (siRNA) induce la apoptosis de las células de GBM *stem-like* (Nakano *et al.*, 2008). En cambio, el silenciamiento de MELK en precursores neurales de ratón induce la parada de proliferación sin provocar un aumento significativo de la apoptosis (Nakano *et al.*, 2005). Por estos motivos, es probable que MELK constituya un regulador importante de la supervivencia de las BTSCs pero no de la supervivencia de las NSCs, lo que sugiere que MELK podría ser una interesante diana terapéutica (Nakano *et al.*, 2011).

I.3.7.4. Proteínas de la ruta NOTCH

Las proteínas de la ruta NOTCH están implicadas en señalización celular y se expresan frecuentemente en las BTSCs. La mayoría de los gliomas humanos de diferentes grados expresan niveles de intermedios a altos de receptores NOTCH (NOTCH 1-4), sus ligandos (por ejemplo, proteínas *DELTA-like* y *JAGGED*) y sus genes diana *downstream*. Los receptores NOTCH se escinden y liberan el dominio intracelular de NOTCH (NICD), que se transloca al núcleo y se asocia a la proteína de

unión al DNA CSL, que de esta manera se transforma de represor transcripcional a activador. En líneas celulares de glioma, la sobreexpresión de NCID promueve la adquisición de una identidad *stem-like*. Así, la ruta NOTCH quizá podría utilizarse como diana terapéutica contra las BTSCs (revisado en (Stockhausen *et al.*, 2010)). Sin embargo, rara vez se encuentran mutaciones somáticas en esta ruta en las células madre de los gliomas, aunque los cambios en la expresión de sus componentes se asocian a los tumores de alto grado (revisado en (Li *et al.*, 2009d)), sugiriendo que los cambios epigenéticos en las rutas del desarrollo son impulsores clave en la progresión del GBM.

I.3.7.5. Mushashi-1

Mushashi-1 (Kaneko *et al.*, 2000) es una proteína neural de unión a RNA que se expresa en altos niveles en las NSCs tanto fetales como adultas del cerebro de los mamíferos, así como en PGCs y BTSCs (Hemmati *et al.*, 2003; Bao *et al.*, 2006a; Kaneko *et al.*, 2000; Okano *et al.*, 2005). Forma parte de la familia de proteínas de unión a RNA Mushashi, muy conservada durante la evolución, que se describió originalmente en *Drosophila* y contribuye a la autorrenovación de las células madre en combinación con la ruta de señalización NOTCH. Estudios de inmunotinción de Mushashi-1 sugieren que los tumores pediátricos humanos del SNC podrían derivar de la zona subventricular, que es la zona de generación de NSCs en la etapa postnatal (Uchida *et al.*, 2000).

I.3.8. Marcadores de diferenciación de células BTSCs

Para la mayoría de los casos de GBM, las neuroesferas indiferenciadas en el medio de proliferación contienen muchas células que expresan el marcador de progenitores neurales Nestina (Lendahl *et al.*, 1990), mientras que relativamente pocas

expresan el marcador neuronal β -III-tubulina y/o el marcador astrocítico GFAP. Estas características persisten incluso en cultivos a largo plazo (10-16 semanas). En condiciones de cultivo que promueven la diferenciación, la tasa de división celular baja dramáticamente en las neuroesferas, que dan lugar a numerosas células semejantes a las neuronas y astrocitos, con prolongaciones que se adhieren al frasco de cultivo (Hemmati *et al.*, 2003). Por técnicas inmunocitoquímicas se observa un aumento en la proporción de células que expresan β -III-tubulina y/o GFAP, entre otros marcadores. Muchos de los marcadores que se expresan en este proceso de diferenciación inducido *in vitro* también se encuentran en el proceso de diferenciación normal *in vivo* de las NSCs a los distintos tipos celulares del sistema nervioso (Figura I.11).

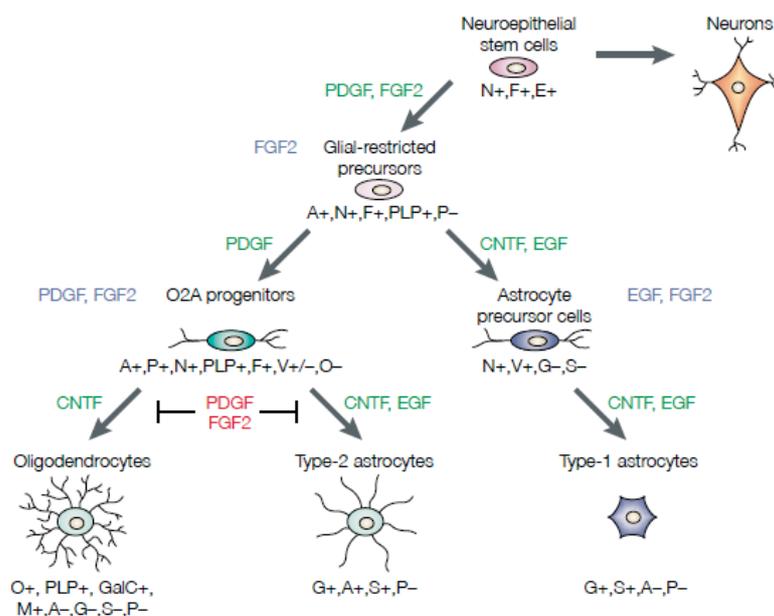


Figura I.11 Diferenciación celular en el SNC. Estadios de la diferenciación celular en el SNC definido por la expresión de marcadores específicos - desde célula madre a astrocito, neurona y oligodendrocito diferenciados. Los factores de crecimiento que promueven la progresión de un tipo celular a otro están presentados en color verde, aquellos que inhiben dicha progresión aparecen en rojo, y aquellos que inducen la proliferación y mantienen a las células en un estadio de desarrollo determinado están representados en azul. Los precursores restringidos a glía dan lugar a precursores restringidos a astrocitos y también a precursores O2A, que originan oligodendrocitos y astrocitos. La señalización del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) lleva a las células en estadios tempranos del desarrollo hacia el tipo celular de progenitor O2A y mantiene a estas células en una estado proliferativo.

La eliminación de PDGF y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2), y la estimulación con el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), lleva a estas células hacia la diferenciación astrocítica y oligodendrocítica. Los astrocitos tipo 1 y tipo 2 difieren en morfología y expresión de marcadores. A, A2B5, un antígeno de tipo gangliósido que aparece en los astrocitos tipo 2 y los progenitores gliales; E, receptor de EGF; F, receptor de FGF; G, GFAP; GalC, galactocerebrósido; M, proteína básica de la mielina, una proteína específica componente de la mielina; N, Nestina, un filamento intermedio expresado predominantemente por los progenitores del SNC; P, receptor de PDGF; PLP, proteína proteolípida de la mielina, un componente de la mielina limitado a oligodendrocitos y progenitores gliales; O, O4, un marcador de precursores oligodendrocíticos; S, S100, un marcador de astrocitos; V, vimentina (Holland, 2001).

I.3.8.1. Diferenciación astrocítica

I.3.8.1.1. GFAP

La proteína fibrilar ácida de la glía, también llamada de filamentos gliales o proteína gliofibrilar ácida (GFAP), es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular de ciertas células gliales como los astrocitos y células de Schwann. Descrita por primera vez en 1971, GFAP es una proteína de tipo III de los filamentos intermedios codificada por un gen que se encuentra, en humanos, en el cromosoma 17 (concretamente en 17q21) (Fuchs & Weber, 1994). La cantidad de GFAP que producen las células está regulada por numerosos mecanismos, tales como la presencia de citoquinas y hormonas. Durante el desarrollo, la Vimentina se localiza junto con GFAP en células gliales inmaduras, así como en líneas celulares de glioma, pero no en astrocitos maduros (Reeves *et al.*, 1989). Aunque todavía se desconocen ciertos aspectos de su función, se cree que GFAP proporciona soporte estructural y fuerza de tracción al citoesqueleto de los astrocitos normales. GFAP se utiliza como marcador fiable de astrocitos y tumores de origen glial en preparaciones neuropatológicas. De forma interesante, se ha demostrado que existe una pérdida progresiva de expresión de GFAP conforme aumenta el grado de los

astrocitomas (Duffy *et al.*, 1982; Duffy *et al.*, 1980; Deck *et al.*, 1978; Peraud *et al.*, 2003).

I.3.8.2. Diferenciación neuronal

I.3.8.2.1. MAP2

La proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2) es una proteína codificada por el gen *MAP2* en humanos (Neve *et al.*, 1986; Kalcheva *et al.*, 1995). Las proteínas de la familia de este gen están implicadas en el ensamblaje de microtúbulos, que es un proceso esencial en la neurogénesis. Los microtúbulos son túbulos huecos que participan en varios tipos de movimiento celular, en el tráfico de moléculas a través del citoplasma por medio de las ATPasas tipo dineína y quinesina, en la translocación de cromosomas durante la formación y el desensamblaje del huso mitótico y en el mantenimiento y cambio de la morfología celular en la interfase celular (Honore *et al.*, 2005; Walczak & Heald, 2008). MAP2 sirve para estabilizar el crecimiento de los microtúbulos al entrelazarlos con filamentos intermedios y otros microtúbulos. Los productos de los genes homólogos en rata y ratón son proteínas del citoesqueleto específicas de neuronas que están enriquecidas en las dendritas, lo cual sugiere su participación en la determinación y estabilización de la forma dendrítica durante el desarrollo neuronal (Maglott *et al.*, 2007). Asimismo, se ha descrito que MAP2 se expresa durante el desarrollo de las dendritas de las neuronas auditivas del tallo cerebral humano (Moore *et al.*, 1998).

I.3.8.2.2. III- β -Tubulina (TUBB3 / TuJ1)

La β -tubulina de clase III, también llamada TuJ1, se considera una molécula marcadora específica de neuronas (Katsetos *et al.*, 2003a). Es una proteína que forma

parte de los microtúbulos, que se componen de dos subunidades de proteínas estructurales, las tubulinas α y β , codificadas por diferentes genes (Lopata & Cleveland, 1987). Durante la formación de los microtúbulos las tubulinas α y β forman heterodímeros, que a su vez constituyen los bloques de construcción de los túbulos. En los humanos existen 7 isotipos de β -tubulina con diferente distribución tisular (Luduena, 1998). Estos isotipos difieren principalmente en el dominio variable del extremo carboxi-terminal, compuesto de 15 aminoácidos (Sullivan, 1988; McKean *et al.*, 2001). La β -tubulina de clase III está codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 16 en humanos (Katsetos *et al.*, 2003a). Se ha demostrado que la expresión de la β -tubulina de clase III es una herramienta útil para estudiar las fases tempranas de la diferenciación neuronal en el desarrollo embrionario humano (Easter *et al.*, 1993; Katsetos *et al.*, 1993; Katsetos *et al.*, 2003b; Kukharsky *et al.*, 2004). Además, se ha documentado que la β -tubulina de clase III es un componente de los husos mitóticos de los precursores neuronales (Memberg & Hall, 1995), aunque también se ha demostrado que forma parte del huso mitótico en células no neuronales (Jouhilahti *et al.*, 2008). La mayor expresión de *TUBB3* ocurre durante los períodos de orientación y maduración axonal, sus niveles disminuyen en el SNC adulto pero permanecen altos en el sistema nervioso periférico (Jiang & Oblinger, 1992). Así, las propiedades dinámicas únicas y el patrón de expresión espacio-temporal de *TUBB3* sugieren que podría tener una función específica en el desarrollo del sistema nervioso y el mantenimiento axonal.

Además de en neuronas, la β -tubulina de clase III se ha detectado en determinados tumores, como el de cáncer de mama y otros tumores epiteliales (Hasegawa *et al.*, 2003; Jirasek *et al.*, 2007). Algunos estudios han relacionado la expresión de la β -tubulina de clase III con altos grados histológicos en tumores no neuronales (Katsetos *et al.*, 2003a), y varios estudios han descrito a la β -tubulina de

clase III como un marcador de resistencia celular del cáncer a los taxanos (Hasegawa *et al.*, 2003; Ferlini *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

I.3.8.3. Diferenciación oligodendrocítica

Los oligodendrocitos se originan a partir de precursores mitóticos y migratorios, que pasan por un estadio de progenitores y maduran progresivamente hacia células post-mitóticas productoras de mielina (Figura I.12).

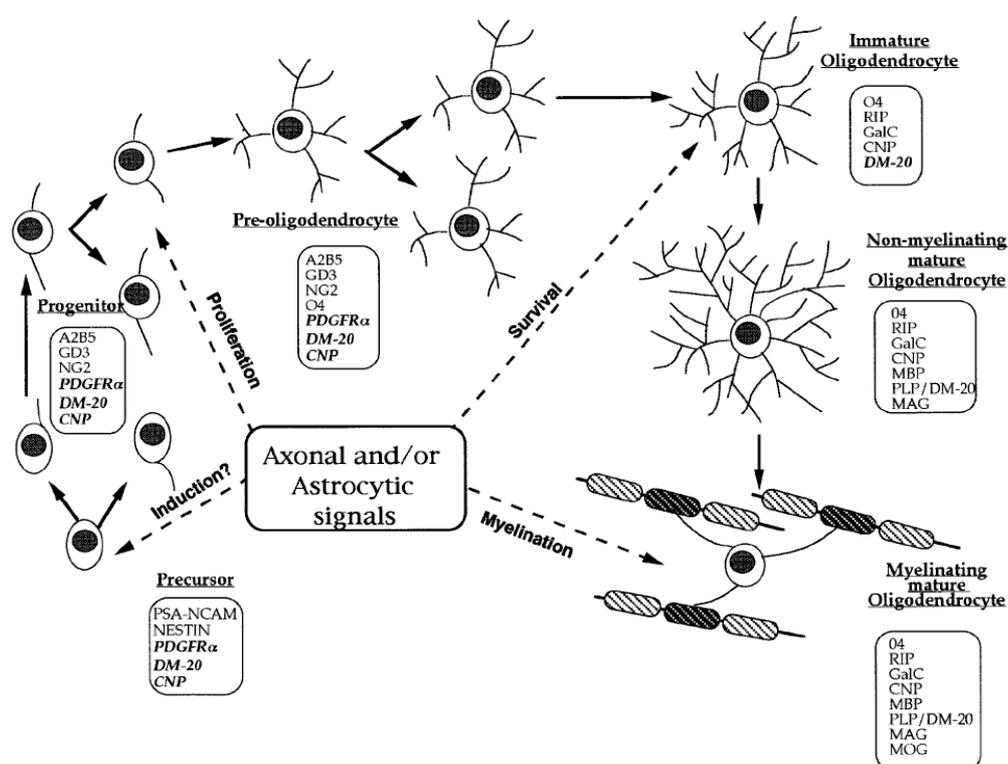


Figura I.12 Representación esquemática de los estadios del desarrollo de las células del linaje oligodendrocítico. Dibujo esquemático de la progresión morfológica y antigénica a partir de las células precursoras a los oligodendrocitos maduros mielinizantes, a través de progenitores, preoligodendrocitos, y oligodendrocitos inmaduros no mielinizantes. Se indica la cronología de la señalización neuronal y astrocítica. Los marcadores específicos aparecen encuadrados. Los RNAs aparecen en cursiva (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

I.3.8.3.1. Galactocerebrosidasa (GALC)

La enzima lisosomal galactocerebrosidasa (GALC) es responsable de la hidrólisis de numerosos esfingolípidos monohexósidos, incluyendo el galactosilcerebrósido o galactosilceramida (GalCer) y la galactosilesfingosina (psicosina), entre otros (Luzi *et al.*, 1995; Wenger *et al.*, 1997). GalCer es un glicolípido cerebrósido anclado a la membrana celular, compuesto de ceramida y galactosa, y es el principal glicolípido de la mielina central y periférica en el sistema nervioso (Wenger *et al.*, 1997). GalCer se encuentra abundantemente en la mielina, especialmente durante el proceso de formación de la materia blanca (Chen *et al.*, 1993). Se ha demostrado que en cultivos de células progenitoras de linaje oligodendrocitario, después de 6 días de diferenciación, existe el doble de expresión de la enzima GALC en el estadio maduro de oligodendrocito respecto a la expresión inicial en las células indiferenciadas (Deng & Poretz, 2001).

I.3.8.3.2. O4

El anticuerpo monoclonal contra el antígeno de tipo sulfatida O4 (Sommer & Schachner, 1981) marca un estadio específico de preoligodendrocito en la maduración oligodendrocítica.

I.3.9. Posible origen de las BTSCs

Las NSCs pueden diferenciarse a progenitores gliales y neuronales. Los progenitores neuronales se diferencian hacia neuronas, mientras que los progenitores gliales están comprometidos hacia oligodendrocitos, células endimarias o astrocitos. Aunque tradicionalmente se ha asumido que el origen de los tumores del SNC ocurre a partir de la transformación de células diferenciadas, como neuronas, oligodendrocitos,

células endimarias y astrocitos, estos tumores también podrían originarse debido a la transformación de NSCs en BTSCs (Figura I.13). Los progenitores gliales podrían transformarse en células de cáncer cerebral similares a progenitores, que podrían generar tumores en el SNC (GBM, MB y endimoma) (Figura I.13). Por otro lado es probable que las células del estroma, bien del microambiente cerebral local o reclutadas de forma sistémica, puedan ser esenciales para el mantenimiento, la progresión y la recurrencia del tumor.

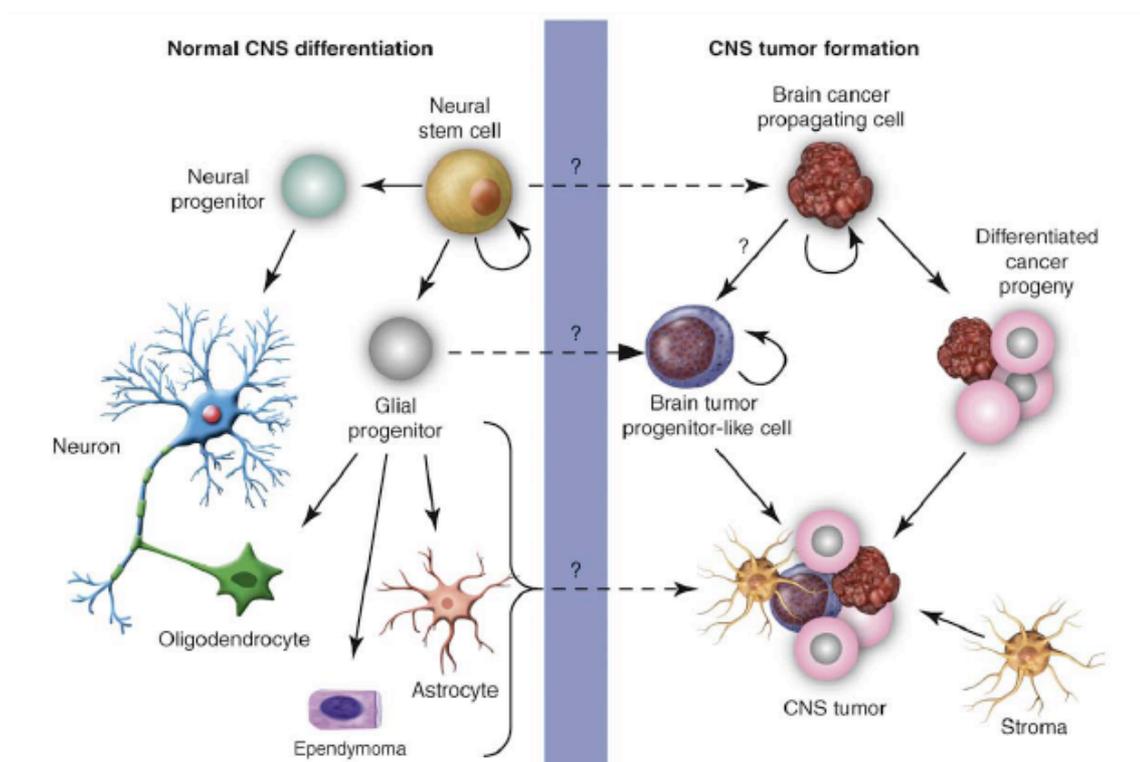


Figura I.13: Diferenciación normal en el SNC y posibles puntos de transformación tumoral (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.3.9.1. Rutas de señalización comunes implicadas en la génesis del GBM y en NSCs

Ha existido un debate muy prolongado acerca de si la célula de origen responsable de la formación del GBM proviene de la transformación de células madre

neurales (NSCs) o células progenitoras gliales (PGCs), o bien de la desdiferenciación de una célula glial madura en el cerebro (Alcantara Llaguno *et al.*, 2009; Emmenegger & Wechsler-Reya, 2008). Para comprobar la hipótesis de que las NSCs y PGCs del cerebro originan BTSCs, se han utilizado modelos de ratones transgénicos con alteraciones de rutas de señalización comunes en el GBM humano, tales como p53/mdm2/ARF, PTEN/PI3Kinasa y HIF/IDH1/2, en diversas combinaciones (Receptor EGF/ pérdida ARF, sobreexpresión PDGF, activación Akt/ Ras, deleciones NF1/p53 y deleciones PTEN/p53) (Tabla I.2), habiéndose demostrado que pueden llevar a la transformación tumoral en roedores (Holland *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2005; Stiles & Rowitch, 2008).

Tipo tumoral del SNC	Ruta(s) de señalización
GBM	Ras, Myc, receptor EGF, receptor PDGF, Akt, PI(3)-quinasa (pérdida de PTEN), SHH, TP53, OLIG2, Rb, MELK, NOTCH
MB	SHH, Wnt, MELK, NOTCH
Ependimoma	NOTCH

Tabla I.2 Rutas de señalización implicadas en los principales tipos tumorales del SNC (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

Estos modelos confirman que las NSCs y PGCs son capaces de iniciar el proceso tumorigénico si sufren determinadas alteraciones genéticas. Asimismo, los perfiles de expresión génica del GBM se asemejan a aquellos de las NSCs y PGCs del prosencéfalo en desarrollo (Phillips *et al.*, 2006). Por ejemplo, el factor de transcripción OLIG2, que es capaz de promover la proliferación de progenitores neurales mediante la represión del supresor tumoral P21, presenta efectos similares en células madre del GBM (Zhu *et al.*, 2005), y MELK, que regula la autorrenovación de las NSCs, también regula la proliferación de las BTSCs (Hemmati *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2008). Algunas de

estas rutas de señalización comunes a las NSCs y a células madre del GBM tienen implicaciones importantes para la potencial terapia de diferenciación (Lee *et al.*, 2006). Por ejemplo, el bloqueo de la ruta de señalización Sonic Hedgehog (SHH) elimina la población de BTSCs en el GBM tanto *in vitro* como *in vivo* (Bar *et al.*, 2007).

No existen tantas evidencias de la formación de gliomas a partir de células gliales diferenciadas maduras, quizá debido a que los astrocitos u oligodendrocitos diferenciados maduros son menos propensos a la transformación tumoral. Se postula que estas células sean intrínsecamente más resistentes a la carcinogénesis, y por ese motivo necesiten más pasos de transformación estocástica. La activación de dos rutas oncogénicas, tales como Ras y Akt conjuntamente con la inactivación de P53 y RB y la expresión de hTERT pueden llevar a la transformación de los astrocitos *in vivo* (Pieper, 2009).

I.3.9.2. Papel del nicho de las células madre de tumor cerebral

Las NSCs normales se concentran en regiones del cerebro que son ricas en vasos sanguíneos, llamadas "nichos vasculares", donde están protegidas de los estímulos apoptóticos y mantienen un equilibrio adecuado entre autorrenovación y diferenciación (Yang & Wechsler-Reya, 2007; Gilbertson & Rich, 2007). Las células endoteliales (ECs, por sus siglas en inglés) en el nicho vascular son las que secretan los factores paracrinos que pueden promover la supervivencia y autorrenovación de las células madre. Una característica interesante de los GBM es la alta vascularidad y la proliferación microvascular que presentan, de modo que pueden constituir un refugio para las NSCs y BTSCs que requieren factores paracrinos para su mantenimiento y supervivencia. De hecho, esto podría explicar las exuberantes proliferaciones microvasculares glomeruloides que se observan en el GBM, las cuales carecen de *lumen*

y riego sanguíneo. Se ha observado que las células BTSCs se encuentran estrechamente relacionadas con el nicho vascular en el GBM (Calabrese *et al.*, 2007) y las células tumorales CD133⁺ aisladas por citometría de flujo se asocian selectivamente en cocultivo junto a las ECs, hecho que aumenta su capacidad de autorrenovación. Las células tumorales CD133⁺ transplantadas intracranealmente en ratones forman tumores más rápidamente cuando son co-transplantadas con ECs, y estos tumores contienen más BTSCs CD133⁺. Las células BTSCs quizá puedan mantener recíprocamente el desarrollo vascular, ya que las células propagadoras de GBM CD133⁺ poseen un mayor nivel de producción de factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que las células CD133⁻ (Bao *et al.*, 2006b), lo cual es consistente con el hecho de que las células de GBM CD133⁺ formen tumores altamente vasculares y hemorrágicos *in vivo*.

I.4. Terapia del GBM

I.4.1. Opciones actuales de terapia del GBM

De la misma forma que han progresado nuestros conocimientos sobre la complejidad de la biología de los gliomas, también lo ha hecho la esperanza de que estos avances puedan llevarnos a terapias más efectivas, menos tóxicas y más racionales. Aunque los pilares del tratamiento no quirúrgico consisten actualmente en una combinación de radiación y quimioterapia citotóxica, las intensas investigaciones sobre los determinantes funcionales que promueven la tumorigénesis en el cerebro, que han llevado a descubrir su gran heterogeneidad celular y molecular, posibilitarán intervenciones más personalizadas y dirigidas molecularmente (Huse & Holland, 2010). De hecho, ya han comenzado los estudios para la estratificación de los pacientes con tumores cerebrales basándose en sus características moleculares. El descubrimiento de que la metilación del promotor y el silenciamiento transcripcional de la metiltransferasa

de DNA O-6-metilguanina (*MGMT*) tiene como consecuencia el aumento de la quimiosensibilidad de los GBM, ha generalizado su uso como indicador pronóstico de los gliomas malignos. Esta enzima repara el daño en la O-6-metilguanina del DNA inducido por agentes alquilantes como la temozolamida (TMZ, el tratamiento de quimioterapia anti-glioma por excelencia en la actualidad), y numerosos estudios buscan estrategias para superar este mecanismo de resistencia (Bleau *et al.*, 2009; Wick *et al.*, 2009). Es relevante también el reciente descubrimiento de que los GBM provocados por EGFR vIII podrían responder preferentemente al inhibidor de EGFR erlotinib cuando expresan PTEN (Mellinghoff *et al.*, 2005), creando de esta forma un subgrupo molecular más susceptible a esta terapia dirigida. Estos dos ejemplos reflejan un cambio de tendencia en las terapias contra el cáncer hacia un modelo en el cual los pacientes serán estratificados según sus características moleculares en grupos de tratamiento antes de iniciar terapias biológicas más dirigidas. El desafío actual consiste en descubrir los marcadores biológicos necesarios para separar de manera eficiente y eficaz los tumores en subgrupos relevantes para la terapia (Huse & Holland, 2010).

I.4.2. Las células madre de tumor cerebral como posible diana terapéutica

Los parámetros que caracterizan a los tumores cerebrales primarios (proliferación, apoptosis, invasión, angiogénesis, resistencia al sistema inmune, etc.) se definen a partir de la masa tumoral general o de líneas celulares en cultivo, lo cual, en vista de la hipótesis de la BTSCs, podría no representar de forma precisa la población de células propagadoras del tumor. Estos estudios han resultado útiles para la identificación de las rutas oncogénicas contra las que pueden dirigirse las terapias para tratar la masa global del tumor. Estudios actuales están determinando si las BTSCs

utilizan las mismas rutas, para validar el impacto de las terapias existentes sobre esta población celular y desarrollar nuevas terapias que puedan ser más eficientes al dirigirse contra las BTSCs y así eliminar la capacidad del tumor para regenerarse (Tabla I.3). Probablemente el tratamiento más efectivo para eliminar el tumor sería una combinación de terapias contra múltiples dianas (Figura I.6) (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

Tipo tumoral del SNC	Mecanismo
GBM	Aumento de la radiosensibilidad (p.e. inhibidores de Chk1 y Chk2)
GBM, MB y ependimoma	Bloqueo de las rutas de señalización (p.e. rutas de receptor EGF, AKT, PI(3)-quinasa, SHH y NOTCH)
GBM	Diferenciación (p.e. BMPs)
GBM	Vacunas de células dendríticas
GBM	Interrupción del nicho vascular (p.e. bevacizumab, AZD2171)

Tabla I.3 Dianas terapéuticas para eliminar las BTSCs en los principales tumores del SNC (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

Hasta el momento, las terapias convencionales, tales como la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, han demostrado una eficacia limitada para combatir los tumores cerebrales primarios, y existen evidencias recientes que sugieren que las BTSCs están implicadas en la radio-quimioresistencia (Rich, 2007; Liu *et al.*, 2006). Las células de glioma que expresan CD133 sobreviven a la radiación ionizante en proporciones mayores que la mayoría de las células tumorales, que carecen de CD133, tanto en condiciones *in vitro* como en experimentos *in vivo* en ratones *nu/nu*. Se ha descrito que estas células reparan el daño al DNA de forma más eficiente en respuesta a la radiación ionizante que la masa de células tumorales más diferenciadas, (Bao *et al.*, 2006a), y que la fosforilación preferente de las proteínas *Checkpoint* reparadoras de

DNA CHK1/2 puede ser la responsable de esta resistencia. En este sentido, la terapia dirigida contra CHK1 y CHK2 con moléculas pequeñas puede revertir la radioresistencia de las células madre de GBM CD133⁺ *in vitro*, proporcionando una terapia potencial contra las BTSCs (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

La progresión de los tumores cerebrales primarios podría asimismo ser una consecuencia de la quimioresistencia de las BTSCs. Se ha demostrado recientemente que las BTSCs de GBM son resistentes a la TMZ (Liu *et al.*, 2006). La elevada expresión de transportadores de membrana que expulsan los agentes quimioterápicos puede ser un importante mecanismo de quimioresistencia (Donnenberg & Donnenberg, 2005). Se ha demostrado que los genes transportadores ABC de fármacos *ABCG2* y *ABCA3*, se expresan a altos niveles en las células de SP y en líneas celulares de GBM (Hirschmann-Jax *et al.*, 2004).

Un problema para la aplicación de terapias dirigidas contra BSTCs es que estas terapias puedan afectar también a las células que se encargan de la renovación del SNC. Se ha descrito recientemente la vulnerabilidad de los PGCs del SNC a los agentes quimioterápicos y ha surgido la preocupación sobre su toxicidad a los linajes normales de células madre del SNC. Se han asociado concentraciones clínicas relevantes de BCNU (1, 3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea, llamada también carmustina), cisplatino o citarabina al aumento de la muerte celular y la disminución de la división celular en la SVZ del SNC, la circunvolución dentada del hipocampo y el cuerpo calloso (Dietrich *et al.*, 2006). Por tanto, dirigir la terapia contra las BTSCs sin provocar daños en las NSCs y sus progenitores es un desafío importante que necesita ser abordado en las nuevas propuestas terapéuticas (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.4.2.1. Inhibición de las rutas de señalización de las BTSCs

Se ha demostrado que las rutas de señalización (PI(3)-K, OLIG2, SHH, NOTCH y WNT) juegan un papel importante en el desarrollo y regulación de las NSCs, estando activas en las BTSCs de GBM, MB y ependimoma (Taylor *et al.*, 2005; Bar *et al.*, 2007; Eberhart, 2008) (ver I.3.9.1), por lo que pueden considerarse como dianas candidatas. El bloqueo de la ruta de SHH en los tumores cerebrales puede disminuir la formación de neuroesferas, eliminar las células CD133⁺, interferir en el crecimiento tumoral de los xenotransplantes y curar a los ratones con MB (Romer *et al.*, 2004). Asimismo, la inhibición de la ruta de señalización NOTCH mediante inhibidores de gamma secretasa (por ejemplo, GSI-18) puede interferir con la función de las BTSCs *in vitro* y la formación tumoral de xenotransplantes *in vivo* (Fan *et al.*, 2006). Además, el uso de inhibidores de AKT y terapias dirigidas contra la ruta de PI(3)-K inducen apoptosis e inhibición de la capacidad de invasión en las BSTCs (Eyler *et al.*, 2008). Por último, la inhibición de la ruta de señalización PDGF puede inhibir el crecimiento de las neuroesferas de BTSCs en cultivo (Gal *et al.*, 2008) (Tabla I.1).

I.4.2.2. Diferenciación de BTSCs

La promoción de la diferenciación de las BTSCs podría resultar en un nuevo mecanismo terapéutico contra las BTSCs y los tumores cerebrales primarios. La inducción de diferenciación mediante las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs), específicamente BMP4, puede desencadenar una reducción significativa de las BTSCs de GBM *in vitro* y alarga la supervivencia de los ratones xenotransplantados disminuyendo el crecimiento tumoral (Piccirillo *et al.*, 2006). Cabe destacar que un pequeño grupo de animales no respondió al tratamiento con BMP y murió tres meses

después del tratamiento. En los animales que respondieron a la terapia, no pudieron recuperarse células CD133⁺ a partir de los tumores de los xenotransplantes.

Existen evidencias que confirman que las BMPs provocan la diferenciación glial de las BTSCs del GBM (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, en algunos casos las BMPs pueden causar proliferación de las BTSCs y tumorigénesis, paradójicamente. En estas células, las BMPs no inducían la diferenciación glial dependiente de STAT3 debido al silenciamiento epigenético de *BMP1RB* mediante un mecanismo dependiente de EZH2. De hecho, un número significativo (20%) de muestras tumorales de GBMs mostraron niveles bajos del receptor B de BMP1 (BMP1RB), y la mayoría de estas muestras presentaban hipermetilación del promotor del gen *BMP1RB*. Los mecanismos de resistencia epigenética a la terapia de diferenciación sugieren que en pacientes con silenciamiento de *BMP1RB* sería recomendable la combinación terapéutica de BMPs con reguladores epigenéticos (Hadjipanayis & Van Meir, 2009).

I.4.2.3. Eliminación del soporte del nicho vascular

Se ha demostrado que el nicho vascular es importante para proporcionar un entorno nutritivo a las BTSCs, sugiriendo que su eliminación podría ser terapéutica (Yang & Wechsler-Reya, 2007; Gilbertson & Rich, 2007). La inhibición del crecimiento de vasos sanguíneos podría suponer un método efectivo para eliminar las BTSCs de GBM. El tratamiento de las células BTSCs de GBM CD133⁺ con el anticuerpo anti-VEGF Bevacizumab puede bloquear su capacidad de inducir la migración de las EC y la formación de vasos en cultivo, y su capacidad para iniciar la formación tumoral *in vivo*. El tratamiento de ratones xenotransplantados que presentan GBM con bevacizumab puede conducir a una gran reducción del número de BTSCs de GBM y del crecimiento tumoral (Calabrese *et al.*, 2007). Es de resaltar que los ensayos

clínicos con bevacizumab y el inhibidor del receptor tirosin-quinasa pan-VEGF cediranib (AZD2171) han demostrado su eficacia en pacientes con GBM (Vredenburgh *et al.*, 2007; Batchelor *et al.*, 2007).

I.5. MicroRNAs

I.5.1. Descubrimiento y características de los microRNAs

El descubrimiento de los microRNAs (miRNAs) se produjo en 1993 durante la caracterización de los genes que controlaban la coordinación del desarrollo larvario en el gusano *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Se hallaron dos pequeños RNAs regulatorios, denominados *lin-4* y *let-7* (Lee *et al.*, 1993; Reinhart *et al.*, 2000) no codificantes para ninguna proteína pero con un papel clave en el desarrollo. Posteriormente se encontraron homólogos de *let-7* en otros animales, incluidos los mamíferos, con patrones de expresión similares a los observados en *C. elegans*, lo que sugería que *let-7* y quizás otros pequeños RNAs similares podrían estar desempeñando papeles ortólogos en metazoos (Pasquinelli *et al.*, 2000). Más adelante, se observó que *lin-4* y *let-7* representan a una clase extendida de RNAs endógenos pequeños presentes en gusanos, moscas y mamíferos que se denominaron microRNAs (miRNAs) (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001). Desde entonces, se han encontrado miRNAs en plantas, algas verdes, virus, y animales (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011).

Los miRNAs se caracterizan por ser genes de pequeño tamaño, aproximadamente 23 nucleótidos, que no codifican para ninguna proteína. Estos genes no codificantes juegan un papel importante en la regulación de la expresión de muchas proteínas al emparejarse con sus RNA mensajeros (mRNA) correspondientes e inducir

su represión post-transcripcional (Bartel, 2009). Para ello, los miRNAs se asocian con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y lo reclutan a sus sitios de emparejamiento correspondientes. El reconocimiento de los miRNAs de estos sitios diana en el mRNA, que suelen estar localizados en la región 3' no traducida (3'-UTR), está mediado principalmente por el emparejamiento de bases entre una secuencia de 2 a 8 nucleótidos en el miRNA, que se denomina secuencia semilla (*seed*), y la secuencia complementaria del mRNA (revisado en (Bartel, 2009)). Las redes de regulación génica mediadas por miRNA son extremadamente complejas debido a que un único mRNA puede estar regulado simultáneamente por múltiples miRNAs y un solo miRNA puede regular distintos mRNAs, a veces de proteínas implicadas en la misma vía de señalización. Estas redes de regulación tienen papeles claves en el desarrollo, la diferenciación y el cáncer, entre otros procesos. A lo largo de la última década se ha invertido mucho esfuerzo para descifrar la expresión y función de los miRNAs en el desarrollo animal, incluyendo la diferenciación y el mantenimiento de las células madre (revisado en (Bartel, 2009; Ambros, 2004)).

I.5.2. Biogénesis de miRNAs y su regulación

Los miRNAs suelen ser transcritos por la RNA polimerasa II como un transcrito primario largo de varios cientos de nucleótidos (pri-miRNA) (Cai *et al.*, 2004). Este proceso está regulado por factores de transcripción y diversos mecanismos epigenéticos, por lo que existe una compleja red de regulación transcripcional que controla la expresión de miRNAs y es capaz de conferir patrones de expresión de miRNAs específicos de célula y tejido. En células madre embrionarias, existen reguladores transcripcionales clave tales como OCT4, SOX2, NANOG y TCF3 que ocupan promotores de genes miRNA tanto activos como inactivos, para activar o reprimir su

expresión, respectivamente (Marson *et al.*, 2008). Conjuntamente a la regulación transcripcional, la regulación post-transcripcional también tiene relevancia en la producción de miRNAs. Durante la formación de los transcritos primarios, las secuencias flanqueantes del miRNA se pliegan en una estructura de horquilla de unos 70 nucleótidos, que es procesada secuencialmente, primero por DROSHA con la colaboración de la proteína DGCR8 en el núcleo para dar lugar a un pre-miRNA, y seguidamente por DICER en el citoplasma para dar lugar al miRNA maduro. Después del procesamiento de DICER, el miRNA maduro se embebe directamente con las proteínas Argonauta para formar el complejo RISC (Figura I.14) (Kim *et al.*, 2009a; Krol *et al.*, 2010).

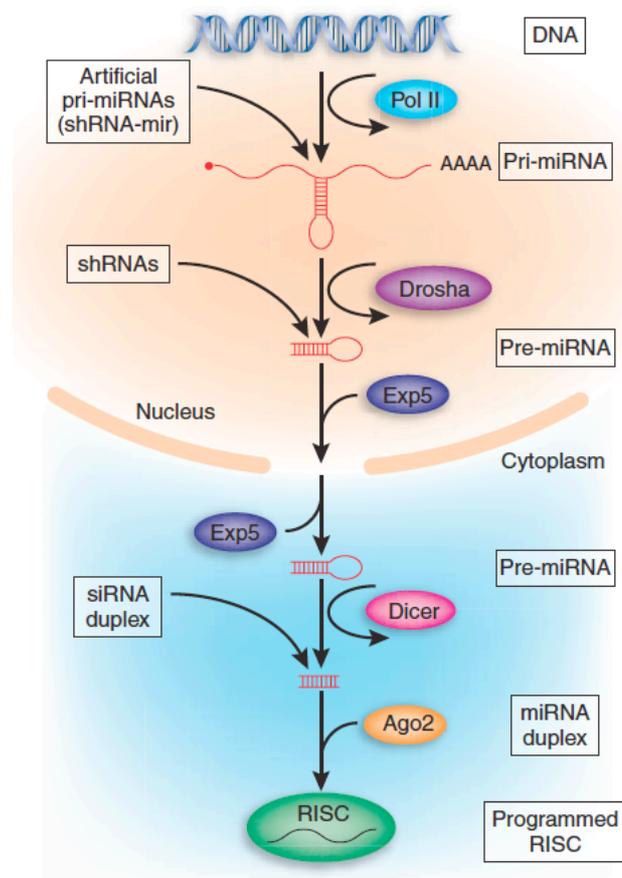


Figura I.14 Ruta de biogénesis de los miRNAs en las células de los vertebrados. Los siRNAs artificiales pueden entrar en esta vía como un dúplex de siRNA sintético, como shRNAs transcritos por Pol III o como pri-miRNAs artificiales (shRNA-mir). No se incluyen todos los factores implicados en la

biogénesis de los miRNAs para mayor facilidad visual. Ago2, Argonauta-2; Exp5, Exportina-5 (Cullen, 2005).

Una vez incorporados al RISC, los miRNAs emparejan con los mRNAs para dirigir su represión post-transcripcional. En regiones con alta complementariedad de bases, los miRNAs pueden dirigir el corte de mRNAs catalizado por Argonauta (Hutvagner & Zamore, 2002; Song *et al.*, 2004; Yekta *et al.*, 2004), pero lo más habitual es que induzcan la represión de la traducción, la desestabilización de los mRNAs, o una combinación de ambas (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993; Lim *et al.*, 2005).

En humanos se han identificado alrededor de 1000 miRNAs distintos (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011) y se cree que podrían regular la expresión de alrededor del 30% de los genes codificantes humanos.

I.5.3. miRNAs en el GBM

Muchos miRNAs de mamíferos son específicos de tejido y se expresan de forma regulada temporalmente durante el desarrollo. Se ha descrito que los miRNAs son reguladores importantes de procesos de desarrollo, como la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis, procesos frecuentemente alterados en tumores. Consecuentemente, se ha demostrado que los miRNAs están desregulados en una amplia variedad de cánceres, incluyendo los tumores cerebrales como el GBM, y las alteraciones de su expresión se han asociado con el inicio y la progresión tumoral (Lu *et al.*, 2005). La expresión de algunos miRNAs está inhibida en tumores (actuando como genes supresores tumorales) mientras que otros se encuentran sobreexpresados (actuando como oncogenes, también llamados onco-miRs) (Hammond, 2006).

I.5.3.1. Estudios de perfiles de expresión de miRNAs en GBM

Dado que la alteración de la expresión de los miRNAs parece ser una característica general del cáncer, varios estudios han investigado si los miRNAs están diferencialmente expresados en los tumores del SNC. Aunque algunos estudios han elegido las técnicas de *Northern blot*, clonado directo, y RT-qPCR para analizar los patrones de expresión de miRNAs, la mayoría de los estudios en gliomas se han llevado a cabo utilizando microarrays de expresión. Aproximadamente el 30% de los miRNAs evaluados se hallan desregulados en dos o más estudios independientes (por ejemplo, el miR-9/9*, miR-21, miR-124, miR-128 y miR-137). Estos perfiles podrían ser útiles en la determinación de firmas específicas de miRNAs para clasificar los tumores cerebrales y para definir algunos miRNAs como biomarcadores pronóstico y evolución clínica (revisado en (Barbarotto *et al.*, 2008; Calin, 2009)). Además, las firmas de miRNAs podrían ser útiles para comprender el origen de los tumores. A este respecto, los perfiles de expresión de miRNAs obtenidos recientemente por la asociación TCGA han permitido la identificación de 5 subgrupos de GBM que refinan clasificaciones previas y presentan perfiles de expresión de miRNAs similares a los de precursores neurales en diferentes estadios de diferenciación. De acuerdo con esta clasificación novel, los subgrupos de GBM se correlacionan con las firmas de precursores multipotentes / de glía radial, precursores oligodendrogiales, precursores neuronales, precursores neuroepiteliales / de cresta neural o precursores astrocíticos. Este descubrimiento apunta a las posibles células de origen de los tumores cerebrales y revela una gran heterogeneidad dentro de las clasificaciones previas, que se basaban exclusivamente en alteraciones genéticas o perfiles de mRNA, poniendo de relieve el enorme potencial del análisis de la expresión y función de los miRNAs en el GBM (Kim *et al.*, 2011).

I.5.3.2. Regulación mediante miRNAs de las rutas genéticas clásicas alteradas en GBM

Aunque los distintos perfiles de expresión de miRNAs observados en glioma subrayan la importancia de los miRNAs en la patogénesis del GBM, son escasos los estudios funcionales dirigidos a entender su papel en la gliomagénesis. Hasta el momento se han llevado a cabo algunos análisis funcionales, sobre todo *in vitro*, mediante la manipulación de los niveles de miRNAs utilizando precursores sintéticos de miRNAs u oligonucleótidos modificados que antagonizan a los miRNAs (antagomiRs). Sin embargo, existe poca información sobre su papel *in vivo*. Algunos miRNAs relacionados con el GBM pueden situarse en el esquema de las alteraciones genéticas implicadas en la gliomagénesis de acuerdo con sus dianas predichas y / o validadas (Figura I.15).

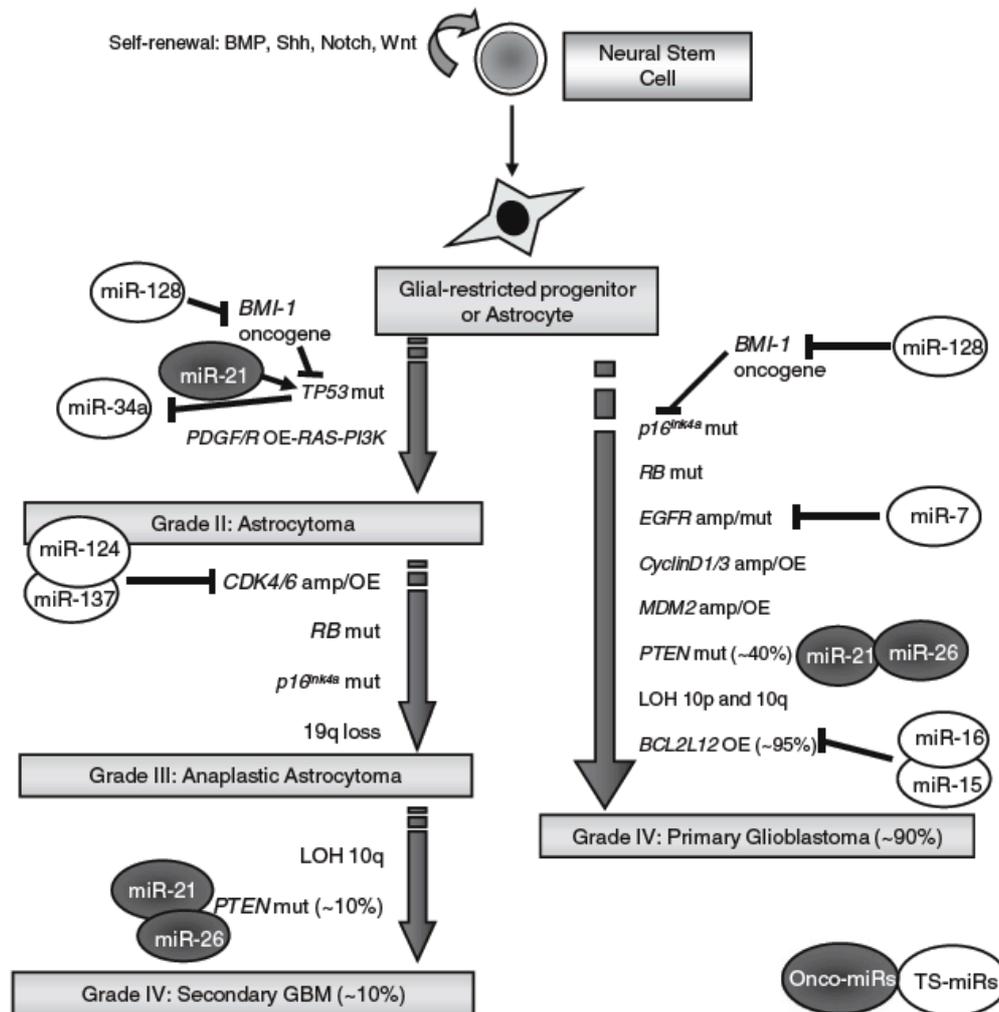


Figura I.15 MicroRNAs que regulan genes alterados en GBM primario y secundario. Los onco-miRs participan en la inhibición de genes supresores tumorales junto con otros mecanismos conocidos, tales como la pérdida de heterocigosidad (LOH), mutaciones o metilación de promotores. Los miRNAs "supresores tumorales" (TS-miRs) inhiben oncogenes en condiciones sanas y serían inactivados en el GBM, permitiendo la expresión patológica de los oncogenes diana. *Amp*, amplificación. *Mut*, mutación, *OE*, sobreexpresión (Gonzalez-Gomez *et al.*, 2011).

I.5.3.2.1. miRNAs sobreexpresados en GBM

Es evidente que los miRNAs actúan como reguladores a diferentes niveles en la gliomagénesis. Regulan la proliferación (miR-7, miR-124, miR-128, miR-137, miR-221), la apoptosis (miR-7 y miR-21), la angiogénesis (miR-296), la invasión tumoral (miR-7 y miR-21) y la resistencia a la quimio y radioterapia (miR-21, miR-181a). Entre las dianas de varios miRNAs sobreexpresados en GBM (onco-miRs putativos), se

encuentran de genes que sufren pérdida de función en GBM, lo que sugiere que estos miRNAs contribuyen a la represión de ciertas rutas de señalización. Por ejemplo, los genes *PTEN* y *TP53* se encuentran mutados o silenciados epigenéticamente de forma habitual en GBM y miR-21 y miR-26, que se encuentran sobreexpresados en GBM, se dirigen contra el mRNA de estos genes, reforzando el silenciamiento funcional.

I.5.3.2.1.1. miR-21

MiR-21 es uno de los miRNAs con mayor sobreexpresión en tejido de glioma respecto a tejido normal, lo cual sugiere un posible papel oncogénico. Además, la alta expresión de este miRNA se asocia con una menor supervivencia de los pacientes con GBM (Zhi *et al.*, 2010). De acuerdo con la reciente clasificación de GBM basada en la expresión de miRNAs, la sobreexpresión de miR-21 se correlacionaría preferentemente con la firma astrocitaria (Kim *et al.*, 2011). La mayoría de los resultados sugieren que miR-21 actúa como un oncogén que regula múltiples parámetros de malignidad en el GBM, ya que la inhibición de miR-21 aumenta la apoptosis, disminuye el crecimiento e invasión y podría reducir la quimiorresistencia. Se ha demostrado que la inhibición de miR-21 (por *locked nucleic acid* (LNA) o 2-O-Me-miR-21 antagomirs) en líneas celulares de glioma induce un aumento de la apoptosis dependiente de caspasa 3 y caspasa 9 (Chan *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2010). Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2008) describieron que la inhibición de miR-21 en varias líneas celulares de GBM aumenta los niveles endógenos de PDCD4 (muerte celular programada 4, del inglés, *programmed cell death 4*) y promueve así también la apoptosis dependiente de PDCD4. El silenciamiento de miR-21 también inhibe la progresión del ciclo celular en GBM, mediante la disminución de la señalización EGFR (Zhou *et al.*, 2010), posiblemente a través de la inhibición de STAT3 (Ren *et al.*, 2010b). Utilizando el análisis de rutas a partir de las dianas de miR-21 obtenidas por predicción bioinformática

(Papagiannakopoulos *et al.*, 2008), Papagiannakopoulos *et al.* identificaron que algunos genes regulados por miR-21 participaban en tres de las rutas supresoras tumorales clave implicadas en GBM: P53, TGF- β y la apoptosis mitocondrial. MiR-21 también contribuye a la invasividad de las células de glioma al dirigirse contra inhibidores de metaloproteasas de matriz como TIMP3 y RECK (Gabriely *et al.*, 2008) o al interrumpir el circuito de retroalimentación negativo de la ruta RAS/MAPK mediante SPRY2 (Kwak *et al.*, 2011). Conjuntamente, estos datos apoyan el importante papel que ejerce miR-21 en la patogénesis del GBM y sugieren su posible valor como diana terapéutica. Corsten *et al.* (Corsten *et al.*, 2007) revelaron que la delección de miR-21 en un modelo de ratón *in vivo* de glioma interrumpía el crecimiento tumoral y mostraba una citotoxicidad sinérgica con S-TRAIL en los gliomas humanos. Ren *et al.* (Ren *et al.*, 2010b; Ren *et al.*, 2010a) hallaron un aumento de la actividad del 5-fluorouracilo (5-FU) combinado con oligonucleótidos antisentido anti-miR-21. En un estudio similar, el mismo grupo observó que un inhibidor de miR-21 aumenta la quimiosensibilidad de las células tumorales al taxol. De forma similar, la inhibición de miR-21 en la línea celular U373 aumentó la citotoxicidad de otro agente quimioterápico, VM-26 (Li *et al.*, 2009c), quizá a través de la regulación de una nueva diana de miR-21, LRRFIP1, un inhibidor de la ruta de NF-KB. También se ha propuesto la implicación de miR-21 en la quimioresistencia adquirida a la TMZ, ya que la sobreexpresión de miR-21 protege la línea celular U87 de la TMZ mediante la disminución del cociente BAX/BCL-2 y la actividad Caspasa-3 (Shi *et al.*, 2010a).

I.5.3.2.1.2. miR-221/222

Los miRNAs miR-221 y miR-222 forman un *cluster* y se hallan sobreexpresados en GBM. MiR-221 presenta elevada expresión génica únicamente en astrocitomas de

alto grado (grados III y IV de la OMS) (Conti *et al.*, 2009). La función de miR-221 y miR-222 se ha explorado de forma conjunta, ya que su expresión está co-regulada y tienen la mismas dianas. Se ha descrito que los miR-221/222 reprimen la expresión del regulador de ciclo celular P27_{kip1} (Gillies & Lorimer, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2008). Esta proteína es un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (por sus siglas en inglés, CDK) y provoca la parada del ciclo celular en la fase G1 (le Sage *et al.*, 2007). Le Sage *et al.* (le Sage *et al.*, 2007) descubrieron que las células de glioma U87 requerían una alta actividad de estos dos microRNAs para mantener los niveles bajos de P27_{kip1} y para permanecer en un estado proliferativo. Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2010) realizaron un análisis bioinformático y describieron que 16 posibles genes diana de miR-221/222 podrían regular coordinadamente la ruta de AKT. Además observaron que la sobreexpresión de miR-221 y miR-222 aumentaba la proliferación celular y la invasión *in vitro* del glioma, e inducía el crecimiento tumoral en un modelo murino de xenotransplante. De forma relevante, estos efectos se correlacionan con el aumento de fosforilación de AKT, que indica la activación de esta vía (Zhang *et al.*, 2010).

I.5.3.2.1.3. miR-26

Huse *et al.* (Huse *et al.*, 2009) describieron que miR-26a es un regulador de la expresión de PTEN. La fosfatasa PTEN es un antagonista molecular de la ruta de AKT y tiene un papel central en la biología del glioma. Se han hallado mutaciones en el gen PTEN en un 40% de GBM primarios y un 10% de GBM secundarios. MiR-26 presenta frecuentemente amplificación genómica y sobreexpresión en GBM.

I.5.3.2.2. miRNAs infra-expresados en GBM

Los miRNAs miR-7, miR-128, miR-124, miR-137 y miR-181 presentan expresión génica disminuida en GBM (Gonzalez-Gomez *et al.*, 2011). Entre las dianas de estos miRNAs, que actuarían como supresores tumorales, se encuentran genes diana que están amplificados genómicamente, o sufren ganancia de función en GBM. Este es el caso de miR-7 y su gen diana, EGFR, que es un receptor comúnmente alterado en el GBM. El resto de estos miRNAs tienen papeles más importantes en la proliferación y diferenciación de las BTSCs de GBM (GBM-BTSCs) que en las vías clásicas de gliomagénesis.

I.5.3.3. Papel de los miRNAs en la proliferación y diferenciación de GBM-BTSCs

El paralelismo existente entre las células BTSCs y las NSCs sugiere que podrían compartir redes de regulación moduladas por miRNAs. Se ha descrito que las NSCs, así como otros tipos de células madre, expresan ciertos miRNAs que están implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado y la autorrenovación. Algunos de estos miRNAs podrían ejercer un papel similar en la regulación de las propiedades *stem-like* de las BTSCs (Figura I.16).

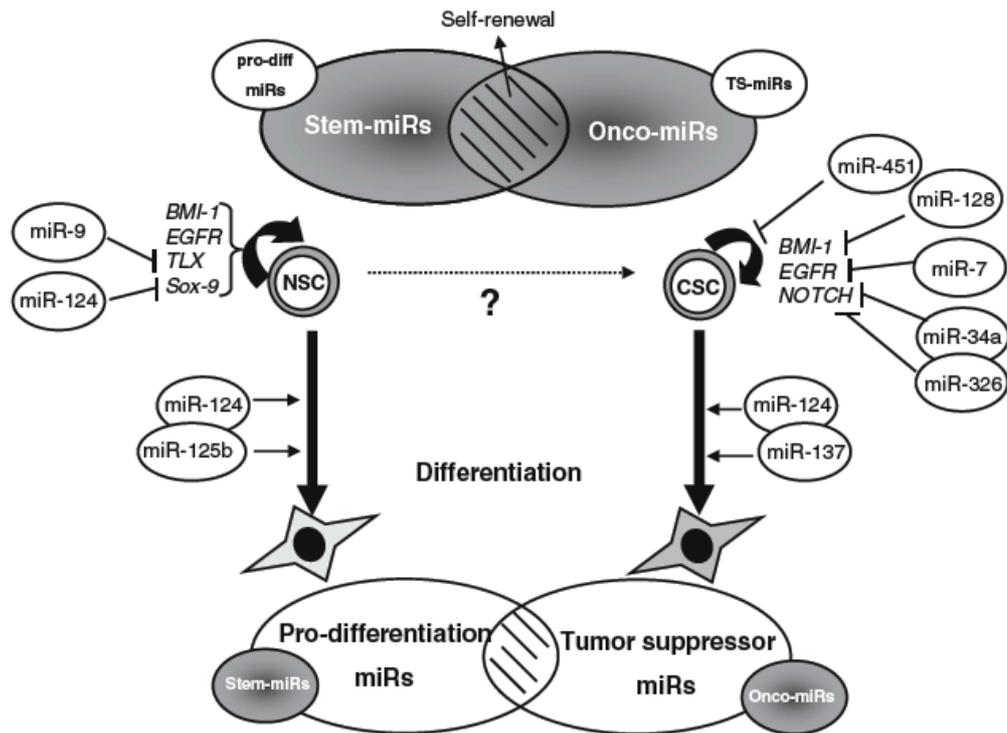


Figura I.16 Regulación de las GBM-BTSCs y NSCs mediante miRNAs. Debido a que comparten un estado indiferenciado multipotente y la capacidad de autorrenovación, se ha sugerido que las NSCs y las BTSCs comparten redes de regulación comunes. De esta forma, se postula que debe haber un conjunto de miRNAs expresados en ambos tipos celulares. La diferenciación estaría caracterizada por una firma de miRNAs concreta que reflejaría la inhibición de *Stem-miRNAs* y *Onco-miRs* y la sobre-expresión de miRNAs de pro-diferenciación y miRNAs supresores tumorales (Gonzalez-Gomez *et al.*, 2011).

Como se muestra en la figura I.16 este modelo predeciría una disminución de la expresión de onco-miRs y un aumento de la expresión de los miRNAs supresores tumorales en la diferenciación. Chen *et al.* describieron que las células madre presentan un perfil de miRNA menos complejo que los tejidos maduros, sugiriendo que el grado de diferenciación celular puede caracterizarse por un firma concreta de miRNAs (Chen *et al.*, 2007; Houbaviy *et al.*, 2003; Suh *et al.*, 2004). En mamíferos, varios miRNAs como miR-124, miR-125 y miR-137 están enriquecidos específicamente en el SNC, y los cambios en sus patrones de expresión durante el desarrollo del SNC sugieren que ejercen un papel en la diferenciación neural (Krichevsky *et al.*, 2003; Miska *et al.*, 2004). Los cambios más significativos en la expresión de miRNAs ocurren en la

transición de célula madre/precursor neural a neuronas diferenciadas. Algunos miRNAs como miR-124, miR-9, miR-125 y miR-22 están ausentes en las células indiferenciadas, pero su expresión se induce notablemente conforme avanza la diferenciación. Con respecto al GBM, un estudio halló 71 miRNAs con un patrón de expresión diferente en glioma respecto al cerebro normal, siendo dicho patrón de miRNAs similar al perfil de expresión observado en células madre embrionarias y precursores neurales (Lavon *et al.*, 2010). Alrededor de la mitad de ellos estaban agrupados en *clusters* en 7 regiones genómicas: miR-17/92, miR-106b/25, miR-106a/363, miR-183/96/182, miR-367/302, miR-371/373 y la región Dlk1-Dio3 (Lavon *et al.*, 2010). Algunos miembros de estos *clusters* están enriquecidos en la subclase de precursores oligoneurales de GBM definida por Kim *et al.* (Kim *et al.*, 2011).

I.5.3.3.1. Cluster miR-17/92

En diferentes tumores, el oncogen *MYC*, el cual presenta amplificación genómica en la subclase de precursores oligoneurales de GBM, induce la expresión del *cluster* oncogénico miR-17/92 (Kim *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que miR-17/92 podría funcionar como un componente del programa oncogénico de MYC en GBM. Los miRNAs incluidos en este *cluster* tienen efectos que promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis. Entre sus dianas validadas podemos encontrar a PTEN, E2F1 y BIM (Malumbres & Lossos, 2010).

I.5.3.3.2. miR-124

MiR-124 parece tener un papel en la inhibición post-transcripcional de ciertos genes *progenitor-like* como *LAMININ*, *GAMMA 1 (LAMC1)* e *INTEGRIN, BETA 1 (ITGB1)* en las neuronas murinas (Cao *et al.*, 2007). Además, miR-124 podría promover la transición hacia la diferenciación neuronal dirigiéndose contra PTBP1, una proteína implicada en los patrones de *splicing* alternativo relacionados con el desarrollo neuronal (Makeyev *et al.*, 2007). La capacidad de inhibir a Sox-9 en las NSCs adultas de la SVZ de ratón, también apoya el papel de miR-124 en la diferenciación de precursores en división hacia neuronas (Cheng *et al.*, 2009). Notablemente, miR-124 es uno de los miRNAs más abundantes en el cerebro adulto, representando más del 25% del contenido de miRNAs total del cerebro (Lagos-Quintana *et al.*, 2002). Su expresión disminuida en gliomas de alto grado así como en MB (Li *et al.*, 2009a) sugiere que la inducción de la expresión de miR-124 podría causar la inhibición de la proliferación de BTSCs al promover su diferenciación. En este sentido, Silber *et al.* hallaron que miR-124 (y también miR-137) promueve la parada de ciclo celular en G0/G1 e induce la diferenciación *neuronal-like* de las GBM-BTSCs en ausencia de la señalización de factores de crecimiento (Silber *et al.*, 2008).

I.5.3.3.3. miR-125b

MiR-125b es otro miRNA que promueve la diferenciación neuronal (Le *et al.*, 2009). Se ha descrito que miR-125b presenta expresión variable en diferentes estudios independientes, lo que sugiere que podría funcionar como un oncogén u anti-oncogén en subconjuntos de tumores. Shi *et al.* han descrito recientemente que miR-125b se encuentra infra-expresado en las células madre de glioma humanas U251. La inducción de su expresión *in vitro* lleva a la inhibición del crecimiento por disminución de los

reguladores de ciclo celular CDK6 y CDC25A (Shi *et al.*, 2010b). Sin embargo, otro estudio parece indicar que este miRNA también puede tener efectos anti-apoptóticos e inducir proliferación en otro contexto, ya que describe que la sobreexpresión de miR-125b es capaz de reprimir la apoptosis inducida por ATRA (ácido retinoico *all-trans*) en las células humanas de glioma, y que una baja expresión de miR-125b disminuye la proliferación y aumenta la sensibilidad de las células al ATRA. Este efecto anti-apoptótico de miR-125b se debería al bloqueo de la traducción del mRNA que codifica para el factor de modificación de BCL-2 (BMF), proteína relacionada con la apoptosis (Xia *et al.*, 2009).

I.5.3.3.4. miR-451

Gal *et al.* (Gal *et al.*, 2008) demostraron que la transfección de GBM-BTSCs con miR-451 inhibía su crecimiento y su capacidad para formar agregados clonales/esferas *in vitro*. Pero como ocurre con miR-125b, los resultados *in vitro* para miR-451 son controvertidos. Godlewski *et al.* (Godlewski *et al.*, 2010) hallaron que los niveles elevados de miR-451 en los pacientes con GBM se asocian con peor supervivencia. Por otra parte, Nan *et al.* (Nan *et al.*, 2010) han publicado que miR-451 juega un papel como supresor tumoral en tres líneas humanas de GBM, ya que el aumento de expresión de este miRNA inhibe el crecimiento celular, induciendo la parada del ciclo celular en la fase G0/G1, aumenta la apoptosis celular y disminuye la capacidad de invasión a través de matrigel. Teniendo en cuenta que la expresión de miR-451 se correlaciona con el subgrupo neuromesenquimal de GBM en la clasificación propuesta por Kim *et al.* a partir de perfiles de expresión de miRNAs (Kim *et al.*, 2011), es posible que el papel de miR-451 en la gliomagénesis varíe en virtud del subtipo de GBM en el que se exprese.

I.5.3.3.5. miR-9/9*

MiR-9/9* está sobreexpresado específicamente en los tumores cerebrales primarios comparado con los tumores de otros tejidos y las metástasis cerebrales, y se ha propuesto como un posible biomarcador (Nass *et al.*, 2009). Sin embargo, informes previos hallaron que la sobreexpresión de miR-9 promueve la diferenciación prematura de las células progenitoras neurales, así que podría actuar como promotor de la diferenciación en vez de como oncogén. Una de las dianas de miR-9 es TLX, un receptor nuclear implicado en la autorrenovación de las NSCs (revisado por Fineberg *et al.* (Fineberg *et al.*, 2009)). Más recientemente, Kim *et al.* han descrito que miR-9 está enriquecido en la subclase de GBM relacionada con los precursores oligoneurales. En sus experimentos, miR-9 inhibe las quinasas JAK e inhibe la activación de STAT3, desciende la expresión de marcadores astrocíticos/mesenquimales, promueve la expresión de marcadores neuronales y aumenta la proliferación de las GBM-BTSCs CD133⁺ (Kim *et al.*, 2011). Sin embargo, queda por investigar si la expresión de miR-9 se encuentra enriquecida en la masa de células tumorales, que podrían representar la progenie diferenciada de las BTSCs, pero permanece inhibida en la subpoblación de BTSCs.

I.5.3.3.6. miR-128

Otro miRNA interesante que regula las BTSCs es miR-128, que reprime al oncogén *BMI1*, un importante factor de autorrenovación para varios tipos de células madre, y de este modo es capaz de inhibir la proliferación del glioma (Godlewski *et al.*, 2008). Al sobreexpresar miR-128, se reducen los niveles de BMI1 y disminuye el número y el volumen de las esferas de glioma observadas (Godlewski *et al.*, 2008). Recientemente, Cui *et al.* han hallado otra diana de miR-128, ARP5, un supresor de la

transcripción que promueve la auto-renovación de las células madre e inhibe la expresión de genes supresores tumorales implicados en senescencia y diferenciación (Cui *et al.*, 2010). Finalmente, la sobreexpresión de miR-128 es también capaz de limitar el crecimiento de los gliomas de los xenotransplantes *in vivo* (Fasano *et al.*, 2009).

I.5.3.3.7. miR-34a

MiR-34a se considera un supresor tumoral en células de glioma por ser una diana directa de P53 (Luan *et al.*, 2010) y encontrarse su expresión inhibida en muestras de glioma humano. Además, su sobreexpresión conlleva la inhibición de la proliferación y la migración celular, y al mismo tiempo promueve la diferenciación de las BTSCs de glioma. MiR-34a actúa dirigiéndose contra múltiples dianas, tales como c-MET, CDK6, NOTCH-1 y NOTCH-2 (Guessous *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009b). La expresión ectópica de NOTCH1/2 rescata parcialmente los efectos de miR-34a sobre la muerte celular en las BTSCs de glioma, lo cual confirma a miR-34a como un regulador importante de la vía de señalización NOTCH.

I.5.3.3.8. miR-326

MiR-326 es un miRNA expresado en las neuronas que se encuentra también inhibido en muestras de glioma y está relacionado con la vía NOTCH, regulando negativamente su expresión. A su vez, este miRNA inhibe la actividad de las proteínas NOTCH, estableciendo un bucle regulatorio de retroalimentación negativa en esta importante ruta del glioma (Kefas *et al.*, 2009).

HIPÓTESIS

El glioblastoma multiforme es un tumor cerebral con muy mal pronóstico, incluso con los tratamientos actuales más avanzados. Esta pobre respuesta terapéutica podría deberse a la presencia de células especialmente resistentes a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia que son capaces de renovar el tumor en su totalidad. Estas células, denominadas BTSCs (células madre de tumor cerebral) pueden aislarse de los tumores de los pacientes de GBM mediante su cultivo como neuroesferas, lo cual permite su estudio molecular y funcional *in vitro*. Una aproximación para disminuir la tumorigenicidad de estas células podría ser la inducción de su diferenciación en los tumores. Por ello, hemos validado un sistema de cultivo *in vitro* en el que mediante determinadas condiciones es posible inducir la diferenciación de las BTSCs hacia los tres linajes principales del SNC. El papel de la expresión global de genes codificantes en la puesta en marcha de esta diferenciación inducida se conoce parcialmente. Sin embargo, hasta la fecha no se ha estudiado si los cambios en el perfil de expresión global de los miRNAs podrían jugar un papel similar al de los genes codificantes en el proceso de diferenciación de las BTSCs.

En base a estos datos, nuestra hipótesis de trabajo propone que la expresión de determinados miRNAs podría tener un papel en el proceso de diferenciación inducida de las BTSCs. Estos miRNAs podrían identificarse mediante el estudio de sus cambios a nivel transcripcional durante este proceso de diferenciación mediante el análisis con microarrays de expresión. Por último, estos miRNAs podrían ejercer sus funciones mediante la regulación de genes y vías moleculares implicadas en diferenciación y otros procesos relacionados con la gliomagénesis.

OBJETIVOS

1 - Establecimiento de cultivos de neuroesferas a partir de muestras quirúrgicas de pacientes con GBM.

a) Análisis de su capacidad de autorrenovación.

b) Estudio de su capacidad de desarrollo tumoral en un modelo de xenotransplante en ratones inmunodeficientes mediante inyección estereotáctica intracraneal.

c) Análisis de su capacidad de diferenciación a los principales linajes neurales presentes en el SNC.

2 - Validación de un modelo de inducción de la diferenciación *in vitro* de las neuroesferas (o BTSCs) en presencia de factores de crecimiento.

3 - Análisis de la expresión global de miRNAs durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las BTSCs de GBM mediante microarrays de miRNAs.

4 - Estudio de la implicación funcional de los miRNAs validados y seleccionados en la diferenciación *in vitro* de las BTSCs de GBM.

a) Análisis del papel de estos miRNAs en la inducción de cambios de expresión de los marcadores de diferenciación neural.

b) Estudio de otras posibles funciones de estos miRNAs en la biología de las BTSCs.

5 - Análisis de la expresión génica de las dianas potenciales de los miRNAs seleccionados y de su implicación en las rutas alteradas más relevantes de la diferenciación de las BTSCs.

a) Examen de las rutas moleculares alteradas durante la diferenciación *in vitro* de las BTSCs.

b) Búsqueda de posibles dianas de los miRNAs seleccionados entre los genes cuya expresión varía durante el proceso de diferenciación de las BTSCs.

MATERIAL Y MÉTODOS

M.1. Cultivo de neuroesferas de tumores primarios

La obtención de muestras de pacientes de GBM se realizó en colaboración con el laboratorio del Dr. José Luis Fernández Luna, en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV), de Santander, España. Las muestras tumorales se obtuvieron de pacientes con GBM atendidos en los Servicios de Neurocirugía del HUMV y de la Clínica Universidad de Navarra (CUN), que previamente habían dado su consentimiento informado, tal y como está aprobado por los correspondientes Comités Éticos y de Investigación. Inmediatamente tras la resección quirúrgica de la masa tumoral, el tejido fue procesado por disgregación mecánica seguida de una digestión enzimática durante 90 minutos a 37°C con colagenasa Ia (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) a una concentración de 12,5 mg/ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y una actividad enzimática de 394 unidades/mg. Posteriormente, las células tumorales se resuspendieron en medio completo de proliferación para células indiferenciadas (denominado MC a partir de este momento) compuesto por DMEM/F12 (Gibco) complementado con EGF recombinante humano (20 ng/ml; Sigma-Aldrich), FGF2 (20 ng/ml; BioVision, Lyon, Francia), B-27 (20 ml/l de medio; Gibco), heparina (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) y antibióticos (Penicilina-estreptomicina-anfotericina B; BioWhittaker, Lonza, Basel, Suiza) al 1%, y se plaquearon a una densidad celular de 3×10^6 células vivas/placa de 60 mm (Corning Inc., Corning, NY, USA). El cultivo celular se realizó en incubadores con atmósfera húmeda al 5% de CO₂ y 37°C. Las neuroesferas primarias se detectaron en las dos primeras semanas de cultivo y se disociaron seguidamente cada 3-4 días para facilitar el crecimiento celular.

Para la disociación de las neuroesferas, se centrifugaron las células a 1800 revoluciones por minuto (r.p.m.) durante 5 minutos, se resuspendieron en 500 μ l de solución enzimática Accutase (Sigma-Aldrich), se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 minutos. Posteriormente se disociaron mecánicamente utilizando una micropipeta de 1000 μ l (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), se filtraron por filtros *cell strainer* con poros de 70 μ m de diámetro (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) y se resuspendieron en medio fresco como suspensiones de células individuales.

La inducción de diferenciación se llevó a cabo cultivando las neuroesferas en el mismo medio pero añadiendo de suero de ternera fetal (STF) (Gibco) al 10% (denominado medio de diferenciación, MD, a partir de este momento) según los intervalos de tiempo indicados, en diferentes formatos de frascos de cultivo (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para el mantenimiento de estos cultivos de células adherentes, se recolectaron las células cuando la confluencia alcanzaba un 80-90% utilizando tripsina-EDTA (BioWhittaker) para despegarlas de la superficie del frasco de cultivo.

M.2. Estudios de autorrenovación

M.2.1. Ensayo de autorrenovación por dilución clonal

Las células derivadas de la disociación de neuroesferas se sembraron en placas de 96 pocillos a una dilución clonal (1 célula/pocillo) y se contó el número de neuroesferas secundarias generadas a los 10 días. Este experimento se llevó a cabo por triplicado, sembrando 3 placas por línea de neuroesferas, y como control se utilizó la línea celular de GBM U87MG cultivada en medio de proliferación *stem* (MC) para poder comparar su autorrenovación con la de las líneas de GBM-BTSCs generadas a partir de las muestras tumorales de los pacientes.

M.2.2. Ensayo de autorrenovación por dilución límite

Se cuantificó la capacidad de autorrenovación de las células BTSCs usando un ensayo de dilución límite, tal y como está descrito previamente (Singh *et al.*, 2004). Después de la formación de esferas primarias, los cultivos de BTSCs se disociaron y se sembraron en placas de 96 pocillos (200 μ l/pocillo). Las diluciones sembradas cubrían un rango desde 200 células/pocillo hasta 1 célula/pocillo (12 pocillos/dilución en cada placa, por triplicado en 3 placas). Se añadió medio fresco (25 μ l/pocillo) a los cultivos cada dos días hasta el día 7, cuando se calculó el porcentaje de pocillos que no contenían esferas para cada densidad celular de siembra, y se enfrentó al número de células/pocillo para calcular la recta de regresión correspondiente. Se calcularon los valores de intersección con el eje x, que representan el número de células necesarias para formar al menos una esfera tumoral en cada línea de BTSCs derivadas de tumor.

M.3. Generación del modelo xenotransplante de BTSCs

Una de las características fundamentales que evidencian la existencia de BTSCs en los cultivos de neuroesferas, es su capacidad de generación tumoral al ser inyectadas intracranalmente en ratones inmunodeficientes. Por ese motivo, tuvimos que poner a punto la técnica de inyección intracraneal para el modelo de xenotransplante murino.

M.3.1. Ratones utilizados en el xenotransplante

Para la puesta a punto del modelo de xenotransplante, utilizamos dos cepas diferentes de ratones inmunodeficientes. La primera cepa utilizada se trató de ratones BALB/c- RAG2^{-/-}/ γ c^{-/-} (C;129S4-Rag2^{tm1Flv} Il2rg^{tm1Flv}/J, Jackson Lab., Bar Harbor, ME, USA) hembra de entre 6 y 8 semanas de edad. Estos ratones están modificados

genéticamente para que no expresen el gen *RAG2*, que permite el comienzo de la recombinación V(D)J durante el desarrollo de los linfocitos B, T y células *natural killer* (NK), ni el gen de la cadena γ del receptor de la interleuquina 2 (IL-2), por lo que presentan una inmunodeficiencia combinada severa al carecer de células NK, linfocitos T o B. Esta característica posibilita una mayor eficiencia de injerto de xenotransplantes que en otros tipos de ratones inmunodeficientes, lo que facilita la generación de modelos humanizados (Traggiai *et al.*, 2004).

Se utilizaron asimismo ratones inmunodeficientes BALB/c nude (NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1*^{nu}) homocigotos hembra de entre 6 y 8 semanas, obtenidos de “*Charles River Laboratories International*” y desarrollados por “*Charles River Laboratory Japan*” (CRLJ, 1985). Estos ratones son atímicos, por lo que carecen de células T funcionales y son deficientes en linfocitos B.

Los animales se estabularon en la zona libre de patógenos específicos (SPF, del inglés *Specific Pathogen Free*) del animalario del CIMA, protegidos del exterior en jaulas ventiladas con presión positiva. Los cambios y manipulaciones de los animales se realizaron en cabinas de flujo laminar. Todos los experimentos se efectuaron con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra.

M.3.2. Puesta a punto del modelo de xenotransplante tumoral murino

Se usaron líneas celulares de GBM que históricamente se han utilizado para generar tumores intracraneales mediante xenotransplante, en la puesta a punto del modelo.

M.3.2.1. Líneas celulares

Para la puesta a punto del modelo de xenotransplante tumoral murino se utilizaron líneas celulares de GBM U87MG (HTB-14, *American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, VA, USA) y U251MG (IFO 50288, *Japanese Collection of Research Bioresources* (JCRB), Japón). Para conseguir una buena transfección estable de estas líneas uno de los mejores métodos es la infección mediante vectores retrovirales.

Para la producción de los vectores retrovirales necesarios se utilizó la línea celular Amphopack 293 (Clontech, Mountain View, CA, USA) derivada de células embrionarias de riñón humanas, y para la titulación de la producción de virus se empleó la línea NIH-3T3 (ACC 59, DMSZ, Braunschweig, Alemania) derivada de fibroblastos embrionarios de ratón.

Todas las líneas celulares se cultivaron con medio DMEM (Gibco) suplementado con 10% de STF (Gibco) y 2% de penicilina/estreptomicina (P/E, BioWhittaker).

M.3.2.2. Plásmido retroviral reportero SFG-nesTGL

Con el propósito de seguir el crecimiento tumoral *in vivo*, se infectaron las células U87MG y U251MG con retrovirus que contenían el plásmido reportero triple HSV1-tk/GFP/luciferasa de *Photinus pyralis* (SFG-nesTGL) (Ponomarev *et al.*, 2004), un vector retroviral que contiene la secuencia para la expresión en células eucariotas de una proteína de fusión de 130 kDa compuesta por proteína verde fluorescente (GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*), la luciferasa de *Photinus pyralis* (Luc) y HSV1-tk (Del inglés, *Herpes simplex virus thymidine kinase*) (amablemente cedido por el Dr. Gelovani, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, NY, USA). Este vector contiene el

dominio NES (señal de exportación nuclear, del inglés *nuclear exportation signal*) que favorece la salida del núcleo. Además contiene la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) de reconocimiento por el ribosoma y la *signal-anchor* (SA) para promover la orientación transmembrana de la proteína. Además este vector contiene las secuencias LTR en los extremos 5' y 3' para favorecer la inserción del plásmido retroviral en el genoma de las células que se infectan (Figura M.1). La proteína de fusión permite monitorizar las células que se han transducido con este vector mediante un triple sistema: fluorescencia (GFP), bioluminiscencia (luciferasa) o mediante tomografía por emisión de positrones (PET; del inglés, *Positron Emission Tomography*) gracias a la HSV1-tk (Figura M.2).

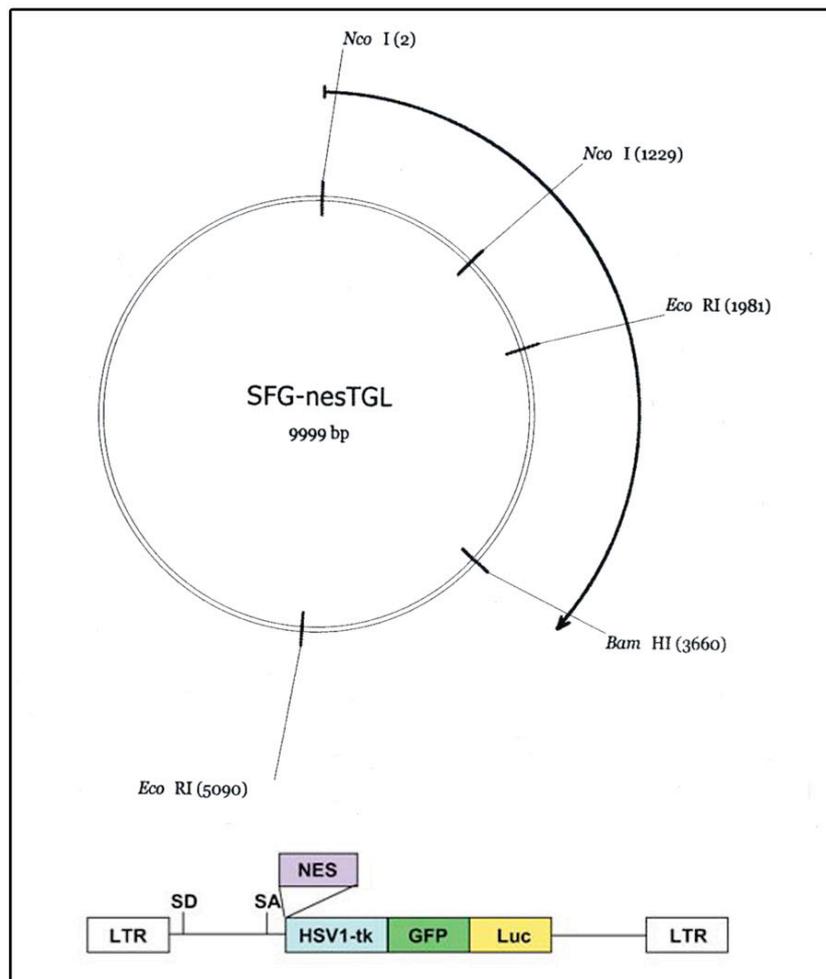


Figura M.1. Esquema del vector reportero SFG-nesTGL. GFP, *green fluorescent protein*;

HSV1-tk, *Herpes simplex virus thymidine kinase*; LTR, *Long-terminal repeat*; Luc, luciferasa de *Photinus pyralis*; NES, *nuclear exportation signal*; SA, *signal-anchor*; SD, secuencia de Shine-Dalgarno.

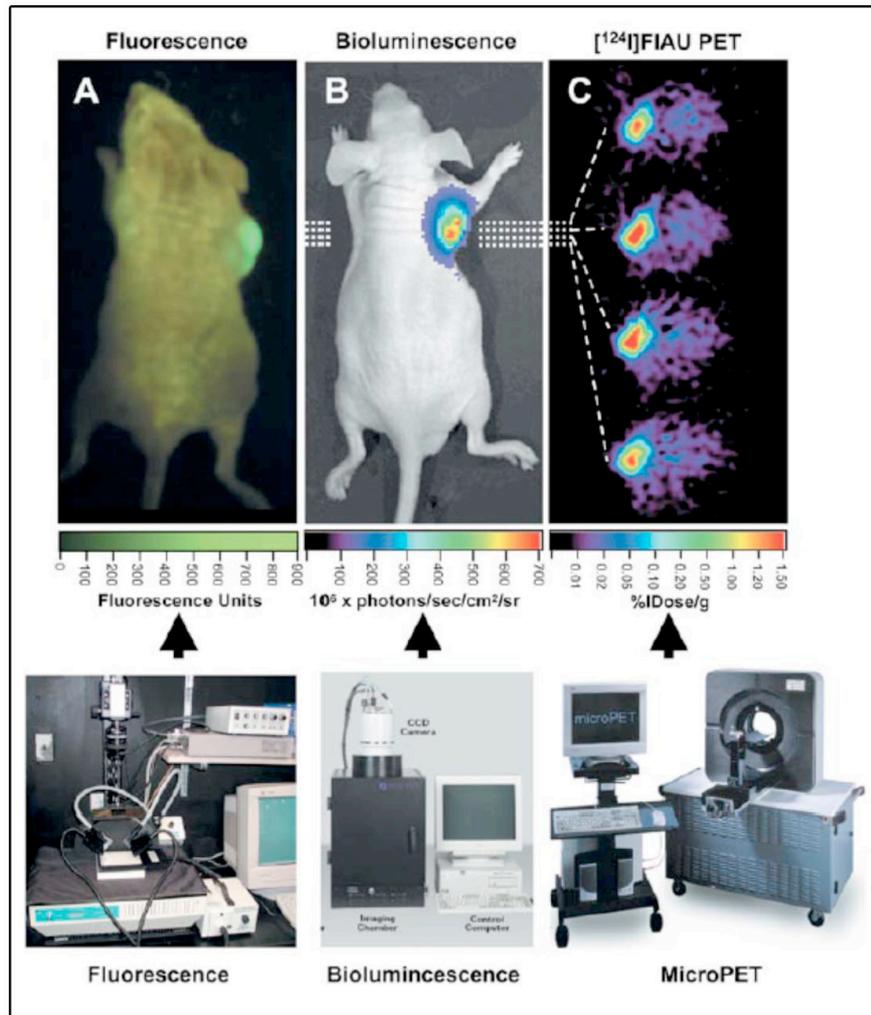


Figura M.2. Ejemplo de imágenes que ofrece el vector reportero *SFG-nesTGL*. Muestra las distintas imágenes que se pueden obtener con el vector reportero *in vivo* así como las distintos instrumentos para la captación de las mismas (Ponomarev *et al.*, 2004). A, fluorescencia; B, bioluminiscencia; C, microPET (Tomografía por emisión de positrones).

M.3.2.3. Producción retroviral

Como línea empaquetadora para la producción de los retrovirus no replicativos de segunda generación se utilizó la línea celular Amphopack 293 (Clontech), generada a partir de la línea celular HEK293T a la que se le introdujeron de forma estable los genes que codifican para las proteínas virales *gag-pol* y *env* bajo el promotor del citomegalovirus (CMV). Además esta línea celular se cotransfectó utilizando el reactivo

FuGENE (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) con el vector reportero SFG-nestTGL y el plásmido pMD2.G (Addgene, Cambridge, MA, USA), que contiene la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Figura M.3). La expresión de esta proteína vírica VSV-G favorece la fusión de la membrana endosómica de la envuelta viral con la membrana de las células infectadas.

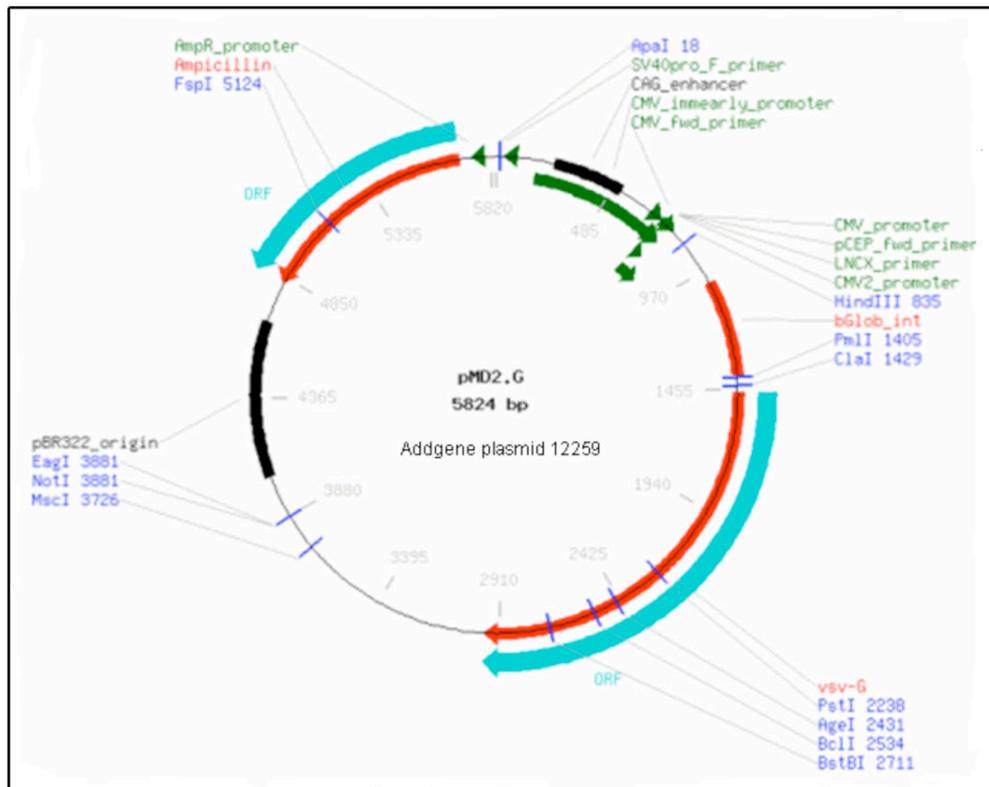


Figura M.3 Esquema del plásmido pMD2.G.

Tras incubar las células empaquetadoras transfectadas a 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, se recogió el sobrenadante a las 48 y 72 horas y se filtró a través de un filtro de poros de 0,20 µm de diámetro (VWR International, Radnor, PA, USA) para la obtención de los vectores retrovirales. Con este sistema de producción retroviral los virus producidos son retrovirus defectivos de segunda generación, es decir, no son capaces de propagarse una vez han infectado a la célula huésped.

M.3.2.4. Cuantificación del título viral

Se sembró la línea celular NIH-3T3 en placas de 60 mm (Corning Inc.) a una confluencia aproximada del 80% en medio sin antibiótico. Sobre distintas placas se añadieron diluciones seriadas de sobrenadante viral procedente de las células productoras y se suplementó con polibreno (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 $\mu\text{g/mL}$. Tras 24 horas se retiró el medio de cultivo para eliminar el polibreno, y se añadió medio suplementado con antibiótico. Las células se dejaron crecer 24 horas más y se contaron las células GFP positivas utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Leica DM IRB (Leica Camera AG, Solms, Alemania). Se capturaron imágenes con la cámara DC480 (Leica) acoplada al microscopio de fluorescencia, utilizando el programa Leica DC Twain (Leica) (Figura M.4). Para el cálculo de carga viral se multiplicó el número de células GFP positivas (en un campo de visión bajo un objetivo 10X), por la inversa del factor de dilución del sobrenadante de las células productoras de retrovirus en el medio de la placa de cultivo correspondiente. El título viral se encontraba alrededor de 10 millones de partículas virales por mililitro en el caso de aquellos sobrenadantes usados para transducir las líneas celulares.

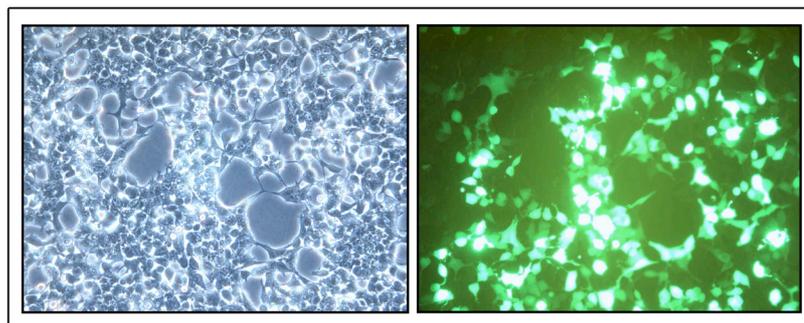


Figura M.4 Imagen de las células NIH-3T3 infectadas con el retrovirus que contiene el vector reportero SFG-nesTGL. Se muestra la misma imagen tomada con contraste de fases (izquierda) y con filtro de fluorescencia para observar GFP (derecha).

Esta técnica de titulación viral se utilizó asimismo para verificar la ausencia de retrovirus en los sobrenadantes de las líneas de GBM infectadas, una vez mantenidas en cultivo durante un mes después de la infección, ya que es un requisito indispensable para su posterior inyección en el modelo de xenotransplante murino.

M.3.2.5. Infección retroviral de las líneas celulares de GBM Y BTSCs

Se sembraron 500.000 células de las líneas celulares de GBM U87MG y U251MG en placas de 60 mm (Corning Inc.), se infectaron con el volumen necesario de retrovirus SFG-nesTGL (dependiendo de cada producción viral) en presencia de 4 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C en atmosfera húmeda al 5 % de CO₂. A las 48 horas se procedió al cambio de medio con virus por medio fresco. Las células se visualizaron en el microscopio invertido de fluorescencia Leica DM IRB para verificar la infección como células positivas para GFP. Una vez confirmada la transducción de las células con el vector reportero, se aislaron clones unicelulares con altos niveles de expresión de GFP, mediante siembra de las células transducidas en placas de 96 pocillos a dilución clonal y posterior observación con el microscopio invertido de fluorescencia. Se capturaron imágenes con la cámara DC480 (Leica) acoplada al microscopio de fluorescencia, utilizando el programa Leica DC Twain (Leica). Los clones seleccionados se denominaron a partir de ese momento: clon X (número por orden cronológico) de U87MG-TGL y U251MG-TGL.

Este mismo procedimiento se llevó a cabo para generar clones modificados a partir de las líneas de BTSCs, con pequeñas modificaciones en la técnica, como el uso de retronectina en la infección retroviral debido a que las células BTSCs se encuentran en suspensión, no son adherentes como las anteriores líneas celulares de GBM.

M.3.2.6. Inyección estereotáctica intracraneal

Todos los experimentos llevados a cabo empleando ratones se han realizado en las instalaciones del animalario del CIMA con la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra. Para la puesta a punto de las inyecciones intracraneales, se resuspendieron $0,7 \times 10^6$ células del clon seleccionado de la línea U87MG-TGL y 1×10^6 células del clon escogido de U251MG-TGL en 7-10 μl ($0,1 \times 10^6$ células/ μl) de DMEM (Gibco) y se implantaron en la región del cuerpo estriado (*Caudate putamen*) de ratones inmunodeficientes BALB/c- RAG2^{-/-}/ $\gamma\text{c}^{-/-}$ y NCI/Hsd/Athymic Nude-*Foxn1*^{nu} hembra de 6 a 8 semanas de edad, previamente anestesiados por vía intraperitoneal (i.p.) con una mezcla 3:1 (2 unidades internacionales U.I. de mezcla /10 g de peso del ratón) de Ketamina (Imalgene 500, Merial, Duluth, GA, USA): Xilacina (Rompun 2%, Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Montville, NJ, USA) y administrados junto con el analgésico Ketoprofeno (5mg/kg de Ketofen 1%, Merial) por vía subcutánea. Las inyecciones se realizaron utilizando un marco estereotáctico de ratón (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Se mantuvo la humedad de los ojos añadiendo gotas de suero fisiológico durante la intervención. La piel de la cabeza se desinfectó con alcohol yodado, y se realizó una incisión de 1 cm de longitud en la línea media, posterior a la altura de los ojos. Usando el controlador de los ejes X e Y, se identificó el punto Bregma (intersección de la suturas sagital mediana y coronal anterior) como coordenada (0,0). A partir de ese punto, se fijaron las coordenadas (+1 mm eje antero-posterior (AP), + 1,5 mm eje medio-lateral (ML) en el hemisferio izquierdo) y se marcó el punto de inyección. Se procedió a la trepanación del cráneo con un microtaladro. Las células se inyectaron con una jeringa Hamilton (Hamilton, Reno, NV, USA) de 26s gauge, previamente desinfectada con etanol al 96% y agua estéril. Sobre el orificio, se fijó el punto 0 del eje Z y se insertó la aguja en el

cerebro hasta llegar a la coordenada correcta (-3,4 mm en el eje dorso-ventral (DV), a partir de la dura madre). Las células se inyectaron a una velocidad de 1 μ l por minuto. La aguja se dejó en el interior 10 minutos adicionales para evitar la regurgitación celular y, una vez retirada, la piel se cerró mediante sutura quirúrgica reabsorbible y se aplicó agua oxigenada en el lugar de la sutura. Los ratones se dejaron en una jaula sobre una manta eléctrica hasta que recuperaron la consciencia. Se añadió el antibiótico Alsir (enrofloxacino) al agua de bebida (2 ml/l de agua) y se mantuvo durante 5 días. La inyección de analgésico se repitió los dos días siguientes.

M.3.2.7. Estudios de bioluminiscencia *in vivo*

Para controlar la implantación de las células y el crecimiento tumoral se utilizó la bioluminiscencia proporcionada por el vector SFG-nesTGL. Los estudios de imagen de bioluminiscencia se iniciaron 10 días después de la implantación celular y se repitieron una vez por semana. Los ratones se anestesiaron intraperitonealmente (i.p., como se ha descrito previamente en el apartado M.3.2.6) y se les administró i.p. 100 μ l de solución de D-luciferina (1g en 33 ml de PBS, Promega, Madison, WI, USA). Cinco minutos después de la inyección de luciferina se tomaron imágenes con varios tiempos de exposición (60, 180, 300 segundos), utilizando el sistema IVIS Spectrum (Caliper, Xenogen, Alameda, CA, USA).

M.3.2.8. Medida de la actividad tumoral en los ratones mediante Tomografía por Emisión de Positrones (PET)

También se utilizó la micro-Tomografía por Emisión de Positrones (microPET) para el seguimiento del xenotransplante. El estudio de microPET se realizó en un tomógrafo Philips Mosaic (Cleveland, OH, USA), de 2 mm de resolución, 11,9 cm de campo de visión (FOV, del inglés *Field of View*) axial y 12,8 cm de FOV transaxial.

Para ello, se inyectó L-[S-metil- ^{11}C]metionina (^{11}C -Metionina) por la vena de la cola (20 MBq \pm 11.1 in 80-100 μL) a los ratones. Veinte minutos después de la administración de este radiotrazador, los animales se colocaron en la cama del scanner del microPET para llevar a cabo una adquisición estática (sinograma) de 20 minutos, bajo anestesia inhalatoria continuada con 2% de isoflurano en gas O_2 . Las imágenes se reconstruyeron en tres dimensiones usando el algoritmo 3D Ramla con 2 iteraciones y un parámetro de relajación de 0,024 en una matriz de 128x128 con un tamaño de voxel de 1 mm y aplicando correcciones de tiempo muerto, decaimiento, aleatorio y de dispersión. Para el análisis cuantitativo de la captación de ^{11}C -Metionina por parte del tumor, se dibujaron regiones de interés (ROI, del inglés *Region of Interest*) en imágenes coronales de 1 mm de grosor. El valor máximo de captación estandarizada (SUVmax) para cada tumor se calculó usando la fórmula SUV= concentración de actividad tisular (Bq/cc) / dosis inyectada (Bq) x peso corporal (g).

M.3.2.9. Estudios post-mortem

Después de los estudios de microPET, los ratones fueron perfundidos de forma sistémica por vía intracardiaca con ayuda de una bomba de perfusión (*Easy-Load II*, Masterflex, Cole-Parmer Instrument Company, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para mantener el flujo constante, previa administración i.p. de heparina (Heparina Mayne 1%, 1 U.I/ 10 g), con 100 ml de paraformaldehído (PFA) fresco al 4% en PBS a 4°C, para fijar el tejido cerebral. Tras la extracción de los cerebros se llevó a cabo su post-fijación con PFA al 4% en PBS a 4°C y se mantuvieron en PBS a 4°C hasta su procesamiento. Dicho procesamiento se llevó a cabo en el servicio de Morfología del CIMA. Se obtuvieron bloques de parafina a partir de los cerebros y se realizaron cortes de 3-5 μm de espesor con un microtomo Microm HM 340E y cuchillas de acero. Los bloques se desbastaron hasta localizar el estriado y se llevaron a cabo tinciones con

hematoxilina eosina (H-E) según procedimientos estándar, para poder realizar las inspecciones histopatológicas posteriormente. Para la captura de imágenes de las preparaciones de H-E se utilizó el microscopio *Axioplan 2 imaging* (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara *Insight Firewire 2 Spot megasample* (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA) usando el programa *Metamorph* para las capturas.

M.3.3. Xenotransplante de BTSCs

Una vez puesto a punto el modelo de xenotransplante murino mediante inyección intracraneal con las líneas celulares de GBM, se procedió a la inyección de las BTSCs derivadas de pacientes de GBM para comprobar su tumorigenicidad *in vivo*. Para ello se utilizó el mismo procedimiento, primero se transdujeron las células con retrovirus que contenían el vector reportero triple SFG-nesTGL (ver M.3.2.5) y se aislaron clones GFP⁺. Se probaron diferentes cantidades de células en un rango entre 0,3 y 1x10⁶ células en un volumen de 6-10 µl de DMEM/F12. Finalmente se concluyó que la mejor implantación de BTSCs y crecimiento tumoral se producía con una cantidad de 1x10⁶ células en un volumen de 10 µl de DMEM/F12.

M.4. Extracción ácidos nucleicos (DNA y RNA)

Para la obtención de DNA plasmídico se utilizaron las bacterias competentes *One Shot TOP10 competent cells* (Invitrogen). La purificación de DNA plasmídico se realizó mediante QIAprep plasmid maxi kit (Qiagen, Hamburgo, Alemania).

La extracción de RNA se realizó utilizando el método de extracción de TRIzol (Invitrogen) para el análisis de la expresión de genes y mediante el kit miRVANA

(Ambion, Applied Biosystems (AB), Foster City, CA, USA) para las muestras que se hibridaron en el microarray de microRNAs de Exiqon.

Los DNA y RNA extraídos se cuantificaron con NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

M.5. RT-PCR cuantitativa

La cuantificación de los niveles de expresión a nivel de RNA mensajero (mRNA, del inglés *messenger RNA*) de los marcadores de BTSCs y diferenciación neural en las neuroesferas se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa. En el caso del estudio de los niveles de expresión de marcadores neurales en controles fisiológicos, se utilizaron RNAs comerciales de neuronas humanas, *human neuron total RNA* (1525, Science Cell, Carlsbad, CA, USA), astrocitos humanos, *human astrocytes total RNA* (1805, Science Cell) y microglía humana, *human microglia total RNA* (1905, Science Cell). Para la síntesis de cDNA en la reacción de retrotranscripción (RT) se utilizó la enzima retro-transcriptasa M-MLV (Invitrogen), siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Para la reacción de PCR a tiempo real se utilizó *FastStart Universal SYBR Green Master (Rox)* (Roche Diagnostics) en el caso de los genes *NES*, *BMI1*, *SOX2*, *VIM*, *MAP2*, *GFAP* y *GALC*; en el caso de *TUBB3* se utilizó la sonda específica de *Integrated DNA Technologies* (61916927, IDT, Coralville, IA, USA). La cantidad de cDNA utilizado para las reacciones variaba entre los diferentes genes, encontrándose en un rango entre 1 y 25 ng de cDNA por reacción. Las reacciones de PCR a tiempo real se efectuaron en el termociclador AB 7300 Real Time PCR System (AB). Como control interno se utilizó la cuantificación de *GAPDH* humano. Los oligonucleótidos cebadores específicos para cada gen se detallan a continuación:

NES Directo: 5'-CTTCCCTCAGCTTTCAGGAC-3'

NES Reverso: 5'-TAAGAAAGGCTGGCACAGGT-3'

BMI1 Directo: 5'-GGAGACCAGCAAGTATTGTC-3'

BMI1 Reverso: 5'-CATTGCTGCTGGGCATCGTAAG-3'

SOX2 Directo: 5'-TACAGCATGTCCTACTCGCAG-3'

SOX2 Reverso: 5'-GAGGAAGAGGTAACCACAGGG-3'

VIM Directo: 5'-GCAGGAGGAGATGCTTCAGA-3'

VIM Reverso: 5'-CCTCTTCGTGGAGTTTCTTCA-3'

GFAP Directo: 5'-GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC-3'

GFAP Reverso: 5'-GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA-3'

MAP2 Directo: 5'-CTTCCTCCATTCTCCCTCCT-3'

MAP2 Reverso: 5'-CCTGGGATAGCTAGGGGTTC-3'

TUBB3 Directo: 5'-GGCCTGACAATTCATCTTTGG-3'

TUBB3 Reverso: 5'-TCGCAGTTTTACACTCCTTC-3'

GALC Directo: 5'-GCCAAGCGTTACCATGATTT-3'

GALC Reverso: 5'-AGGAGCATGGATGCAGAGAT-3'

GAPDH Directo: 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'

GAPDH Reverso: 5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAA-3'

La reacción de PCR a tiempo real consistió en una activación inicial de la enzima durante 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 2 pasos: una

desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y un emparejamiento y extensión de 60 segundos a 60°C.

El cambio del Ciclo Umbral (ΔCt o dCt) de cada muestra se calculó como la diferencia entre el valor Ct del gen de interés menos el valor de Ct de *GAPDH* (control endógeno). El $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra se obtuvo restando el valor de ΔCt del estado control (en las muestras del array de miRNA, el estado de neuroesfera (NE); en las muestras de las transfecciones celulares, las células transfectadas con el control negativo) del valor de ΔCt del estado objeto de estudio (en las muestras del array de miRNAs, las células diferenciadas durante 4 o 14 días; en las transfecciones, las células transfectadas con los precursores/inhibidores de miRNAs).

El *fold change* (FC) se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (representado como 2^{-ddCt} en las gráficas) para valores mayores que 1. En el caso de valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ menores que 1 se calculó el valor simétrico $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$. En el estudio de los marcadores neurales en los controles fisiológicos no se calculó el $2^{-\Delta\Delta Ct}$, ya que no hay una muestra de referencia con la que poder comparar, por lo que directamente se representaron los valores de $2^{-\Delta Ct}$ (representado como 2^{-dCt} en las gráficas) de expresión respecto al control endógeno, *GAPDH*. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

M.6. Inmunofluorescencia

Se detectó la expresión y localización subcelular de Nestina, GFAP, Tuj1 (TUBB3) y O4 mediante microscopía de fluorescencia con el microscopio Axio Imager.Z1 (Carl Zeiss Inc.), equipado con una lámpara de fluorescencia y un cubo de filtros (DAPI, *filter set* 34; verde, *filter set* 38; rojo, *filter set* 20; Carl Zeiss Inc.), utilizando los objetivos 10x/0.30 Plan-neofluar, 20x/0.5 Plan-neofluar, 40x/0.75 Plan-neofluar (Carl Zeiss Inc.). Se llevó a cabo la preparación de las células de dos formas

diferentes, teniendo en cuenta su estado de cultivo. Las neuroesferas en suspensión se centrifugaron sobre portaobjetos *cytoslide* (Shandon, Thermo Fisher Scientific) utilizando el aparato Cytospin3 (Shandon, Thermo Fisher Scientific) en posición *Low* a una velocidad de 400 r.p.m. durante un minuto. Las células en medio de diferenciación se crecieron sobre portaobjetos con cámaras, *Lab-Tek chamber slides* (Nunc). Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% preparado en tampón fosfato salino (PBS) y se permeabilizaron en Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,5%. Para la inmunotinción, las células se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo de conejo anti-GFAP, o anticuerpos de ratón anti-Nestina, anti-Tuj1, anti-O4, todos ellos a una dilución 1/100 en PBS. Las referencias de los anticuerpos primarios utilizados están detalladas en la tabla M.1. Seguidamente, se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo conjugados con las tinciones fluorescentes Texas Red y Fluoresceína-5-Isotiocianato (FITC) (referencias expuestas en la tabla M.2) a una dilución 1/150 en PBS, para la detección de fluorescencia. Los núcleos de las células se contrastaron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Las imágenes se captaron con la cámara 739CCD (Metasystems, North Royalton, OH, USA) acoplada al microscopio de fluorescencia, utilizando el programa *Isis Imaging System*.

Anticuerpo primario	Especie	Referencia	Casa comercial	Dilución
Anti-GFAP humano	Conejo	Z0334	DAKO, Glostrup, Dinamarca	1:100
Anti-Nestina humana	Ratón	611658	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	1:100
Anti-Tuj1 humano	Ratón	T-8660	Sigma-Aldrich	1:100
Anti-O4 humano	Ratón	MAB345	Millipore, Billerica, MA, USA	1:100

Tabla M.1 Anticuerpos primarios usados en la técnica de inmunofluorescencia.

Anticuerpo secundario	Especie	Referencia	Casa comercial	Dilución
Anti-IgG de conejo conjugado con FITC	Cabra	111-095-003	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Inglaterra	1:150
Anti- IgG de ratón conjugado con Texas Red	Cabra	115-075-003	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, Inglaterra	1:150

Tabla M.2 Anticuerpos secundarios usados en la técnica de inmunofluorescencia.

M.7. Estudio de expresión mediante microrrays de microRNA

M.7.1. Procesado de muestras

Los RNAs de las muestras de BTSCs en estado de neuroesfera y diferenciadas durante 4 y 14 días , se extrajeron utilizando el *kit* miRVANA (Ambion) y se midió la concentración de RNA con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher

Scientific). A continuación, se examinó la calidad de estos RNAs mediante el Bioanalyser 2100 (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA). Este aparato lleva a cabo el análisis de la calidad del RNA en un chip en el que se separa el RNA por electroforesis capilar y lo detecta mediante fluorescencia activada por láser (Mueller *et al.*, 2000). El resultado es un electroferograma donde la cantidad de fluorescencia medida en cada punto es proporcional a la cantidad de RNA de un tamaño dado. A partir de las cuantificaciones de RNA ribosomal de 28S y 18S se obtiene el RIN (del inglés, *RNA Integrity Number*), que indica la calidad de las muestras ($RIN \geq 8.0$ implica alta calidad). Todas las muestras extraídas presentaron $RIN \geq 8.0$ procediéndose a su marcaje usando el *miRCURY Hy3/Hy5 Power labeling kit*. A continuación se llevó a cabo su hibridación en el array miRCURY LNA (versión de 5ª generación, *hsa*, *mmu* y *rno*) que contiene sondas de captura dirigidas contra 2090 miRNAs (todos los miRNAs de humano, ratón y rata registrados en la versión 15.0 de miRBASE del Instituto Sanger, (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). El análisis de las imágenes escaneadas mostró que el marcaje fue correcto y todas las sondas de captura para los oligonucleótidos control *spike-in* produjeron señales dentro del rango esperado.

M.7.2. Análisis bioinformático del microarray de microRNAs

Las señales cuantificadas en el array se normalizaron, después de la corrección de ruido de fondo, usando el algoritmo de regresión Lowess (*LOcally WEighted Scatterplot Smoothing*) global, ya que se ha comprobado que realiza la mejor normalización para minimizar las diferencias dependientes de la intensidad en las hibridaciones de dos colores. Seguidamente, se utilizó el programa LIMMA (*Linear Models for MicroArray data*) para realizar 3 comparaciones (neuroesfera vs diferenciada 4 días, neuroesfera vs diferenciada 14 días y neuroesfera vs diferenciada 4

y 14 días). De entre los 2090 miRNAs analizados se seleccionaron aquellos con valores de B mayores que 0 en cualquiera de las 3 comparaciones realizadas. Además se revisaron los valores crudos de intensidad de Hy3 de estos miRNAs para seleccionar los que presentaban valores mayores de 200 y se generó una representación gráfica ordenada de estos datos mediante *clustering* jerárquico utilizando los programas *Cluster 2.11* y *Treeview 1.60* (Eisen *et al.*, 1998). Posteriormente se procedió a la validación de los miRNAs candidatos utilizando los ensayos de MicroRNA de TaqMan (AB) descritos en el apartado siguiente.

M.8. Ensayos de microRNA de TaqMan

Estos ensayos se utilizaron tanto para la validación de los resultados obtenidos en el microarray de miRNAs de Exiqon, como para la comprobación de la sobreexpresión e inhibición en los estudios funcionales llevados a cabo mediante transfección de las BTSCs. Los ensayos de miRNA de TaqMan (AB) se llevan a cabo en dos pasos (Figura M.5), primero una retrotranscripción (RT) específica del miRNA y después una reacción de PCR en tiempo real.

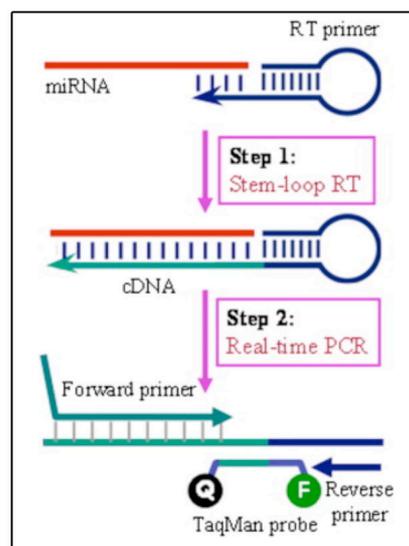


Figura M.5 Descripción esquemática de los ensayos de MicroRNA de TaqMan. Se muestra

la estructura y el diseño del cebador *stem-loop* de miRNA para la RT. Éste se une a la diana específica de miRNA, y se extiende durante la reacción de RT (paso 1). En el paso 2, la estructura *stem-loop* se abre durante el emparejamiento y la extensión en la reacción de PCR TaqMan siguiente (Schmittgen *et al.*, 2008).

Para la RT se utilizaron 10 ng de RNA total, 1,5 µl de tampón de RT-PCR 10X, 1 µl de enzima de RT *MultiScribe* 50 U/µl, 0,15 µl de mix de dNTP 100X, 0,19 µl de inhibidor de RNasas 20 U/µl, y 3 µl de cebador de RT específico 5X (Tabla M.3), el resto de volumen de reacción de 15 µl se completó agua libre de nucleasas. Todos los componentes de la reacción (excepto el RNA y el cebador de RT) se encuentran en *el TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* (P/N 4366597, AB). Las reacciones de RT se incubaron en el termociclador 2720 (AB) a 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 30 minutos y 85°C durante 5 minutos.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizaron 10 µl de *Universal PCR Master Mix 2X No AmpErase UNG* (P/N: 4324018, AB), 4 µl del producto de RT, 1 µl del ensayo TaqMan 20X específico (Tabla M.3) y 5 µl de agua libre de nucleasas, en volumen final de 20 µl. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos *MicroAmp optical 96-well plate* (P/N N801-0560, AB) utilizando el termociclador AB 7300 *Real Time PCR System* (AB). La reacción consistió en una activación inicial de la enzima durante 10 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 2 pasos: una desnaturalización de 15 segundos a 95 °C y un emparejamiento y extensión de 60 segundos a 60°C. Las muestras se analizaron por triplicado.

microRNA	TaqMan microRNA assay ID
hsa-miR-9	000583
hsa-miR-10b	000388
hsa-miR-21	000397
hsa-miR-22	000398
hsa-miR-23b	000400
hsa-miR-29a	002112
hsa-miR-29b	000413
hsa-miR-31	002279
hsa-miR-33	000424
hsa-miR-34a	000426
hsa-miR-93	000432
hsa-miR-100	000437
hsa-miR-106a	002169
hsa-miR-106b	000442
hsa-miR-214	000517
hsa-miR-221	000524
hsa-miR-222	002276
hsa-miR-301a	000528
microRNA control: RNU6B	001093

Tabla M.3 Ensayos de miRNA de TaqMan utilizados en este trabajo. Cada ensayo está compuesto por el cebador específico para RT y una mezcla de cebadores y sonda TaqMan también específicos para el miRNA correspondiente.

El cambio del Ciclo Umbral (ΔCt o dCt , Ciclo *threshold*) de cada muestra se calculó como la diferencia entre el valor Ct del miRNA menos el valor de Ct de *RNU6B* (control endógeno). El $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra se obtuvo restando el valor de ΔCt del estado control del valor de ΔCt del estado objeto de estudio (en la validación de miRNAs, las células diferenciadas durante 4 o 14 días; en las transfecciones, las células transfectadas). El estado control en la validación de miRNAs fue el estado de

neuroesfera y en los experimentos funcionales, las células transfectadas con el control negativo. El FC se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para valores mayores que 1, en el caso de valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ menores que 1 se calculó el valor simétrico $-1/2^{-\Delta\Delta Ct}$.

M.9. Generación de modelos celulares de sobreexpresión e inhibición de microRNAs

M.9.1. Transfección de BTSCs

La puesta a punto de la transfección de las neuroesferas se llevó a cabo utilizando diferentes reactivos de transfección y concentraciones de *FAM-labeled Pre-miR Negative Control #1* (AM17121, Ambion, AB), un oligonucleótido de RNA de doble cadena marcado con FAM, diseñado para poder visualizar la entrada del precursor de miRNA (pre-miR) mediante microscopía de fluorescencia u otra técnica basada en la fluorescencia, en este caso mediante citometría de flujo. Las concentraciones para puesta la punto de la transfección con pre-miRNA marcado con FAM fueron: 150, 75, 20, 10, 5 y 2 nM.

Los reactivos de transfección evaluados fueron los siguientes:

- *X-tremeGENE siRNA transfection reagent* (04476093001, Roche Diagnostics)
- *Lipofectamine 2000 transfection reagent* (11668-027, Invitrogen)
- *siPORT NeoFX transfection reagent* (AM4510, Ambion, AB)
- *Nanojuice transfection kit* (71902-3, Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

Como puede observarse en la tabla M.4, se comprobó que el reactivo más eficiente para la transfección, así como menos citotóxico para las células, resultaba ser

Nanojuice transfection kit. Este *kit* utiliza una mezcla de reactivos (*Core reagent* y *Booster reagent*) basados en dendrímeros Priostar® junto con una formulación liposomal policationica. Para las transfecciones se ha utilizado Opti-MEM I Reduced Serum Media (Invitrogen) que es un medio modificado del medio mínimo esencial de Eagle (del inglés, *Eagle's modified essential medium*, EMEM), tamponado con HEPES y bicarbonato sódico y suplementado con hipoxantina, timidina, piruvato sódico, L-glutamina, elementos traza y factores de crecimiento, y que se usa comúnmente para las transfecciones con lípidos catiónicos.

Reactivo de transfección	% transfección	% muerte celular
<i>X-tremeGENE</i>	17,6	14,6
<i>Lipofectamine 2000</i>	98,1	24,6
<i>siPORT NeoFX</i>	84	17,2
<i>Nanojuice</i>	97,6	13,9

Tabla M.4 Puesta a punto de la transfección de BTSCs mediante diferentes reactivos de transfección comerciales.

Para los experimentos de sobreexpresión e inhibición de miRNAs se utilizaron los precursores de miRNA pre-miR y los inhibidores de miRNA anti-miR de Ambion (AB), respectivamente. Los pre-miRs son moléculas pequeñas de RNA de doble cadena modificadas químicamente, diseñadas para imitar las moléculas de miRNA maduras endógenas, en cambio los anti-miRs son ácidos nucleicos de cadena simple modificados químicamente, diseñados para unirse específicamente a su miRNA diana e inhibir las moléculas de miRNA endógenas.

Las transfecciones se llevaron a cabo en placas de 24 pocillos (BD Falcon), con una densidad celular en un rango entre 100.00-200.000 células/500 µl de volumen final.

A continuación se detallan las condiciones de transfección optimizadas para cada línea celular de BTSCs derivadas de tumor transfectada en el presente trabajo:

- GN1C: - 100.000 células/pocillo de 24
 - 2:1 (*Nanojuice core reagent : booster reagent*)
- G52: - 200.000 células/pocillo de 24
 - 1:1 (*Nanojuice core reagent : booster reagent*)
- G63: - 100.000 células/pocillo de 24
 - 1:1 (*Nanojuice core reagent : booster reagent*)

En todos los casos, la concentración final de los pre-miR y anti-miR en las transfecciones fue de 100 nM. En la tabla M.5 y M.6 expuestas a continuación se detallan los precursores (pre-miRs) e inhibidores (anti-miRs) de miRNAs utilizados, respectivamente.

pre-miR precursor de miRNA	Part number (P/N)	ID
pre-miR negative control #1	AM17110	-
hsa-miR-21	AM17100	PM10206
hsa-miR-31	AM17100	PM11465
hsa-miR-29a	AM17100	PM12499
hsa-miR-29b	AM17100	PM10103
hsa-miR-221	AM17100	PM10337
hsa-miR-222	AM17100	PM11376

Tabla M.5 Precursores de miRNAs (pre-miRs, AB) utilizados en los ensayos de transfección de BTSCs.

anti-miR inhibidor de miRNA	Part number (P/N)	ID
anti-miR negative control #1	AM17010	-
hsa-miR-21	AM17000	AM10206
hsa-miR-31	AM17000	AM11465
hsa-miR-29a	AM17000	AM12499
hsa-miR-29b	AM17000	AM10103
hsa-miR-221	AM17000	AM10337
hsa-miR-222	AM17000	AM11376

Tabla M.6 Inhibidores de miRNAs (anti-miRs, AB) utilizados en los ensayos de transfección de BTSCs.

M.10. Estudios de viabilidad celular (MTS)

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron utilizando el *Cell-Titer 96 One Solution Aqueous kit* (Promega, Fitchburg, WI, USA), basado en la metabolización del MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] a formazán por parte de las células vivas. Para ello, las células se recogieron 24 horas después de haber sido transfectadas y se sembraron en placa de 96 pocillos (BD Falcon) a una concentración de $5-10 \times 10^3$ células (dependiendo de la línea de BTSCs) en 200 μ l de medio de cultivo. Tras 72 horas, se añadieron 20 μ l del reactivo MTS por pocillo y se incubaron las células entre 1-4 horas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂, hasta alcanzar el rango lineal en la reacción. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm, en un espectrofotómetro Sunrise Promote (Tecan Group Ltd., Hombrechtikon, Suiza), empleando el programa Magellan. El cálculo de las medias y la desviación estándar (DE) se realizó mediante Excel. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada condición (3 pocillos de 96, triplicado técnico) y se analizó la significación estadística de los resultados tras 3 experimentos de transfección independientes (triplicado biológico) utilizando el programa SPSS 15.0.

M.11. Estudios de muerte celular

La muerte celular de las BTSCs transfectadas se cuantificó mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) tras su marcaje con Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BD Biosciences). La tinción con Anexina V-FITC marca la fosfatidil-serina celular que se externaliza en la membrana plasmática de las células en apoptosis. La tinción combinada de Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) permite distinguir por citometría las células vivas (negativas para ambos marcajes), células en apoptosis temprana (se marcan con Anexina V pero son negativas para IP), aquellas en apoptosis tardía (positivas para ambos marcajes) y las células muertas por procesos diferentes al de apoptosis (positivas para IP y negativas para Anexina V). El análisis del número de células en apoptosis se realizó por triplicado 96 horas después de la transfección y se analizó con el programa CellQuest Pro. Para el estudio estadístico de los resultados se empleó el programa SPSS 15.0. Además, la determinación de la proteína PARP activa se evaluó mediante la técnica de *Western blot* que se detalla a continuación.

M.12. Técnica de Western Blot (WB)

Para la realización de la técnica de *Western blot*, se recogieron $2-10 \times 10^6$ células en cultivo mediante centrifugación (5 minutos a 500 r.c.f.) y se lavaron dos veces con PBS (Gibco). El precipitado celular se resuspendió en 100-200 μ l de tampón de lisis (PBS, 1% Tritón X-100, Dithiotreitol 1 mM, inhibidores de proteasas 1X (Roche Diagnostics) y se incubó durante 30 minutos a 4°C. Tras centrifugar a 16.000 r.c.f. durante 10 minutos, la proteína soluble se cuantificó mediante el método *BCA Protein Assay* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA) según las instrucciones del fabricante, utilizando la albúmina sérica bovina (BSA) para realizar la curva patrón. Las proteínas

se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por el método de Laemmli (Laemmli *et al.*, 1970) utilizando el sistema *Mini-Protean III* (Bio-Rad) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa utilizando el dispositivo *Mini-Trans-blot* de transferencia (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA). El inmunorevelado se llevó a cabo en cuatro etapas, realizando entre cada una de ellas tres lavados de 10 minutos cada uno con tampón TBST (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM y 0,1% Tween 20). Primero, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante incubación de la membrana de nitrocelulosa (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) durante 2 horas a temperatura ambiente con tampón de bloqueo (TBST, 5% leche desnatada *Sveltesse*, Nestlé, Vevey, Suiza). Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla M.7) diluido en tampón de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo secundario apropiado (Tabla M.8) diluido 1:10.000 en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, la visualización de las bandas se realizó mediante quimioluminiscencia (*Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate*, Roche Diagnostics). Como control de carga se utilizó la detección de actina con un anticuerpo específico (Calbiochem, San Diego, CA, USA), como se indica en la tabla M.7 a continuación.

Anticuerpo primario	Especie	Casa comercial	Referencia	Dilución
MCL1 (humano)	Conejo	Assays Designs (Stressgen) (Ann Arbor, Michigan, USA)	AAP-240	1:1000
ACTINA (Ab-1)	Ratón	Calbiochem (San Diego, CA, USA)	CP01	1:5000
PARP	Conejo	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)	9542	1:1000

Tabla M.7 Anticuerpos primarios usados en la técnica de WB.

Anticuerpo secundario	Especie	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-IgG de ratón-HRP	Cabra	Promega (Madison, WI, USA)	W4011	1:10000
Anti-IgG de conejo-HRP	Cabra	Promega (Madison, WI, USA)	W4021	1:10000

Tabla M.8 Anticuerpos secundarios usados en la técnica de WB. (HRP, *Horseradish peroxidase*)

M.13. Estudio de expresión génica mediante microarrays de expresión

Para este estudio se utilizaron 4 líneas de BTSCs derivadas de pacientes de GBM, tres de ellas previamente usadas en los estudios de microarray de miRNAs: G52, G59 y G63; y una adicional denominada G48, todas ellas derivadas en el mismo laboratorio con las mismas condiciones. El RNA total de las células BTSCs en estadio

de neuroesfera y diferenciadas durante 4 días se extrajo utilizando el kit *RNeasy mini kit* (Qiagen), se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific) y se evaluó con el kit de RNA 6000 Nano LabChip y con el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Los RNAs se transformaron en RNA complementario (cRNA) marcado con biotina y se hibridaron en el microarray de expresión génica *Human Genome U133 Plus 2.0 array* (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), que contiene alrededor de 54000 sondas que detectan la expresión de aproximadamente 38500 genes. Los microarrays se revelaron con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina y se visualizaron y cuantificaron con el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Inc).

M.13.1. Análisis bioinformático del microarray de expresión

La normalización se llevó a cabo utilizando el algoritmo *Robust Multichip Average* (RMA) que realiza la corrección del ruido de fondo, la normalización basada en cuantiles y la transformación logarítmica en base 2, dando como resultado valores entre 0 y 16. La selección de los genes diferencialmente expresados entre las células progenitoras y las células diferenciadas se llevó a cabo con un criterio basado en el valor de cambio de múltiplo (*fold-change*, FC). Se consideraron cambios de expresión significativos los de las sondas que presentaban un logFC mayor de 1 o menor que -1 en al menos 2 de las 4 muestras de pacientes, y que en el resto de muestras presentaban logFC del mismo signo, indicando la misma tendencia de expresión. Posteriormente se analizaron los datos obtenidos con el programa bioinformático *IPA 9.0* (*Ingenuity Systems*) con el fin de dilucidar las rutas de genes, funciones biológicas y rutas canónicas más alteradas en nuestros datos; así como las moléculas con mayor sobreexpresión e inhibición en las muestras.

M.14. Análisis combinatorio del microarray de miRNAs junto con el microarray de expresión

Una vez obtenidas las listas de genes sobre e infra-expresados en el microarray de expresión y las listas de miRNAs sobre e infra-expresados en el microarray de microRNAs, se procedió a la combinación de ambos resultados en un estudio bioinformático, para intentar de esta forma elucidar las rutas moleculares en las que están implicados los miRNAs diferencialmente expresados.

En primer lugar se realizó un análisis bioinformático de los genes diana potencialmente regulados por los miRNAs en estudio, a partir de los genes diferencialmente expresados en el microarray de expresión. Este estudio se realizó utilizando las bases de datos de predicción de dianas: TargetScan versión 5.1, PicTar, PITA versión 6, miRanda versión sept2008 y microCosm versión 5.

En segundo lugar, teniendo en cuenta que la función de los miRNAs es de inhibición de la expresión génica, se generaron dos listas de genes combinando selectivamente en una de ellas los genes sobre-regulados con los miRNAs infra-expresados y viceversa en la otra lista. Se generaron representaciones gráficas ordenadas de estas dos listas mediante *clustering* jerárquico utilizando los programas *Cluster 2.11* y *Treeview 1.60* (Eisen *et al.*, 1998).

En tercer lugar, se combinaron estas dos listas para generar una única lista, que se analizó mediante el programa *IPA 9.0* (Ingenuity Systems) con el fin de dilucidar las rutas de genes, funciones biológicas y rutas canónicas más alteradas en nuestros datos; así como las moléculas con mayor sobreexpresión e inhibición en las muestras.

M.15. Análisis estadístico

Para el estudio de la significación estadística de los resultados de este trabajo, excepto para los análisis de microarrays, se utilizó el programa SPSS 15.0. Debido al pequeño tamaño muestral en muchos de los experimentos, que imposibilita la aplicación de un *test* de normalidad, utilizamos estadística no paramétrica: el *test* de U de Mann-Whitney o el *test* de Kruskal-Wallis para las comparaciones de dos o más muestras, respectivamente.

RESULTADOS

R.1. Obtención de BTSCs a partir de muestras quirúrgicas de GBM

Con el fin de conseguir BTSCs se procesaron especímenes quirúrgicos de pacientes de GBM mediante su disgregación y posterior cultivo *in vitro* en forma de neuroesferas.

R.1.1. Derivación de los cultivos *in vitro* de neuroesferas a partir de las muestras quirúrgicas de GBM

El trabajo de esta tesis comenzó con la derivación de los cultivos *in vitro* de neuroesferas a partir de muestras quirúrgicas de tumor primarias de pacientes de GBM. Los pacientes de GBM procedían de los Servicios de Neurocirugía del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) en Santander, y de la Clínica Universidad de Navarra (CUN) en Pamplona. El proceso de derivación de dichas muestras se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de Genética Molecular dirigido por el Dr. José Luis Fernández Luna del HUMV, siguiendo el protocolo descrito en la sección M.1. Para este trabajo se han utilizado 5 líneas de neuroesferas derivadas de pacientes de GBM, denominadas G52, G59, G63, G97C y GN1C. Dentro del apartado R.2 se muestran imágenes de los cultivos de las 5 líneas de neuroesferas en medio de proliferación, en la columna denominada NE (neuroesferas) de la figura R.9.

R.1.2. Análisis de la capacidad de autorrenovación de los cultivos de neuroesferas

Uno de los requisitos que definen a las BTSCs es la capacidad de autorrenovación. Por ello, una vez obtenidas las 5 líneas de neuroesferas a partir de las muestras de los pacientes de GBM, se estudió su capacidad de autorrenovación por medio de dos aproximaciones experimentales diferentes.

R.1.2.1. Ensayo de dilución clonal

El ensayo de dilución clonal estudia la capacidad de autorrenovación cuantificando la formación de neuroesferas secundarias a partir de una única célula proveniente de la disociación de las neuroesferas primarias. En la figura R.1 se muestra este ensayo llevado a cabo en las líneas de neuroesferas GN1C, G52, G63 y la línea celular de GBM U87MG utilizada como control negativo. Las líneas GN1C y G52 presentaron una alta capacidad de autorrenovación, con porcentajes de 84,4% y 88,9% de pocillos con neuroesferas secundarias, respectivamente. Habitualmente las BTSCs presentes en las neuroesferas suelen presentar valores de autorrenovación de en torno al 80% (Galli *et al.*, 2004), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en estas dos líneas. La línea G63 presentó una capacidad de autorrenovación relativamente baja, del 32,3%, pero superior a la del control negativo de la línea celular U87MG cultivada en medio de proliferación de neuroesferas (8,3%). Este hecho corresponde a lo que está descrito en la literatura sobre los cultivos de las líneas celulares de GBM, que presentan células con características de BTSCs en un bajo porcentaje (Alonso *et al.*, 2011).

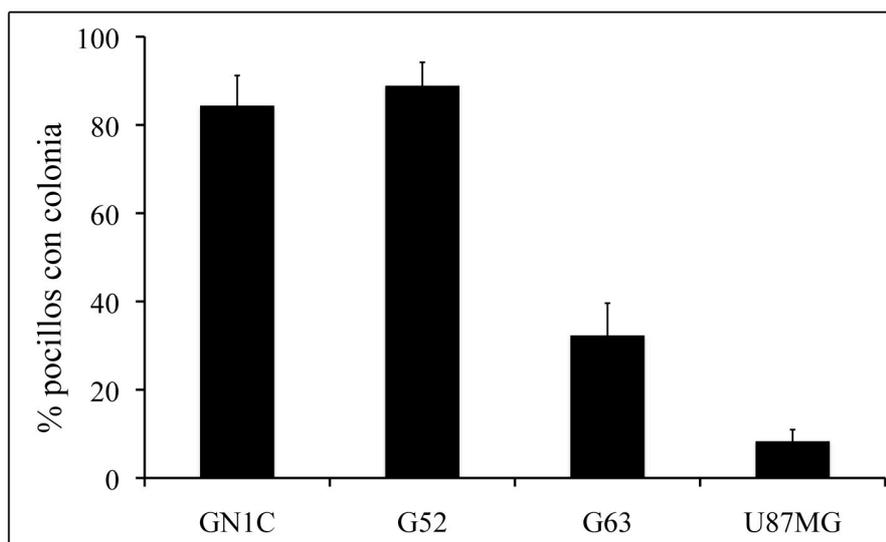


Figura R.1 Estudio de la capacidad de autorrenovación de las neuroesferas derivadas de pacientes con GBM mediante ensayo por dilución clonal. Media del porcentaje de pocillos de cada placa con una o más colonias de neuroesferas tras 10 días de cultivo en dilución clonal (se siembran 3 placas de 96 pocillos a una dilución teórica de 1 célula por pocillo). Se muestran 3 líneas de neuroesferas derivadas de pacientes con GBM (GN1C, G52 y G63) y la línea celular de GBM U87MG, utilizada como control negativo.

R.1.2.2. Cuantificación mediante ensayo de dilución límite

Una vez analizado el porcentaje de autorrenovación de las BTSCs, se procedió a cuantificar el número de células necesarias para generar una neuroesfera secundaria mediante el ensayo de dilución límite. La figura R.2 muestra los resultados del ensayo de dilución límite en las líneas de neuroesferas G63, GN1C y G52, así como la línea celular de GBM U87MG, usada como control negativo. Las líneas de neuroesferas G52 y GN1C necesitaban únicamente una media de 6,2 y 5,4 células de la neuroesfera primaria para crear una neuroesfera secundaria, respectivamente, lo que concuerda con su alta capacidad de autorrenovación demostrada en el ensayo de dilución clonal. La línea de neuroesferas G63 necesitaba una media de 11,4 células de la neuroesfera primaria para generar una neuroesfera secundaria, lo que posiblemente es debido a su baja capacidad de autorrenovación mostrada en el ensayo de dilución clonal. El control

negativo de la línea celular de GBM U87MG necesitaba aproximadamente 4 veces más células para formar una neuroesfera secundaria que las líneas de neuroesferas G52 y GN1C, con alta capacidad de autorrenovación.

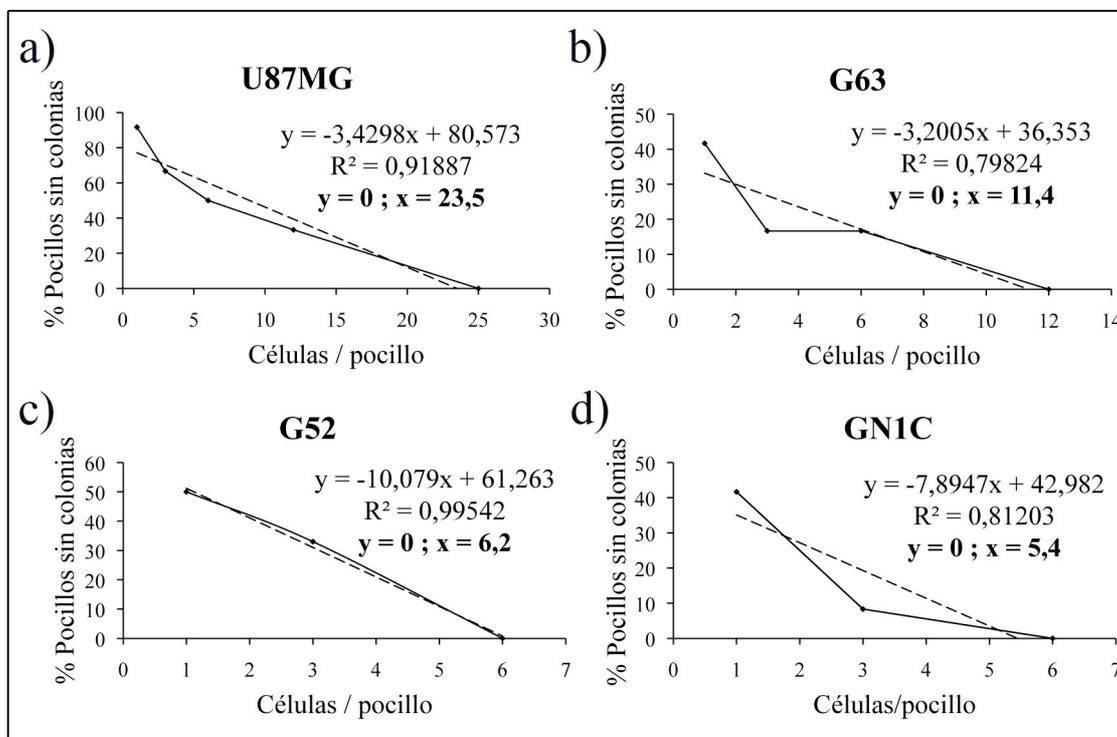


Figura R.2 Cuantificación de la capacidad de autorrenovación de las neuroesferas derivadas de pacientes con GBM mediante ensayo por dilución límite. Estudio del número de células necesario para formar una neuroesfera mediante ensayo por dilución límite, en 3 líneas de neuroesferas derivadas de pacientes con GBM (G63, GN1C y G52) y la línea celular de GBM U87MG, utilizada como control negativo.

R.1.3. Análisis de la tumorigenicidad *in vivo* de las BTSCs obtenidas

Otra de las características principales de las BTSCs es la capacidad de generar tumores al ser inyectadas intracranalmente en ratones inmunodeficientes. Antes de comenzar los experimentos de inyección de BTSCs, pusimos a punto el modelo de xenotransplante murino mediante inyección intracranial estereotáctica con líneas celulares de GBM.

R.1.3.1. Puesta a punto del modelo de xenotransplante murino intracraneal mediante inyección estereotáctica con líneas celulares de GBM

Se utilizaron dos líneas celulares de GBM históricamente utilizadas para xenotransplante intracraneal murino, U87MG y U251MG. Estas dos líneas se transdujeron retroviralmente con un vector triple reportero denominado SFG-nesTGL, que permite detectar la presencia de las células *in vitro* mediante la expresión de GFP e *in vivo* mediante bioluminiscencia, y se aislaron clones celulares con expresión de GFP. Se ajustó el número de células y las coordenadas dentro de la región del *caudate putamen* (estriado) del cerebro murino adecuadas para la obtención de tumores. Asimismo se realizó una comparativa de dos cepas diferentes de ratón inmunodeficiente para comprobar cuál de ellas presentaba una mayor capacidad de injerto de las células y posterior desarrollo de tumores.

La implantación intracraneal de las células U87MG-TGL y U251MG-TGL se llevó a cabo tal y como está descrito en el apartado M.3.2.6. Tres semanas después de la implantación se realizaron luminometrías de los ratones inyectados para comprobar la presencia de masa tumoral en el cerebro. Mediante esta técnica de imagen se observó que las células de ambas líneas celulares de GBM eran capaces de generar tumores tanto en los ratones $RAG2^{-}/\gamma c^{-}$ como en los *nu/nu*, tal y como se muestra en las figuras R.3 y R.4. En el caso de la línea U87MG-TGL los 4 ratones $RAG2^{-}/\gamma c^{-}$ inyectados presentaban señal de masa celular en la luminometría, con valores que llegaban a los 120.000 p/sec/cm²/sr (Figura R.3.a). En cambio sólo 3 de los 4 ratones *nu/nu* inyectados con la misma línea celular exhibían señal de bioluminiscencia. Además sus valores de intensidad lumínica eran inferiores, llegando a un máximo de 30.000 p/sec/cm²/sr (Figura R.3.b).

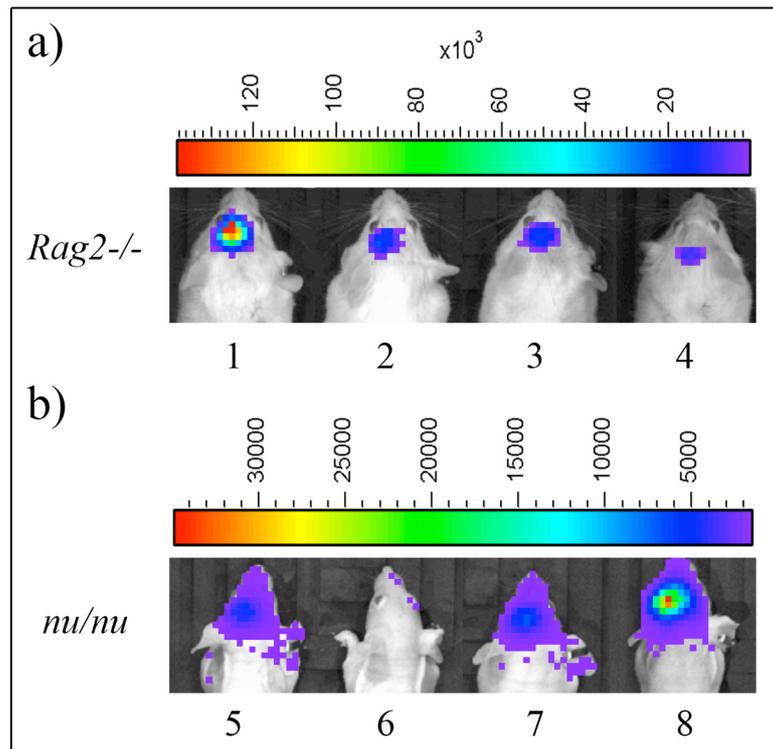


Figura R.3 Luminometría de los ratones inyectados con un clon seleccionado de la línea celular de GBM U87MG-TGL transducida con el vector reportero SFG-nesTGL para la puesta a punto del modelo de xenotransplante murino con estereotaxia. Luminometría tomada 21 después de la inyección estereotáctica de un clon de la línea celular de GBM transducida retroviralmente con el vector triple reportero en los ratones **a)** *Rag2*^{-/-} y **b)** *nu/nu* tras la administración de luciferina por vía i.p. Ambas imágenes se tomaron con un tiempo de exposición de 5 minutos con alta sensibilidad, en el sistema *Ivis*. Las unidades de intensidad lumínica en las barras de cuantificación son p/sec/cm²/sr.

Se observaron resultados similares tras la inyección de la línea celular U251MG-TGL en ambas cepas de ratones. Los ratones *RAG2*^{-/-}/*γc*^{-/-} mostraban unos valores máximos de intensidad lumínica de 6×10^6 p/sec/cm²/sr (Figura R.4.a). Por el contrario, los ratones *nu/nu* solamente alcanzaban los 120.000 p/sec/cm²/sr (Figura R.4.b).

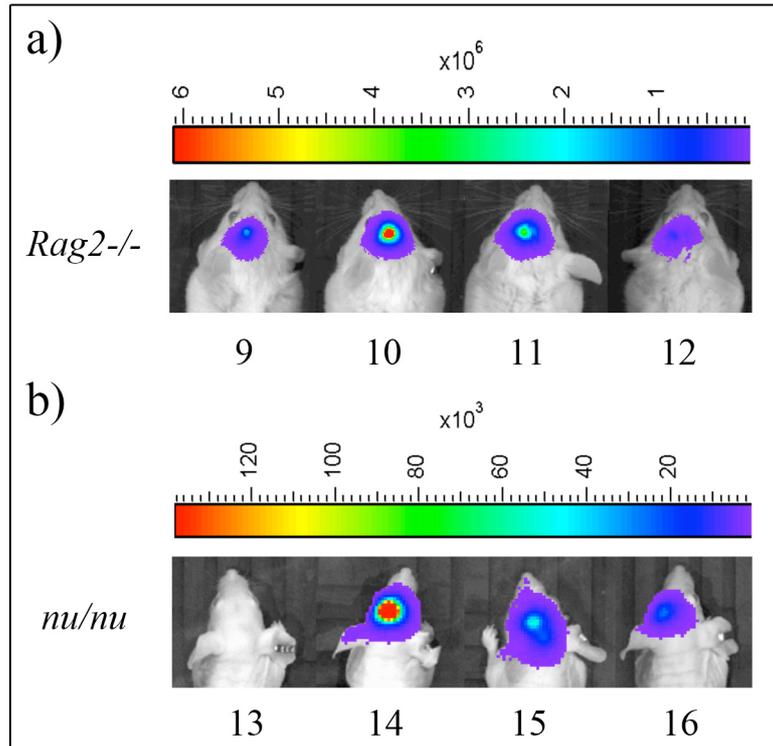


Figura R.4 Luminometría de los ratones inyectados con un clon de la línea celular de GBM U251MG-TGL transducida con el vector reportero SFG-nesTGL para la puesta a punto del modelo de xenotransplante murino con estereotaxia. Luminometría tomada 21 después de la inyección estereotáctica de un clon de la línea celular de GBM transducida retroviralmente con el vector triple reportero en los ratones **a)** $Rag2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ y **b)** nu/nu tras la administración de luciferina por vía i.p. Tiempo de exposición en el sistema *Ivis*: **a)** un minuto con baja sensibilidad, **b)** un minuto con sensibilidad media. Las unidades de intensidad lumínica en las barras de cuantificación son $p/sec/cm^2/sr$.

Como se observaron mejores resultados en la cepa de ratones $RAG2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$, el resto de los estudios se llevaron a cabo en esta cepa murina. Con el fin de confirmar la presencia tumoral, se llevó a cabo un estudio de microPET con el radiotrazador ^{11}C -Metionina a las 5 semanas de implantación. En la figura R.5 se observan las imágenes de microPET de ejemplos representativos de ratones $RAG2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ inyectados con las líneas celulares U87MG-TGL y U251MG-TGL, ambas con valores máximos de captación estandarizada (SUV_{max}) de ^{11}C -Metionina próximos a 0,60. Esta observación confirmaba la presencia de tumores en los ratones $RAG2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ implantados con ambas líneas celulares.

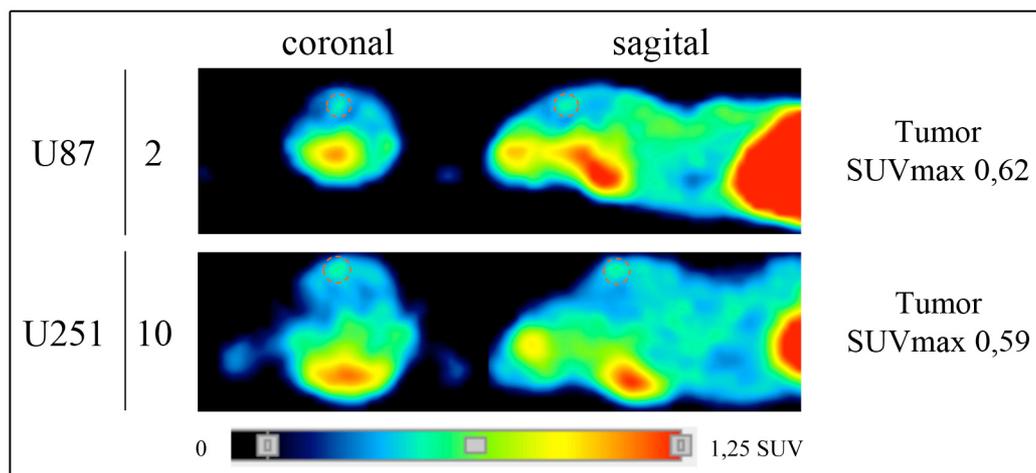


Figura R.5 Imágenes de microPET de dos de los ratones inyectados intracranealmente con las líneas celulares de GBM U87MG-TGL y U251MG-TGL, transducidas con el vector reportero triple, para la puesta a punto del modelo de xenotransplante murino con estereotaxia. Las imágenes de microPET, utilizando el radiotrazador ^{11}C -Metionina, se tomaron 5 semanas después de la implantación intracraneal de las células, tras la comprobación de presencia de masa celular mediante bioluminiscencia a las 3 semanas de implantación. Los círculos punteados indican la región de interés (ROI) donde se encuentra el tumor cerebral. A la derecha de cada imagen se presenta la cuantificación de la captación de ^{11}C -Metionina por parte del tumor, mediante el valor máximo de captación estandarizada (SUVmax). Los números de la izquierda identifican el ratón correspondiente.

Los ratones $\text{RAG2}^{-/-}/\gamma\text{C}^{-/-}$ inyectados con ambas líneas celulares comenzaron a presentar signos de enfermedad (dificultades motoras, debilidad, arqueamiento de la columna vertebral, cambio en el aspecto del pelo) alrededor de las 6 semanas después de la implantación intracraneal de las células, y fueron sacrificados mediante perfusión intracardiaca con PFA al 4%. Los cerebros fueron post-fijados, y procesados para obtener cortes seriados a nivel del estriado. Dichos cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) para observar su morfología celular y tisular (Ver M.3.2.9). Los ratones $\text{RAG2}^{-/-}/\gamma\text{C}^{-/-}$ presentaban tumores intraparenquimales a nivel del estriado que ocupaban totalmente esta región y aumentaban notablemente su tamaño, colapsando incluso el ventrículo lateral (Figura R.6.a).

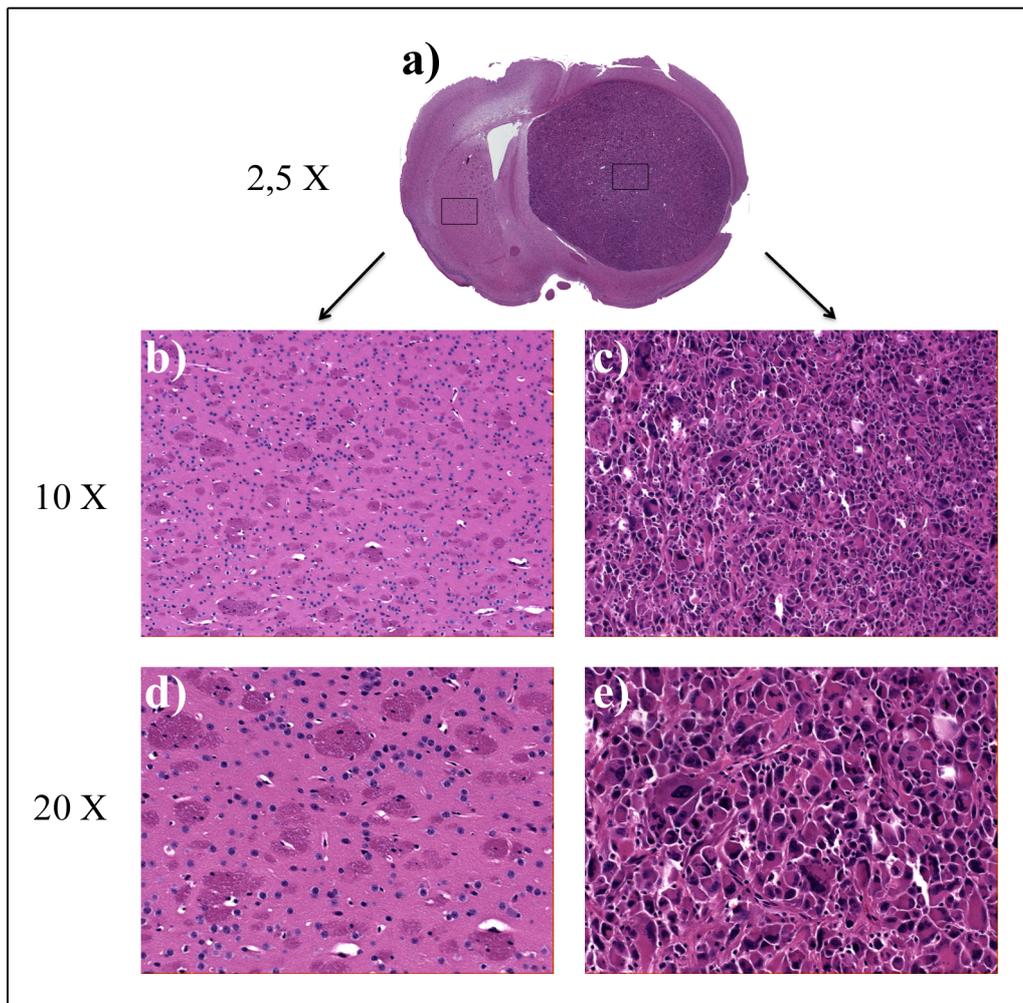


Figura R.6 Imágenes de tinción de hematoxilina-eosina del cerebro de un ratón $RAG2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ (nº 2 en las figuras R.3 y R.5) inyectado con el clon seleccionado de la línea U87MG-TGL para la puesta a punto del modelo murino de inyección intracraneal estereotáctica. a) Corte coronal del cerebro a nivel del cuerpo estriado, teñido con H-E, en el que se observa todo el hemisferio izquierdo invadido por las células tumorales con una tinción basófila más intensa, respecto al control de estriado normal presente en el hemisferio derecho. Imagen tomada con una magnificación de 2,5X. Detalles del estriado normal del hemisferio derecho y de la masa tumoral en el hemisferio izquierdo con una magnificación de 10X (b y c) y 20X (d y e).

R.1.3.2. Inyección intracraneal de las líneas de BTSCs derivadas de muestras de pacientes de GBM

Una vez puesto a punto el modelo murino de xenotransplante mediante inyección intracraneal estereotáctica, se procedió a la inyección de las BTSCs derivadas mediante cultivos de neuroesferas a partir de muestras quirúrgicas de pacientes de GBM, para comprobar su capacidad tumorigénica *in vivo*.

Se llevó a cabo el mismo proceso que para las líneas celulares de GBM. Las BTSCs se transdujeron retroviralmente con el vector triple reportero SFG-*nesTGL*, para poder detectarlas mediante diferentes técnicas de imagen *in vitro* e *in vivo*, y se seleccionaron *in vitro* clones positivos para GFP. Posteriormente, se inyectaron las líneas derivadas de BTSCs en ratones $RAG2^{-/-}/\gamma c^{-/-}$ siguiendo las pautas del modelo puesto a punto con las líneas celulares de GBM. Todas las líneas de BTSCs dieron lugar a injertos visibles mediante luminometría en el cerebro de los ratones. Las luminometrías de los ratones inyectados con las líneas de BTSCs G52, G63 y G97C exhibían valores máximos de intensidad lumínica de 2×10^6 p/sec/cm²/sr (Figura R.7.a). Se confirmó la presencia tumoral mediante microPET con el radiotrazador ¹¹C-Metionina en estos ratones, que presentaban valores de captación máxima estandarizada (SUV_{max}) de alrededor de 0,60 (Figura R.7.b).

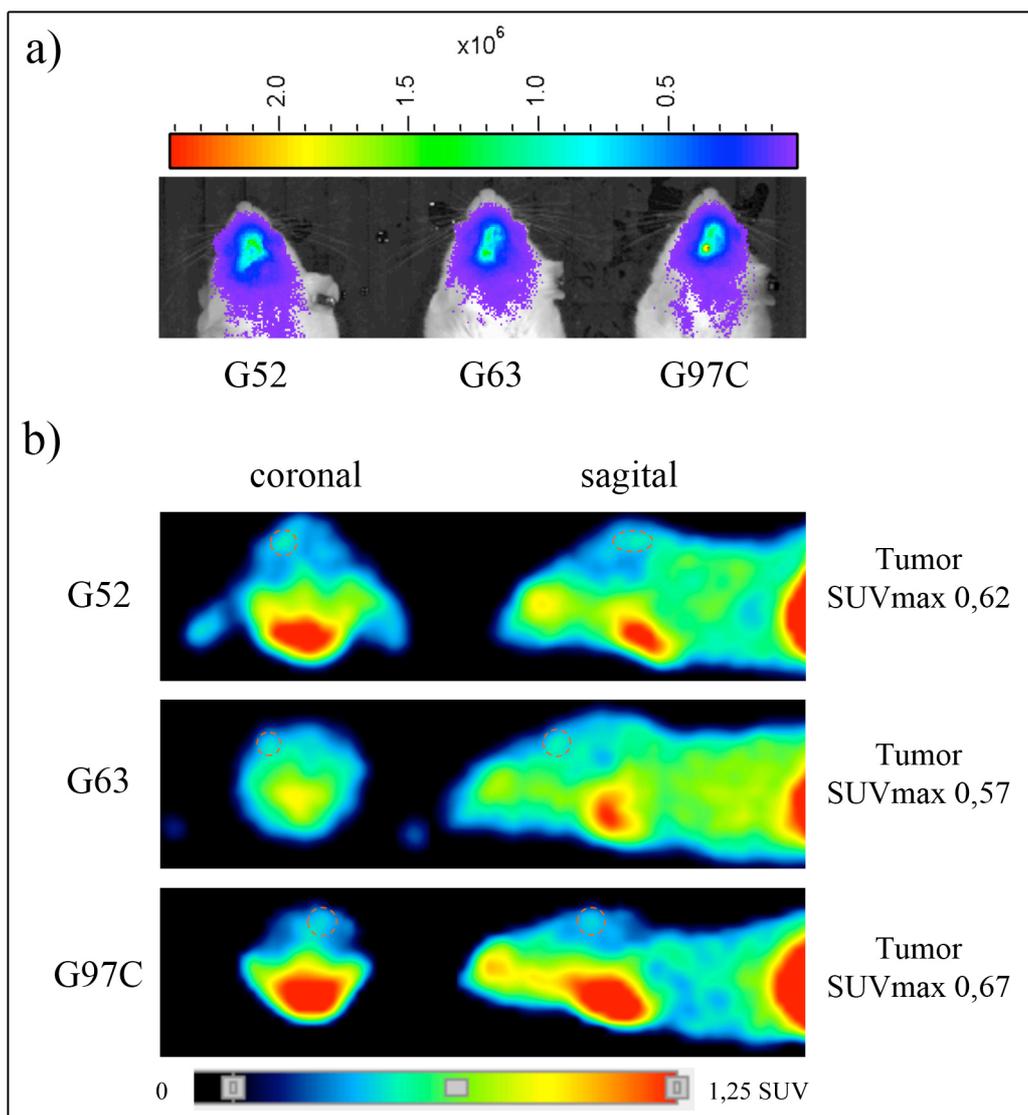


Figura R.7 Imágenes de ratones inyectados intracranalmente con un clon seleccionado de cada línea de BTSCs transducida con el vector reportero SFG-nesTGL, G52-TGL, G63-TGL y G97C-TGL, para comprobar su tumorigenicidad *in vivo* mediante luminometría y microPET. **a)** Luminometría tomada 2 meses después de la inyección estereotáctica en los ratones RAG2^{-/-}/γc^{-/-} tras la administración de luciferina por vía i.p. La imagen se tomó con un tiempo de exposición de 1 minuto con baja sensibilidad, en el sistema *Ivis*. Las unidades de intensidad lumínica en la barra de cuantificación son p/sec/cm²/sr. **b)** Imágenes de microPET de los mismos animales utilizando el radiotrazador ¹¹C-Metionina, tomadas a los 2,5 meses de la implantación intracranial de las células. Los círculos punteados indican la región de interés (ROI) donde se encuentra el tumor cerebral. A la derecha de cada imagen se presenta la cuantificación de la captación de ¹¹C-Metionina por parte del tumor, mediante el valor máximo de captación estandarizada (SUVmax).

A continuación se muestran imágenes de tinción de H-E representativas obtenidas tras la perfusión y extracción de los cerebros de los ratones RAG2^{-/-}/γc^{-/-} (Ver

M.3.2.9) inyectados con las líneas de BTSCs derivadas en este estudio (Figura R.8). Los ratones presentaban masas tumorales intraparenquimales de características similares a las observadas en los tumores generados con las líneas celulares de GBM (Figura R.6.c).

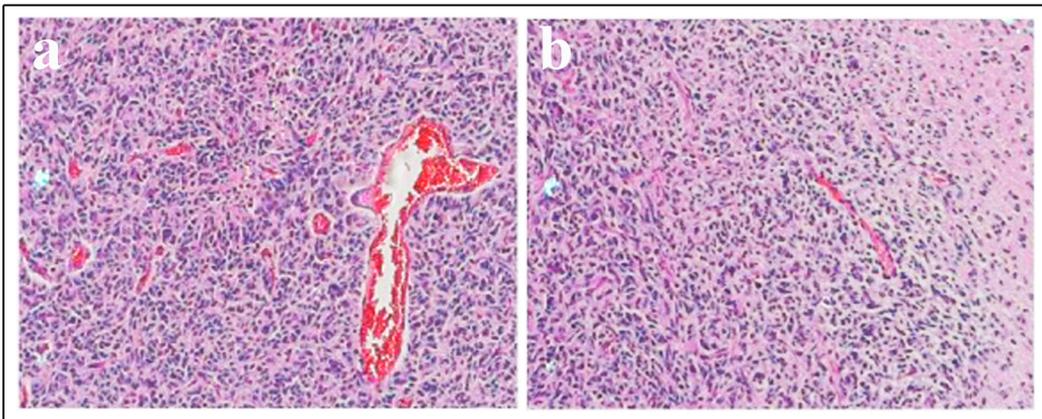


Figura R.8 Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) de los tumores intracraneales generados en el modelo de xenotransplante estereotáctico, tras la inyección de las líneas de BTSCs derivadas en este estudio. Cortes coronales del cerebro de 2 ratones representativos a nivel del cuerpo estriado, teñidos con H-E (a y b). Imágenes tomadas con una magnificación de 10X.

R.2. Desarrollo del modelo de diferenciación de las BTSCs obtenidas

En los apartados anteriores se ha demostrado que las células obtenidas a partir de las muestras quirúrgicas de pacientes de GBM como cultivos de neuroesferas *in vitro* poseen dos de las características primordiales de las BTSCs: capacidad de autorrenovación y de tumorigénesis. El último requisito para comprobar que estas células presentaban todas las características de BTSCs consiste en analizar su capacidad de diferenciación a los principales linajes de células maduras presentes en el SNC adulto. El estudio de diferenciación *in vitro* se llevó a cabo cambiando el medio de cultivo de proliferación (MC) por medio de diferenciación (MD), previa disgregación

enzimática de las neuroesferas, tal y como está descrito en el apartado M.1. Este cambio de medio de cultivo induce que las células, al diferenciarse, dejen de formar agregados esféricos en suspensión y se adhieran al sustrato, adquiriendo prolongaciones celulares que recuerdan a la morfología de las neuronas y astrocitos en estadios tempranos de maduración. Se observó la morfología celular a los 4 y 14 días de cultivo en medio de diferenciación para comprobar si había cambios entre la diferenciación temprana (4 días) y una diferenciación más tardía (14 días). Cuatro de las 5 líneas de BTSCs derivadas de pacientes de GBM (G52, G63, G97C y GN1C) mostraron adhesión al sustrato y desarrollaron prolongaciones citoplasmáticas características (Figura R.9), tanto a los 4 como a los 14 días de diferenciación. Sin embargo, la línea G59 siguió manteniendo la morfología de neuroesferas en suspensión incluso tras 14 días de cultivo en el medio de diferenciación (Figura R.9). Este hecho sugiere que esta línea puede tener algún tipo de alteración genética o funcional que le impide adquirir los cambios morfológicos propios del proceso de diferenciación usando nuestro sistema.

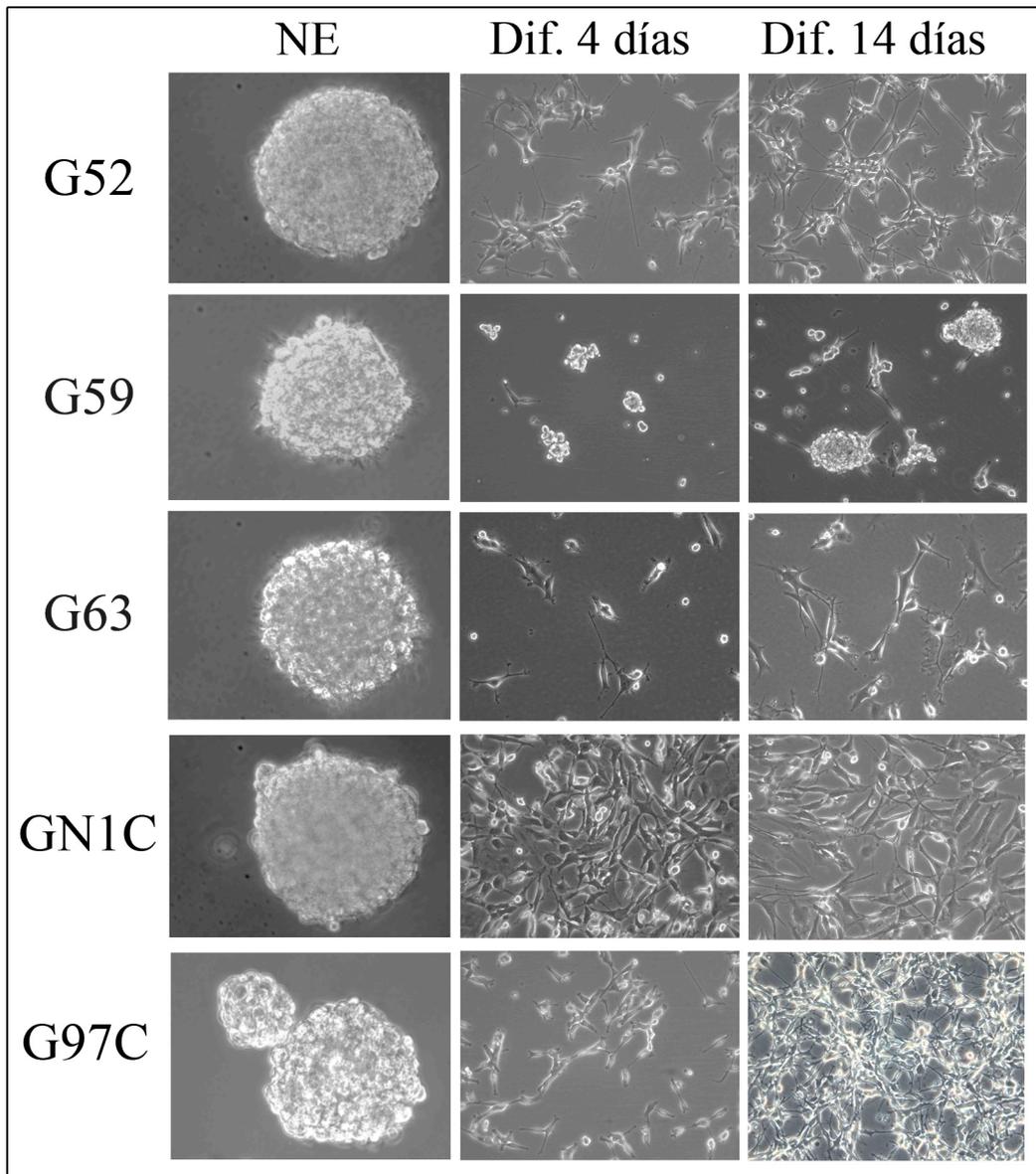


Figura R.9 Imágenes de las diferentes líneas de BTSCs derivadas de pacientes con GBM, antes y durante la diferenciación *in vitro*: en medio de proliferación (NE) y en medio de diferenciación durante 4 y 14 días (Dif. 4 días y Dif. 14 días). La diferenciación se observa como un cambio morfológico en el que las células dejan de formar neuroesferas, se adhieren al frasco de cultivo y adquieren prolongaciones citoplasmáticas. Todas las imágenes están tomadas en un microscopio óptico invertido con un aumento de 20X.

R.2.1. Selección de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado

Para caracterizar molecularmente el proceso de diferenciación *in vitro* de cada línea de BTSCs, se procedió al análisis del cambio de expresión de marcadores propios del estado indiferenciado y de marcadores característicos del estado diferenciado de los principales linajes neurales: astrocitos, neuronas y oligodendrocitos.

R.2.1.1. Estudio de expresión de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado a nivel de RNA mensajero en muestras control

Antes de comenzar a analizar la diferenciación de las líneas de BTSCs incluidas en este trabajo, se procedió a seleccionar los marcadores más adecuados estudiando su expresión a nivel de RNA mensajero en muestras control. Como muestra de BTSCs indiferenciadas se utilizó la línea de neuroesferas GN11, previamente validada como BTSCs y amablemente cedida por la Dra. Marta Alonso. Como células diferenciadas, se usaron muestras de RNA comercial de controles fisiológicos normales de cerebro humano adulto: astrocitos, neuronas y microglía (debido a que no disponíamos de RNA comercial de oligodendrocitos, y GALC, la molécula marcadora de oligodendrocitos, es expresada por la microglía también (Lee *et al.*, 2007)).

Los marcadores de estado indiferenciado analizados a nivel de mRNA fueron Nestina (*NES*, ver I.3.6.2), Vimentina (*VIM*, ver I.3.7.5), *BMI1* (ver I.3.7.1) y *SOX2* (ver I.3.7.2). La expresión de Nestina fue elevada en las células indiferenciadas, se encontró disminuída aproximadamente a la mitad en astrocitos y neuronas, y fue prácticamente nula en la microglía (Figura R.10.a). La expresión de Vimentina exhibió el mismo patrón (Figura R.10.b), mientras que la expresión de *BMI1* fue mayor en la muestra de

neuronas que en el resto de muestras, incluida la muestra de neuroesferas, contrario a lo que cabía esperar (Figura R.10.c). Sin embargo, este hecho puede deberse a que los niveles de expresión relativa a *GAPDH* de *BMI1* en todas las muestras fueron muy bajos (máximo de 0,1 en neuronas), por lo que las variaciones observadas apenas suponen un cambio en la expresión de este gen, muy baja en todos los casos. La expresión de mRNA de *SOX2* relativa a *GAPDH* fue similar en la neuroesfera GN11 y los astrocitos, en torno a 4; decreció levemente en las neuronas y drásticamente en la microglía (Figura R.10.d). En base a los resultados, se seleccionaron inicialmente los dos marcadores de BTSCs más expresados en la neuroesfera y menos expresados en las células diferenciadas, es decir, genes que codifican Nestina y Vimentina, ambos con un patrón de expresión similar. Teniendo en cuenta que Nestina es un marcador antigénico muy comúnmente utilizado para detectar BTSCs mediante inmunofluorescencia, se decidió elegir la expresión del gen de esta proteína como marcador del estado indiferenciado.

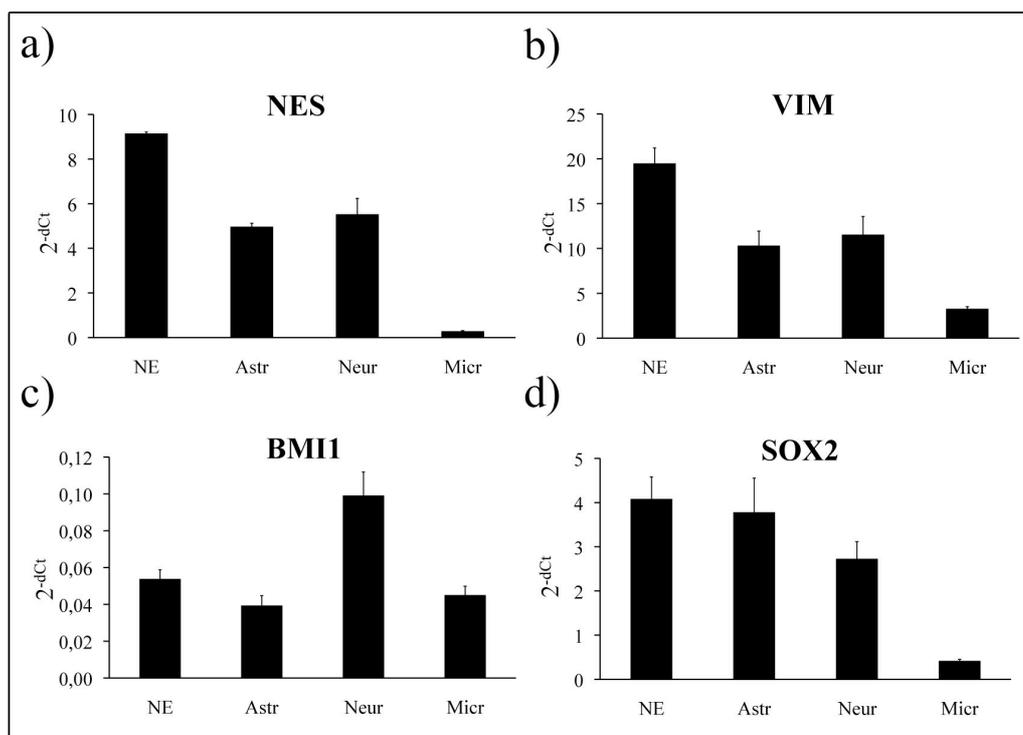


Figura R.10 Expresión de los marcadores de BTSCs en muestras control. Expresión, medida

mediante RT-PCR cuantitativa y normalizada con respecto al control endógeno *GAPDH*, de los diferentes marcadores de NSCs y BTSCs en controles fisiológicos de RNA comercial humano: astrocitos (Astr), neuronas (Neur) y microglía (Micr), en comparación con una muestra de neuroesferas (NE) validada y publicada previamente en otros estudios (GN11, amablemente cedida por la Dra. Marta Alonso). **a)** Nestina (*NES*), **b)** Vimentina (*VIM*), **c)** *BMI1* y **d)** *SOX2*.

A continuación, se procedió a la selección de los marcadores de células diferenciadas: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

Para seleccionar un marcador de diferenciación de neuronas se analizó la expresión de *MAP2* (ver I.3.8.2.1) y *TUBB3* (ver I.3.8.2.2). Ambos genes presentaron un patrón de expresión de mRNA similar en las muestras (Figura R.11.a y R.11.b). En la microglía su expresión fue prácticamente inexistente, y en la neuroesfera y astrocitos sus niveles fueron claramente inferiores al nivel de expresión en neuronas (Figura R.11.a y R.11.b). En neuronas, los niveles de expresión de mRNA de *MAP2* relativos a *GAPDH* alcanzaron un valor de 7 (Figura R.11.a) mientras que *TUBB3* exhibió un valor superior a 100 (Figura R.11.b). Esta expresión tan notable de *TUBB3* en los controles normales de neuronas nos condujo a su selección como marcador de diferenciación neuronal.

El marcador más habitual de diferenciación astrocitaria es *GFAP* (ver I.3.8.1.1). La expresión de su mRNA fue prácticamente nula en el resto de las muestras comparada con la expresión en controles normales de astrocitos, donde su valor relativo a *GAPDH* se encontró en torno a 450 (Figura R.11.c). Por tanto, se consideró que *GFAP* constituía un marcador adecuado para identificar la diferenciación hacia astrocitos.

Como marcador de oligodendrocitos se analizó el gen *GALC* (I.3.8.1.1), que se expresa en las células de la glía encargadas del procesamiento del galactocerebrósido (GalC) de la mielina, tanto en oligodendrocitos como en la microglía (Lee *et al.*, 2007). En la neuroesfera, la expresión de mRNA de *GALC* fue nula, mientras que en astrocitos

y neuronas se expresó a niveles muy bajos (Figura R.11.d). En la microglía, los niveles de expresión de *GALC* fueron visiblemente mayores (Figura R.11.d), por lo que se decidió elegir este marcador para evaluar la diferenciación hacia oligodendrocitos.

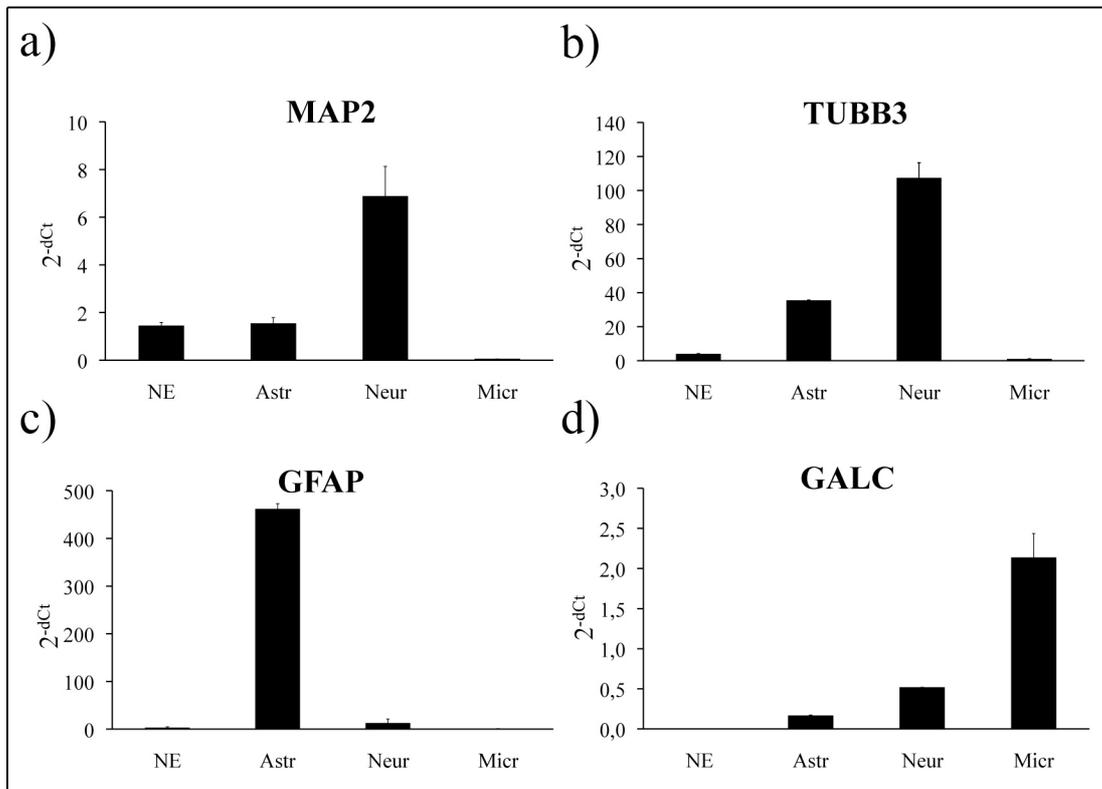


Figura R.11 Expresión de los marcadores de diferenciación neural en controles fisiológicos. Expresión, medida mediante RT-PCR cuantitativa y normalizada con respecto al control endógeno *GAPDH*, de los diferentes marcadores de diferenciación hacia los 3 tipos celulares principales en el SNC, en controles fisiológicos de RNA humano comercial de astrocitos (Astr), neuronas (Neur) y microglía (Micr) en comparación con una muestra de neuroesferas (NE), validada y publicada en otros estudios (GN11, amablemente cedida por la Dra. Marta Alonso). **a y b)** Marcadores de diferenciación neuronal, *MAP2* y *TUBB3*; **c)** Marcador de diferenciación astrocitaria, *GFAP*; **d)** Marcador de diferenciación oligodendrocitaria, *GALC*.

Una vez seleccionados los marcadores de los estados de células indiferenciadas y células diferenciadas a los diferentes linajes del SNC se procedió a analizar los niveles de expresión de dichos marcadores en las líneas de BTSCs derivadas de pacientes de GBM, tanto en el estado indiferenciado de neuroesfera como a los 4 y 14 días de cultivo en el medio de diferenciación.

R.2.1.2. Estudio de expresión de los marcadores de estado indiferenciado y diferenciado a nivel de RNA mensajero en las muestras de BTSCs

Se estudió mediante RT-PCR cuantitativa la expresión de los marcadores seleccionados en el apartado anterior en todas las líneas de BTSCs derivadas de los pacientes de GBM, tanto en el estado de neuroesfera, como tras haber sido cultivadas en medio de diferenciación durante 4 y 14 días.

La línea de BTSCs G59, que presentó una diferenciación aberrante *in vitro*, ya que sus células no perdían la morfología de neuroesfera ni se adherían al sustrato emitiendo las prolongaciones citoplasmáticas típicas, sí demostraron en cambio un aumento estadísticamente significativo de los niveles de expresión de mRNA de los marcadores de astrocitos (*GFAP*) y neuronas (*TUBB3*), conforme aumentaba el tiempo de cultivo en medio de diferenciación (Figura R.12.a). Resultó especialmente llamativo el incremento en la expresión de *GFAP* desde los 4 días, con un valor de expresión 3,82 veces mayor ($p=0,019$) respecto al del estado indiferenciado; hasta los 14 días, con un valor de expresión 9,44 veces mayor ($p<0,001$) que el del estado indiferenciado (Figura R.12.a). Los niveles de expresión de Nestina presentaban una disminución estadísticamente significativa ($p=0,004$) en las células diferenciadas durante 4 días, sin embargo, esta disminución no era estadísticamente significativa ($p=0,057$) en las células diferenciadas durante 14 días (Figura R.12.a). La expresión de *GALC* era escasa en todas las muestras, aunque aumentaba de forma estadísticamente significativa a los 14 días respecto al estado indiferenciado ($p=0,018$) (Figura R.12.a). Estos resultados sugieren que, pese a que la línea de BTSCs G59 no muestra los cambios morfológicos asociados a diferenciación *in vitro*, a nivel molecular sí que existe una diferenciación, posiblemente parcial, y preferentemente astrocitaria.

La línea de BTSCs G97C mostró una disminución de los niveles de expresión de Nestina de más del 50% en los estados de diferenciación tanto a 4 ($p < 0,001$) como a 14 días ($p < 0,001$), respecto al estado de neuroesfera. Los niveles de *GFAP* aumentaron progresivamente de forma leve pero estadísticamente significativa a los 4 ($p < 0,001$) y 14 días ($p < 0,001$) (Figura R.12.b). Los niveles de *TUBB3* aumentaron de manera estadísticamente significativa a los 4 días (media de 2,27 veces; $p < 0,001$) respecto al estado indiferenciado de neuroesfera en esta línea; sin embargo, bajaron a los 14 días hasta un valor 1,33 veces superior al del estado indiferenciado, no obstante, este cambio a los 14 días se mantuvo como estadísticamente significativo ($p = 0,002$) (Figura R.12.b). Los niveles de *GALC* eran prácticamente nulos en todas las muestras (Figura R.12.b), aunque aumentaban estadísticamente de forma significativa en las células diferenciadas durante 14 días ($p = 0,033$) respecto al nivel en el estado indiferenciado. Estas observaciones sugieren que la línea de BTSCs G97C sigue una diferenciación principalmente neuronal.

La línea de BTSCs GN1C mostró una ligera disminución de los niveles de expresión del marcador de BTSCs Nestina en los estados de diferenciación de 4 y 14 días respecto al estado de neuroesfera (Figura R.12.c). Se observó un gran aumento en los niveles de expresión de *GFAP* a los 4 días de diferenciación (media de 2,5 veces mayor; $p = 0,008$) respecto al nivel en el estado indiferenciado, aunque los niveles disminuyeron parcialmente a los 14 días de diferenciación (Figura R.12.c). Los niveles de *TUBB3* fueron muy bajos en todas las muestras, así como los de *GALC* que eran prácticamente nulos (Figura R.12.c), aunque estos últimos presentaban aumentos estadísticamente significativos tanto a 4 ($p < 0,001$) como a 14 días ($p = 0,023$) de diferenciación respecto al nivel inicial en el estado indiferenciado de neuroesfera. Estos

resultados sugieren que la línea de BTSCs GN1C exhibe una diferenciación preferentemente astrocitaria.

La línea de BTSCs G52 presentó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de Nestina a los 14 días de diferenciación ($p=0,049$), respecto al estado de neuroesfera (Figura R.12.d), así como un aumento estadísticamente significativo del nivel de expresión de *GFAP* a los 4 días de diferenciación (media 26 veces mayor; $p<0,001$) respecto al nivel en el estado indiferenciado), que bajó a los 14 días de diferenciación, aunque este cambio se mantuvo como estadísticamente significativo respecto al nivel inicial (media 2,52 veces mayor; $p<0,001$) (Figura R.12.d). El cambio más apreciable en esta línea se encontró en los niveles de expresión de *TUBB3*, que aumentaban alrededor de 3 veces respecto al estado de neuroesfera, tanto a los 4 ($p=0,007$) como a los 14 días de diferenciación ($p=0,001$) (Figura R.12.d). Los niveles de expresión de *GALC* eran prácticamente nulos en todas las muestras, aunque se detectó un aumento estadísticamente significativo ($p=0,049$) en la expresión de este marcador a los 14 días de diferenciación respecto al estado de neuroesfera (Figura R.12.d). Estas observaciones indican que esta línea de BTSCs presenta una diferenciación principalmente pro-neuronal.

La línea de BTSCs G63 mostró una disminución estadísticamente significativa de los niveles de Nestina a los 4 ($p<0,001$) y 14 días ($p<0,001$) de diferenciación, respecto al estado de neuroesfera; presentó una escasa expresión de *GFAP*, aunque con aumentos estadísticamente significativos a los 4 ($p=0,002$) y 14 días ($p=0,001$) de diferenciación, y su expresión de *GALC* fue nula en todos los estados (Figura R.12.e). Esta línea manifestó un gran aumento de la expresión de *TUBB3* a los 4 días de diferenciación (media 4 veces superior; $p=0,006$) respecto al estado de neuroesfera, aunque su expresión a los 14 días de diferenciación regresó prácticamente al nivel

inicial del estado de neuroesfera (Figura R.12.e). Estos datos sugieren que la línea G63 sigue una diferenciación exclusivamente neuronal.

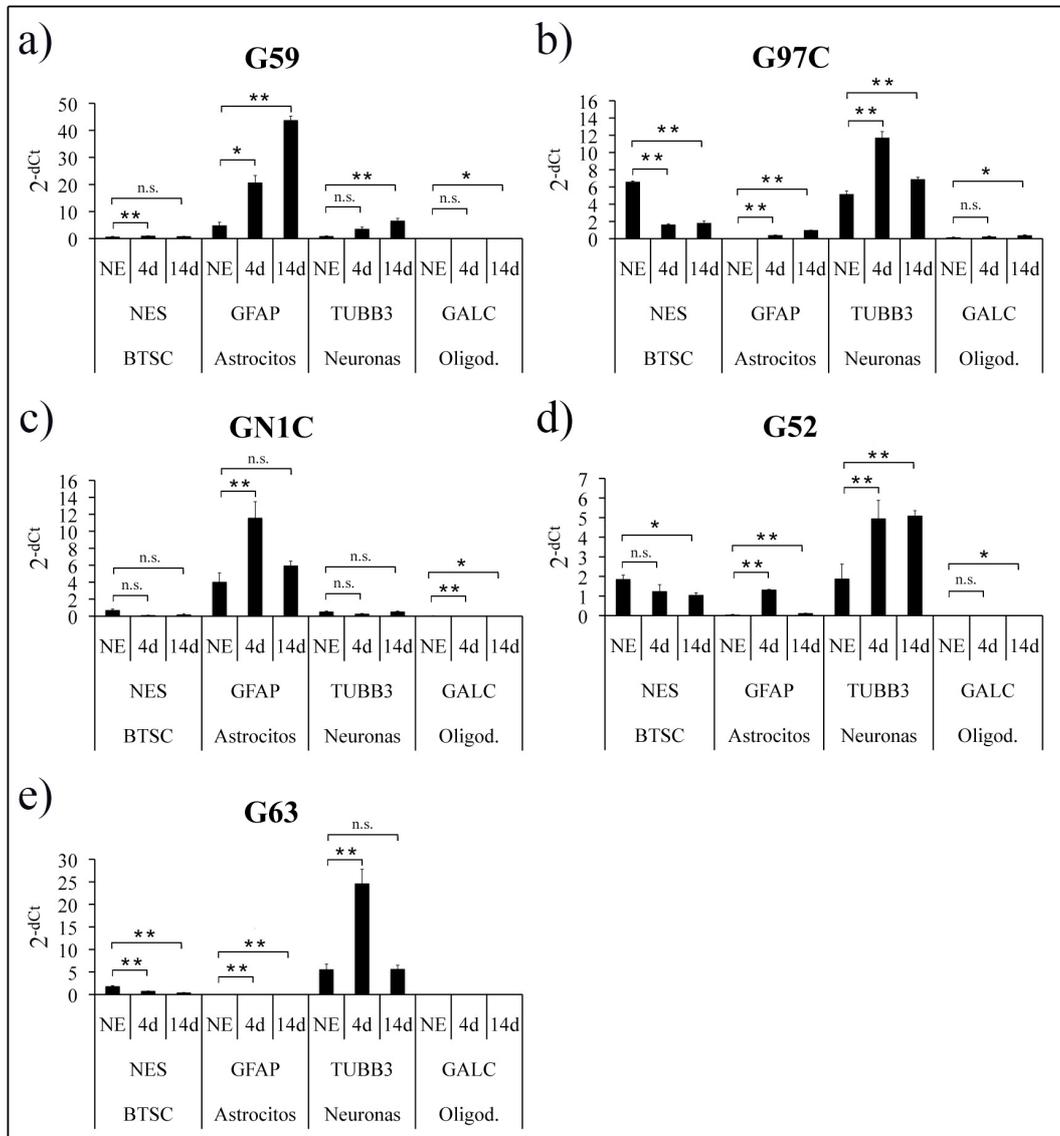


Figura R.12 Análisis de expresión mediante RT-PCR cuantitativa de los marcadores de BTSCs y de diferenciación hacia los principales tipos celulares del SNC, durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las muestras derivadas de pacientes con GBM. Marcador de BTSCs: Nestina (*NES*); de astrocitos: *GFAP*; de neuronas: *TUBB3* y de oligodendrocitos (oligod.): *GALC*. El análisis se llevó a cabo en estado de neuroesfera (NE) de BTSCs, y tras su cultivo en medio de diferenciación durante 4 días (4d) y 14 días (14d). Los valores de expresión están referidos al control endógeno de *GAPDH*; *, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; n.s., valor de p no significativo.

Seguidamente, se procedió a verificar si los niveles de expresión observados a nivel de mRNA se correspondían con un cambio de expresión similar a nivel de proteína.

R.2.1.3. Análisis de expresión de los marcadores de BTSCs y células diferenciadas a nivel de proteína

Se estudió la expresión proteica de los marcadores previamente analizados a nivel de mRNA en las líneas de BTSCs en estado de neuroesfera y de diferenciación a los 14 días, mediante la técnica de inmunofluorescencia (ver M.6). En el caso del marcador de diferenciación oligodendrocitaria, la proteína analizada fue O4 en lugar de GALC, ya que O4 es un antígeno de superficie, más fácilmente detectable en la técnica de inmunofluorescencia que GALC, marcador molecular citoplasmático. Además de corroborar los resultados obtenidos a nivel de mRNA, este análisis sirvió para validar la utilidad de estos anticuerpos para los estudios funcionales posteriores.

Como ejemplo, se presentan los cambios de expresión de los marcadores a nivel de proteína en la diferenciación *in vitro* de la línea de BTSCs GN1C. La expresión del marcador de BTSCs Nestina disminuía levemente a los 14 días de diferenciación respecto al estado de neuroesfera (Figura R.13), tal y como ocurrió a nivel de mRNA (Figura R.12.c). Los niveles del marcador GFAP aumentaron llamativamente en las células diferenciadas durante 14 días con respecto a la escasa expresión en el estado de neuroesfera (Figura R.13), lo que corresponde con el incremento observado a nivel de mRNA (Figura R.12.c). La expresión de las proteínas TUBB3 y O4 era prácticamente nula en el estado de neuroesfera (Figura R.13), mientras que a los 14 días de diferenciación TUBB3 aumentó ligeramente, como se había observado a nivel de mRNA (Figura R.12.c). Los niveles de la proteína O4 a los 14 días de diferenciación

aparecieron levemente elevados con respecto al estado de neuroesfera, donde eran prácticamente inexistentes (Figura R.13), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de este marcador a nivel de mRNA (Figura R.12.c).

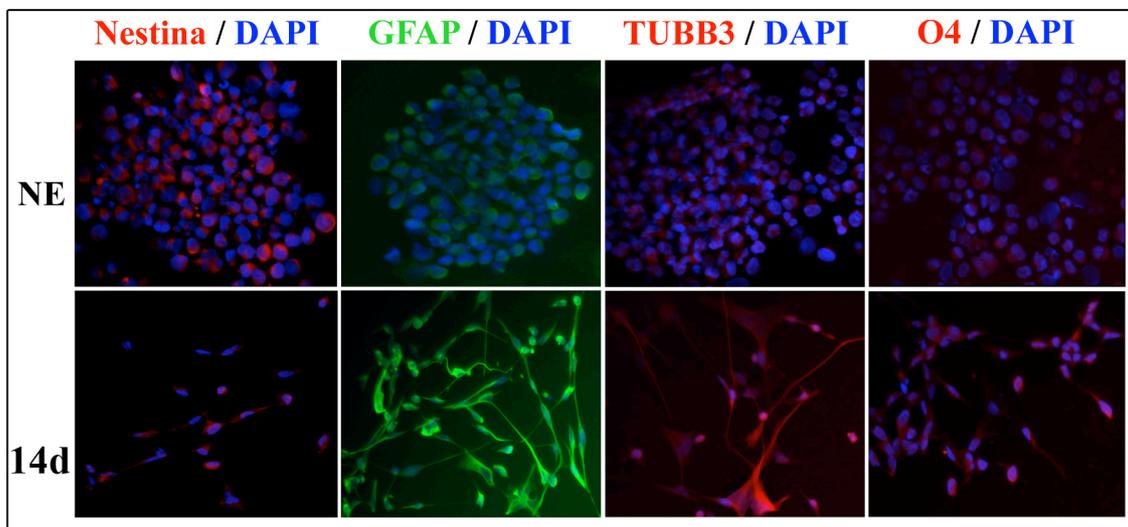


Figura R.13 Estudio mediante inmunofluorescencia de los niveles de expresión de las proteínas seleccionadas como marcadoras de estado de BTSC o de la diferenciación hacia los diversos linajes del SNC, en la línea GN1C tras el proceso de diferenciación de 14 días (14d) *in vitro* comparado con el estado de neuroesferas (NE). Se analizó la expresión proteica del marcador de estado de BTSC, Nestina, y los marcadores de diferenciación hacia los diversos linajes celulares del SNC: astrocitos (GFAP), neuronas (TUBB3) y oligodendrocitos (O4) mediante inmunofluorescencia con anticuerpos conjugados con FITC (verde) o Texas Red (rojo), contrastados con la tinción nuclear DAPI (azul).

Una vez puesto a punto el modelo de diferenciación de las líneas de BTSCs derivadas a partir de las muestras de pacientes de GBM, se continuó el estudio de los microRNAs implicados en dicha diferenciación.

R.3. Análisis de la implicación de los microRNAs en la diferenciación de BTSCs

El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar los microRNAs implicados en la diferenciación de las BTSCs, y tratar de establecer su papel en dicho

proceso. Por tanto, una vez obtenidos los cultivos de neuroesferas a partir de pacientes de GBM y verificada la presencia de las características imprescindibles de las BTSCs en las células de dichos cultivos, se prosiguió el estudio analizando los microRNAs diferencialmente expresados entre el estado de neuroesfera y las células diferenciadas durante 4 y 14 días, mediante un *screening* global utilizando microarrays de miRNAs.

R.3.1. Estudio de la expresión diferencial de microRNAs entre las líneas de BTSCs en estado indiferenciado (neuroesfera) y tras 4 y 14 días de cultivo en medio de diferenciación

Se procedió a extraer el RNA de las líneas en 3 momentos distintos: estado indiferenciado de neuroesferas, estado de diferenciación temprana tras 4 días de cultivo en medio de diferenciación y estado de diferenciación avanzada tras 14 días en medio de diferenciación, con el fin de comparar la expresión de miRNAs en los estados de diferenciación frente al estado de neuroesfera.

R.3.1.1. High-throughput screening mediante microarrays de microRNAs

Los RNAs de estas muestras se extrajeron, se procesaron y posteriormente se hibridaron en los microarrays de expresión de miRNAs miRCURY LNA (versión de 5^a generación, *hsa*, *mmu* y *rno*) de la empresa Exiqon (ver M.7.1). A continuación, se analizaron los resultados obtenidos mediante un estudio bioinformático de los datos, para investigar los cambios en la expresión de miRNAs en los estados diferenciados (a 4 y 14 días de diferenciación) respecto al estado de neuroesfera (ver M.7.2). Los análisis con la aplicación LIMMA dieron como resultado 36 miRNAs diferencialmente expresados. La selección posterior por valor crudo de Hy3 mayor de 200 redujo la lista

a 21 miRNAs candidatos. La expresión de diez de esos 21 miRNAs disminuía en el estado diferenciado: hsa-miR-103, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b, hsa-miR-15b, hsa-miR-17, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR-25, hsa-miR-301a and hsa-miR-93. La expresión de los 11 miRNAs restantes se hallaba incrementada en el estado de diferenciación: hsa-miR-100, hsa-miR-1259, hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-23b, hsa-miR-27a, hsa-miR-27b, hsa-miR-29a and hsa-miR-29b. La mayoría de los miRNAs seleccionados pertenecen a *clusters* de miRNAs y a varios *clusters* parálogos, lo que sugiere que la diferenciación de las BTSCs conlleva la regulación coordinada de la expresión de varios genes relacionados de miRNAs. Para posibilitar la visualización de los datos de expresión obtenidos a partir de los microarrays de miRNAs, se generó una representación gráfica ordenada de estos datos mediante *clustering* jerárquico (ver M.7.2) (Figura R.14).

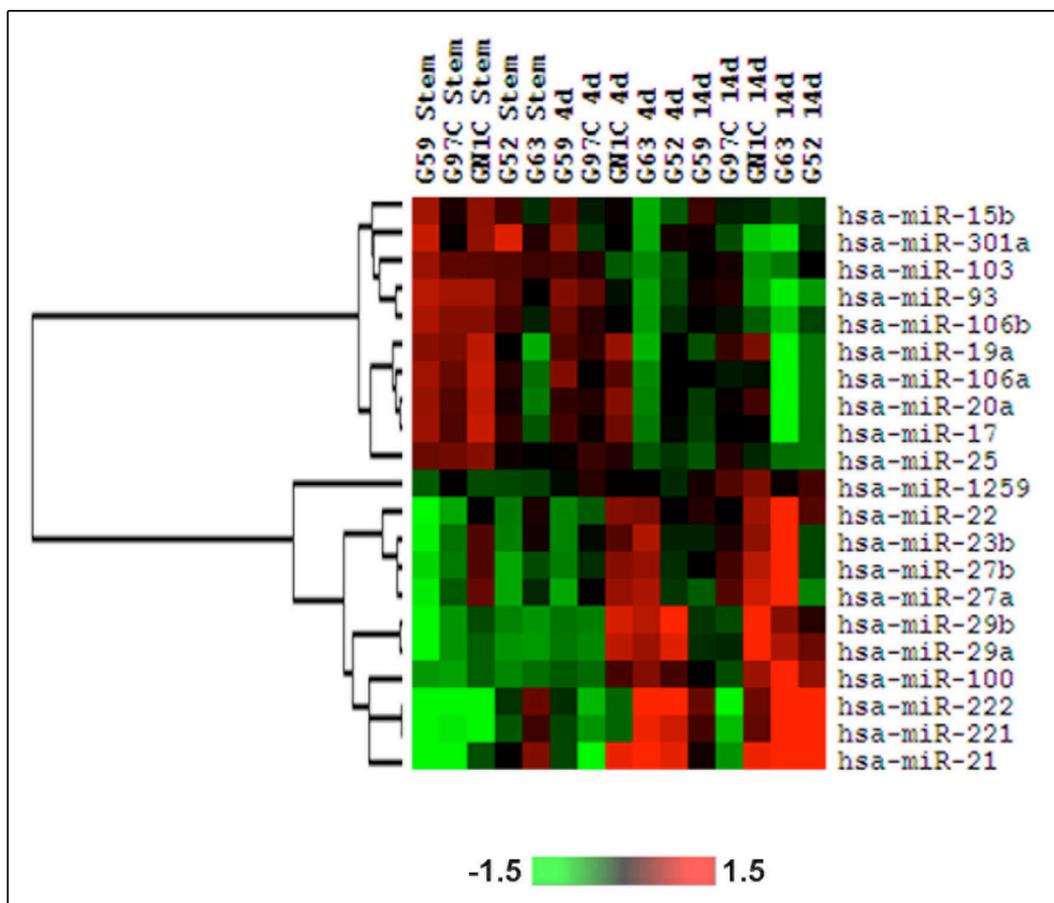


Figura R.14 *Clustering* jerárquico supervisado de los miRNAs seleccionados a partir de los

datos obtenidos del array de miRNAs. Agrupamiento supervisado de los datos de expresión de los miRNAs seleccionados en las muestras de las 5 líneas de BTSCs derivadas de pacientes de GBM, en estado de neuroesfera y posteriormente cultivadas en medio de diferenciación durante 4 y 14 días. La expresión de cada miRNA se calculó como *fold change* (FC) con respecto al *pool* de muestras y se normalizó según la media de cada miRNA. (*Stem*, línea en estado de neuroesfera; 4d, línea después de 4 días en cultivo con medio de diferenciación; 14d, línea cultivada en medio de diferenciación durante 14 días).

El siguiente paso consistió en el proceso de validación de los miRNAs seleccionados.

R.3.1.2. Validación de los microRNAs diferencialmente expresados según el microarray de microRNAs

El proceso de validación de los miRNAs candidatos se llevó a cabo mediante RT-PCR cuantitativa con ensayos específicos de miRNA de TaqMan (ver M.8) utilizando las mismas muestras de RNA usadas para hibridar dichos microarrays.

Se analizó la expresión de 12 de los 21 miRNAs seleccionados en la lista descrita previamente: hsa-miR-21, hsa-miR-22, hsa-miR-23b, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-93, hsa-miR-100, hsa-miR-106a, hsa-miR-106b, hsa-miR-221, hsa-miR-222 y hsa-miR-301a. Asimismo, se estudió la expresión de 6 miRNAs adicionales obtenidos en estudios previos del grupo utilizando TLDA para ver la expresión de miRNAs en unas muestras similares: hsa-miR-9, hsa-miR-10b, hsa-miR-31, hsa-miR-33, hsa-miR-34a y hsa-miR-214.

Se validaron 7 de los 12 miRNAs estudiados. Cinco de ellos presentaron una sobreexpresión estadísticamente significativa en las muestras en estado de diferenciación de prácticamente todas las líneas de BTSCs, respecto a su estado de neuroesfera: hsa-miR-21 (Figura R.15.a), hsa-miR-29a (Figura R.15.c), hsa-miR-29b (Figura R.15.d), hsa-miR-221 (Figura R.15.e) y hsa-miR-222 (Figura R.15.f). La

expresión de los otros dos miRNAs validados se halló disminuida de forma estadísticamente significativa en los estados diferenciados de prácticamente todas las muestras, respecto a su estado indiferenciado de neuroesfera: hsa-miR-93 (Figura R.15.g) y hsa-miR-106a (Figura R.15.h).

Asimismo, se validó uno de los 6 miRNAs obtenidos en estudios previos del grupo, hsa-miR-31 (Figura R.15.b), que mostraba un incremento estadísticamente significativo de su expresión en los estados diferenciados respecto al estado indiferenciado de neuroesfera, excepto en el caso de la línea G97C.

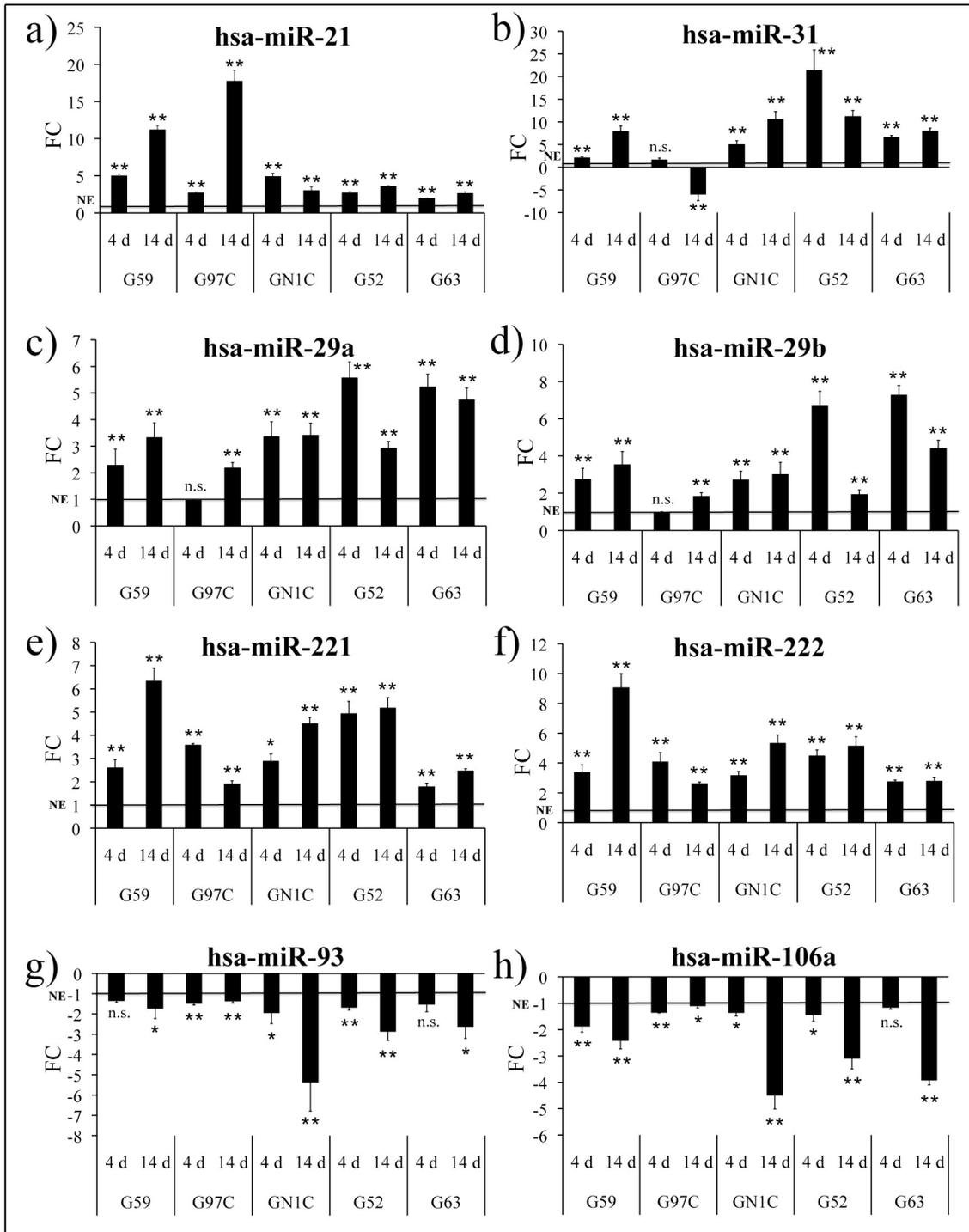


Figura R.15 Validación de los miRNAs seleccionados a partir de los experimentos de microarrays de miRNAs. Estudio de la expresión, medida mediante ensayos específicos de miRNA de TaqMan, de los miRNAs candidatos resultantes del análisis bioinformático del experimento de hibridación en microarrays de miRNAs de las muestras de las líneas de BTSCs en estado indiferenciado y diferenciadas *in vitro* durante 4 (4d) y 14 (14d) días. Los datos se expresan como *fold change* (FC) con respecto a la expresión en el estado de neuroesfera (NE) de cada línea, señalada con una línea negra horizontal en cada gráfica. Se muestra la expresión de **a)** hsa-miR-21, **b)** hsa-miR-31, **c)** hsa-miR-29a, **d)**

hsa-miR-29b, e) hsa-miR-221, f) hsa-miR-222, g) hsa-miR-93 y h) hsa-miR-106a.*, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; n.s., valor de p no significativo.

Los miRNAs hsa-miR-29a y hsa-miR-29b pertenecen al mismo *cluster* de miRNAs, y este hecho se refleja en su patrón de expresión similar en las muestras (Figura R.15.c y d). Esta misma observación se aplica a los perfiles de expresión de hsa-miR-221 (Figura R.15.e) y hsa-miR-222 (Figura R.15.f), y a los de los miRNAs hsa-miR-93 y hsa-miR-106a (Figura R.15.g y h), que también forman parte de otros dos *clusters* distintos. Estos resultados similares en los miRNAs de un mismo *cluster* resaltan la fiabilidad de los estudios de expresión realizados.

Por lo general, los niveles de los miRNAs siguieron una tendencia de expresión similar en todas las muestras, aumentando o disminuyendo de manera sostenida o progresiva conforme avanza el proceso de diferenciación. Una excepción es el caso de hsa-miR-31, cuya expresión aumentó a los 4 días de diferenciación y disminuyó a los 14 en la línea G97C, mientras que aumentó durante el proceso de diferenciación en todas las demás líneas.

Una vez que validamos la expresión diferencial de estos 8 miRNAs en el estado diferenciado de las muestras, diseñamos ensayos funcionales para dilucidar el papel que podrían jugar estos miRNAs en la diferenciación de las BTSCs.

R.3.2. Estudios funcionales de los microRNAs seleccionados, mediante sobreexpresión / inhibición de estos microRNAs

Estos estudios se llevaron a cabo en 2 líneas de BTSCs, sobreexpresando e inhibiendo 6 de los 8 miRNAs validados previamente, mediante transfección con pre-miRs y anti-miRs, respectivamente (ver M.9.1).

La selección de las dos líneas de BTSCs utilizadas en los experimentos de transfección se basó en su capacidad de autorrenovación y de diferenciación a diferentes linajes neurales. Anteriormente se había comprobado que las dos líneas con mayor capacidad de autorrenovación eran G52 y GN1C (ver R.1.2) y, por otra parte, se había observado que la línea GN1C mostraba una diferenciación mayoritariamente proastrocitaria, mientras que la línea G52 exhibía una diferenciación preferentemente proneuronal (ver R.2.1.2). Por tanto, se escogieron ambas líneas de BTSCs para los experimentos funcionales basados en transfección con pre-miRs y anti-miRs.

Asimismo, se eligieron 6 de los 8 miRNAs validados para llevar a cabo los ensayos funcionales, concretamente, los 6 miRNAs sobreexpresados en la diferenciación *in vitro* de las células BTSCs. Para estos ensayos se plantearon dos aproximaciones experimentales. En primer lugar, transfectar los correspondientes pre-miRs en las BTSCs en el estado de neuroesfera, mantener su crecimiento en medio de proliferación y observar si se producía un aumento de los marcadores de diferenciación de los distintos linajes neurales y una disminución de los marcadores de BTSCs indiferenciadas. En segundo lugar, transfectar los correspondientes anti-miRs en el estado de diferenciación de las células, mantener las células en cultivo con medio de diferenciación y estudiar si provocaban el efecto contrario, una disminución de los niveles de expresión de los marcadores de las células diferenciadas y un incremento del nivel de expresión de los marcadores de célula indiferenciada. Ambas aproximaciones se comprobaron tanto a nivel de mRNA, mediante RT-PCR cuantitativa; como a nivel de proteína, mediante inmunofluorescencia.

El primer paso en estos ensayos funcionales fue confirmar que los pre-miRs y anti-miRs transfectados aumentaban y disminuían los niveles endógenos de los miRNAs en los diferentes estados celulares.

R.3.2.1. Comprobación del aumento / disminución de los microRNAs tras la transfección de precursores / inhibidores de microRNAs

Los análisis de expresión de miRNAs tras la transfección de precursores e inhibidores específicos de miRNAs se realizaron mediante RT-PCR cuantitativa utilizando los ensayos específicos de miRNAs de TaqMan (ver M.9.1).

Para estos estudios se emplearon las dos aproximaciones experimentales de sobreexpresión e inhibición, ambas durante 7 y 14 días, en las líneas de BTSCs GN1C y G52. Las dos líneas de BTSCs analizadas presentaron incrementos estadísticamente significativos en los niveles de expresión de los miRNAs 7 días después de la transfección con los pre-miRs correspondientes (Figuras R.16 y R.17). A los 14 días de la transfección, los niveles de los miRNAs permanecieron elevados, pero en menor medida que a los 7 días, por lo que se decidió llevar a cabo los ensayos funcionales basados en la sobreexpresión de los miRNAs a los 7 días de la transfección. En el caso de las transfecciones con los anti-miRs, se observó que a los 7 días de transfección las variaciones de los niveles de expresión fueron muy ligeras, mientras que a los 14 días se apreciaron con mayor claridad (Figuras R.16 y R.17). Por este motivo, se decidió mantener la transfección de los anti-miRs durante 14 días antes de realizar los ensayos funcionales.

La línea GN1C presentó aumentos estadísticamente significativos en los niveles de expresión de todos los miRNAs después de transfectar los correspondientes pre-miRs y mantener las células como neuroesferas en medio de proliferación durante 7 días (Figura R.16.a, c, e, g, i, k). Con respecto a las transfecciones con anti-miRs en esta línea, se observaron disminuciones estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los correspondientes miRNAs en el caso de las transfecciones con anti-

miR-31 ($p=0,001$; Figura R.16.d), anti-miR-29a ($p=0,029$; Figura R.16.f), anti-miR-221 ($p<0,001$; Figura R.16.j) y anti-miR-222 ($p=0,029$; Figura R.16.l). Por otro lado, esta línea sólo mostró disminuciones leves que no alcanzaban la significación estadística en los niveles de expresión de los miRNAs correspondientes al transfectar con anti-miR-21 ($p=0,448$; Figura R.16.b) y anti-miR-29b ($p=0,121$; Figura R.16.h).

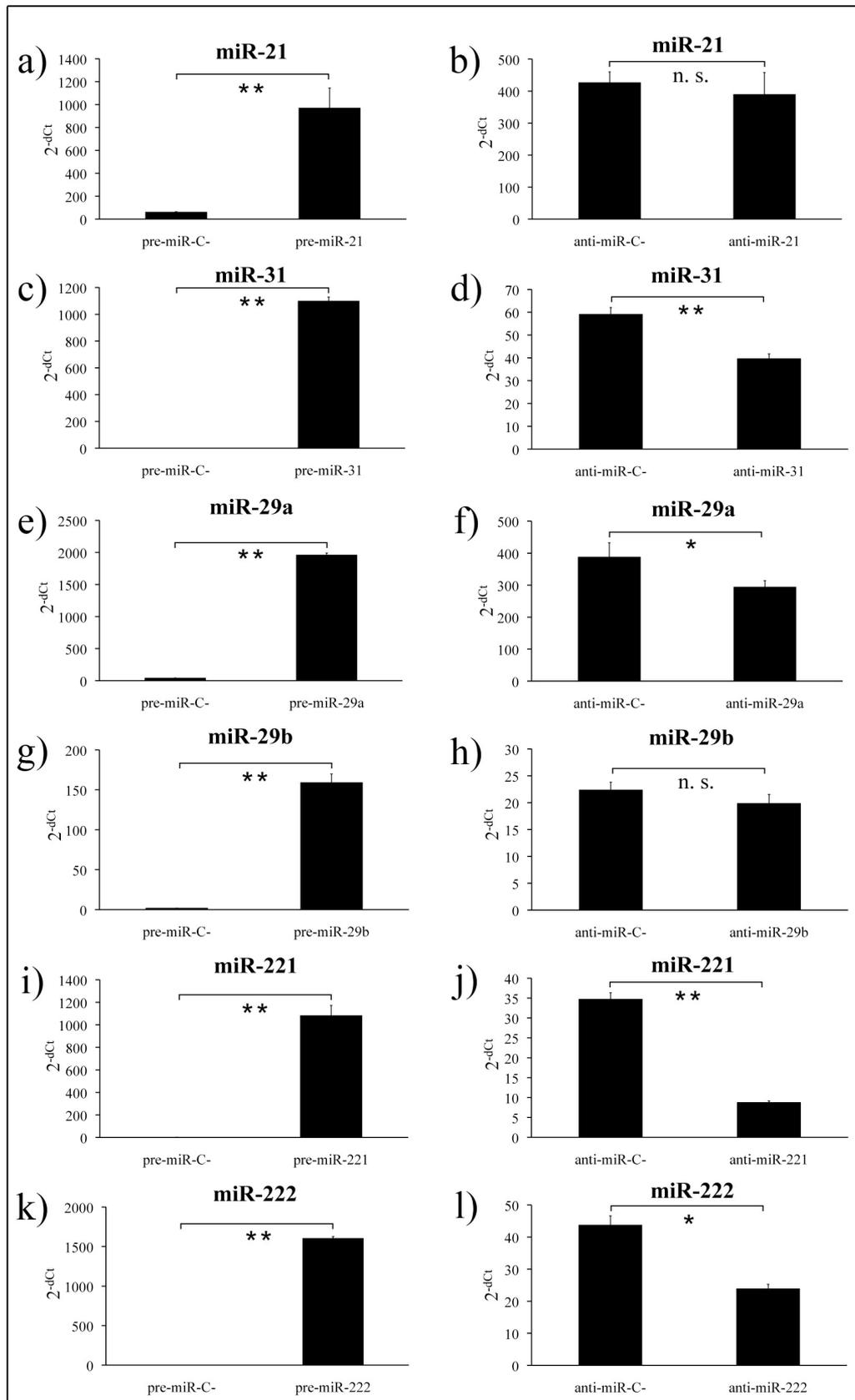


Figura R.16 Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados para los experimentos funcionales tras la transfección de la línea de BTSCs GN1C con pre-miRs (para confirmar su

sobreexpresión) y con anti-miRs (para comprobar su inhibición). Expresión de los miRNAs medida mediante RT-PCR cuantitativa, utilizando los ensayos de miRNAs de TaqMan y expresada como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta \Delta Ct}$) respecto al control endógeno *RNU6B*, tras transfectar (**a, c, e, g, i y k**) los correspondientes pre-miRs y mantener las células en medio de proliferación como neuroesferas durante 7 días, o tras transfectar (**b, d, f, h, j y l**) los correspondientes anti-miRs y cultivar las células en medio de diferenciación durante 14 días. **a)** pre-miR-21, **b)** anti-miR-21, **c)** pre-miR-31, **d)** anti-miR-31, **e)** pre-miR-29a, **f)** anti-miR-29a, **g)** pre-miR-29b, **h)** anti-miR-29b, **i)** pre-miR-221, **j)** anti-miR-221, **k)** pre-miR-222, **l)** anti-miR-222. Como controles se utilizaron los correspondientes pre-miR control negativo (pre-miR-C-) y anti-miR control negativo (anti-miR-C-). *, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; n.s., valor de p no significativo.

La línea G52 presentó resultados similares a los obtenidos en la línea GN1C. Se observaron aumentos estadísticamente significativos en los niveles de expresión de todos los miRNAs después de transfectar con los correspondientes pre-miRs y mantener las células como neuroesferas en medio de proliferación durante 7 días (Figura R.17.a, c, e, g, i, k). Asimismo, las disminuciones en los niveles de expresión de los miRNAs correspondientes fueron estadísticamente significativas tras las transfecciones con los anti-miR-21 ($p=0,008$; Figura R.17.b), anti-miR-31 ($p<0,001$; Figura R.17.d) y anti-miR-29a ($p=0,003$; Figura R.17.f), mientras que para los tres restantes no se observaron cambios significativos (Figura R.17.h, j y l).

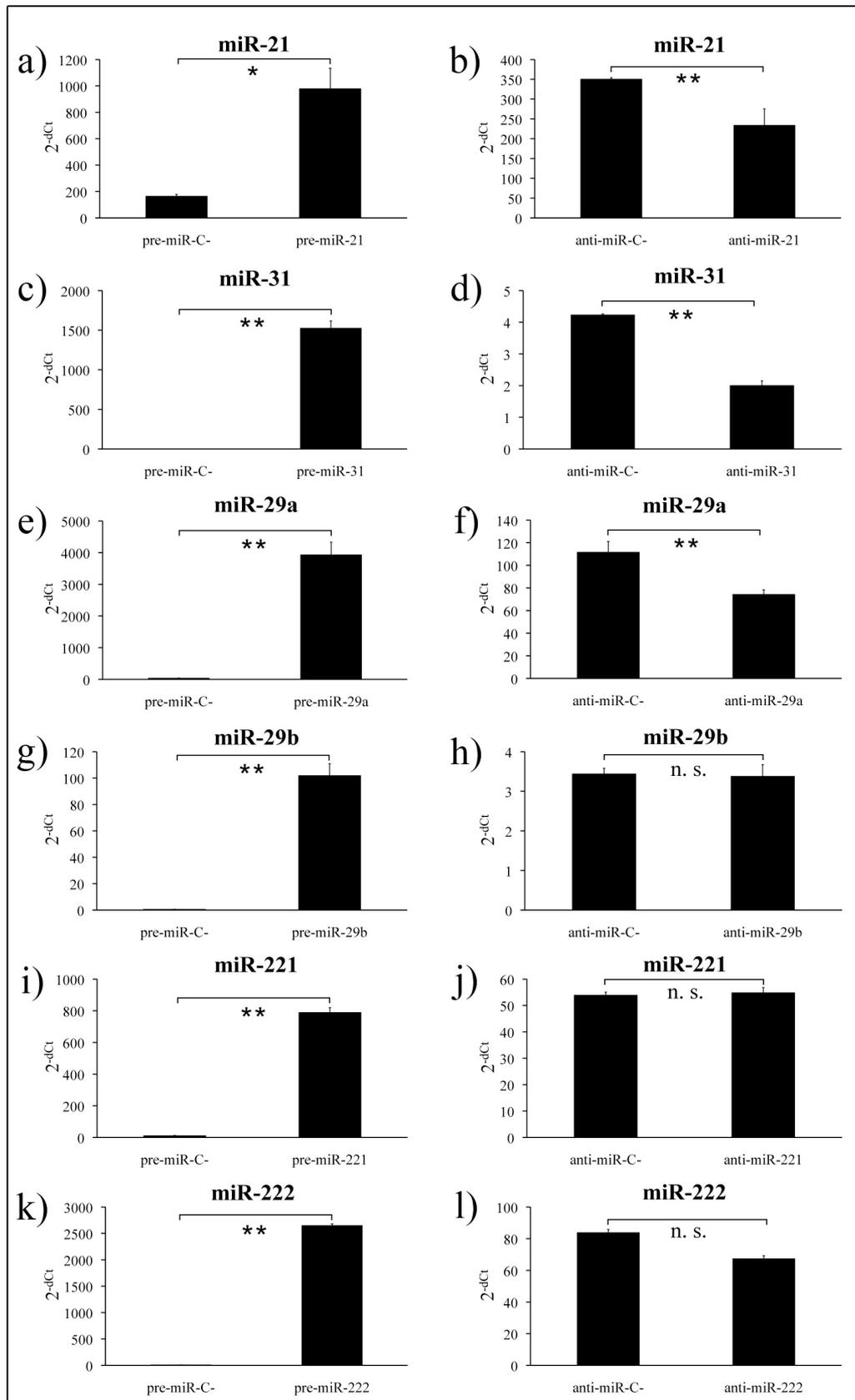


Figura R.17 Análisis de la expresión de los miRNAs seleccionados para los experimentos funcionales tras la transfección de la línea de BTSCs G52 con pre-miRs (para confirmar su

sobreexpresión) y con anti-miRs (para comprobar su inhibición). Expresión de los miRNAs medida mediante RT-PCR cuantitativa, utilizando los ensayos de miRNAs de TaqMan y expresada como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-\Delta Ct}$) respecto al control endógeno *RNU6B*, tras transfectar (**a, c, e, g, i y k**) los correspondientes pre-miRs y mantener las células en medio de proliferación como neuroesferas durante 7 días, o tras transfectar (**b, d, f, h, j y l**) los correspondientes anti-miRs y cultivar las células en medio de diferenciación durante 14 días. **a)** pre-miR-21, **b)** anti-miR-21, **c)** pre-miR-31, **d)** anti-miR-31, **e)** pre-miR-29a, **f)** anti-miR-29a, **g)** pre-miR-29b, **h)** anti-miR-29b, **i)** pre-miR-221, **j)** anti-miR-221, **k)** pre-miR-222, **l)** anti-miR-222. Como controles se utilizaron los correspondientes pre-miR control negativo (pre-miR-C-) y anti-miR control negativo (anti-miR-C-). *, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; n.s., valor de p no significativo.

A la vista de los resultados obtenidos, los experimentos de transfección con pre-miRs constituyen una excelente aproximación para los estudios de sobreexpresión, ya que a los 7 días de la transfección los niveles de expresión continúan muy elevados con respecto al control negativo de la transfección. Sin embargo, en el caso de las transfecciones con anti-miRs fue habitual encontrar sólo leves disminuciones en los niveles endógenos de los miRNAs. Este hecho probablemente se debe al mecanismo de acción de los anti-miRs, que inhiben la función de los miRNAs al unirse a ellos por complementariedad de bases, pero no siempre inducen una disminución en la cantidad de miRNA endógeno.

Tras haber comprobado el adecuado funcionamiento de los experimentos de sobreexpresión e inhibición de los miRNAs en ambas líneas celulares, se procedió al análisis de los cambios en la expresión de los marcadores de células indiferenciadas y diferenciadas a los distintos linajes del SNC, en las muestras transfectadas.

R.3.2.2. Estudio de expresión de marcadores de estado indiferenciado y diferenciado en las muestras transfectadas

Con el fin de evaluar si los miRNAs estudiados eran capaces de inducir la diferenciación de las BTSCs mediante la transfección de pre-miRs en el estado de células indiferenciadas, o por el contrario, revertir la diferenciación mediante la

transfección de anti-miRs en las células diferenciadas, se estudiaron los niveles de expresión de los marcadores de células indiferenciadas y diferenciadas a los distintos linajes celulares del SNC en las muestras transfectadas. El análisis de estos marcadores se llevó a cabo tanto a nivel de mRNA, mediante RT-PCR cuantitativa, como a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia.

R.3.2.2.1. Estudio de expresión de marcadores en las muestras transfectadas a nivel de RNA mensajero

Se estudiaron los marcadores validados previamente: Nestina, como marcador de células indiferenciadas; *GFAP*, como marcador de células en diferenciación astrocitaria; *TUBB3*, como marcador de células en diferenciación neuronal; y *GALC*, como marcador de células en diferenciación oligodendrocitaria.

Asimismo, por cada transfección se cultivaron también células GN1C y G52 en medio de diferenciación durante 7 y 14 días, sin transfectar; con el fin de poder comparar los cambios de expresión de marcadores que ocurren en la diferenciación de dichas líneas de BTSCs, con la expresión de los mismos marcadores en las muestras transfectadas.

La diferenciación de la línea GN1C no transfectada tras 7 días de cultivo en medio de diferenciación mostró un aumento estadísticamente significativo ($p=0,004$) en la expresión del marcador de astrocitos *GFAP*, con valores de expresión 25 veces superiores a los encontrados en su estado de neuroesfera (Figura R.18.a). Asimismo, presentó una disminución estadísticamente significativa ($p=0,006$) de 2,5 veces en la expresión de Nestina, mientras que los valores de *TUBB3* y *GALC* permanecieron prácticamente inalterados (Figura R.18.a) respecto al estado indiferenciado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente (ver R.2.1.2), en donde se observó

que la diferenciación de la línea GN1C era preferentemente astrocitaria, especialmente en la diferenciación temprana. Al comparar este perfil de expresión de los marcadores con las muestras transfectadas y mantenidas en medio de cultivo de proliferación durante 7 días, sólo se observó una inducción de la diferenciación en el mismo sentido al transfectar con pre-miR-21. La sobreexpresión de este miRNA indujo un aumento estadísticamente significativo ($p=0,048$) de la expresión de *GFAP*, 2 veces superior a la del control negativo, junto con una tendencia a la disminución en los niveles de Nestina de 1,56 veces ($p=0,351$); los cambios en la expresión de *TUBB3* y *GALC* no se consideraron relevantes, al variar menos de 1,5 veces (Figura R.18.c). Estos datos sugieren que miR-21 podría estar implicado en la diferenciación de esta línea de BTSCs. Ninguno de los restantes pre-miRs exhibió este efecto de inducción de la diferenciación hacia el linaje astrocitario por sí mismo (Figura R.18.e, g, i y k). No obstante, se observó que la sobreexpresión de miR-29a y la de miR-29b incrementaban la muerte celular, tras la observación de las células en cultivo con el microscopio óptico. Este efecto se estudió con mayor profundidad posteriormente (ver R.3.2.3 y R.3.2.4).

Por otro lado, los niveles de expresión de los marcadores en la línea GN1C después de su diferenciación en cultivo durante 14 días presentaron un patrón relativamente distinto al observado a los 7 días de diferenciación, sugiriendo que la diferenciación tardía se orientó también hacia neuronas y oligodendrocitos. Así, aunque los niveles de expresión de Nestina disminuyeron de forma estadísticamente significativa ($p=0,007$) una media de 2 veces en el estado de diferenciación de 14 días con respecto al estado de neuroesfera, similar a lo que ocurría a los 7 días de diferenciación, la expresión de *GFAP* aumentó una media de 1,61 veces ($p=0,006$), lo cual contrasta con el incremento de 25 veces en su expresión a los 7 días ($p=0,004$). Por otra parte, la expresión de *TUBB3* y *GALC* se incrementó una media de 1,87 ($p=0,011$) y 2,09 veces

($p=0,004$), respectivamente, mientras que en el estado de diferenciación a los 7 días estos marcadores no presentaron variaciones relevantes. Al comparar este perfil de expresión de los marcadores con los de las células transfectadas con los anti-miRs, se observó una reversión de estos efectos en la transfección con anti-miR-221 y, especialmente, con anti-miR-222 (Figura R.18.l y n). Al inhibir miR-221, los niveles de expresión de Nestina aumentaron un media de 1,57 veces ($p=0,043$) y los niveles de *GALC* descendieron una media de 1,51 veces ($p=0,047$), mientras que los de *TUBB3* y *GALC* no fueron relevantes al no alcanzar valores 1,5 veces inferiores respecto a los del control negativo de anti-miRs (Figura R.18.l). En el caso de miR-222, los niveles de Nestina no presentaron cambios apreciables. Sin embargo, los descensos en los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación fueron estadísticamente significativos: *GFAP* presentó niveles de expresión una media de 1,46 veces inferiores ($p=0,046$) a los de las células transfectadas con el control negativo de anti-miRs, los niveles de *TUBB3* disminuyeron una media de 2 veces ($p=0,017$) y *GALC*, presentó valores de expresión una media de 2,46 veces menores a los del control ($p=0,042$) (Figura R.18.n). Por tanto, la reversión del proceso de diferenciación que se observa al inhibir estos dos miRNAs en esta línea celular sugiere que ambos podrían tener funciones muy relevantes en este proceso. Al inhibir el resto de miRNAs seleccionados (Figura R.18.d, f, h y j) no se observó un bloqueo de la diferenciación tan claro en ningún caso.

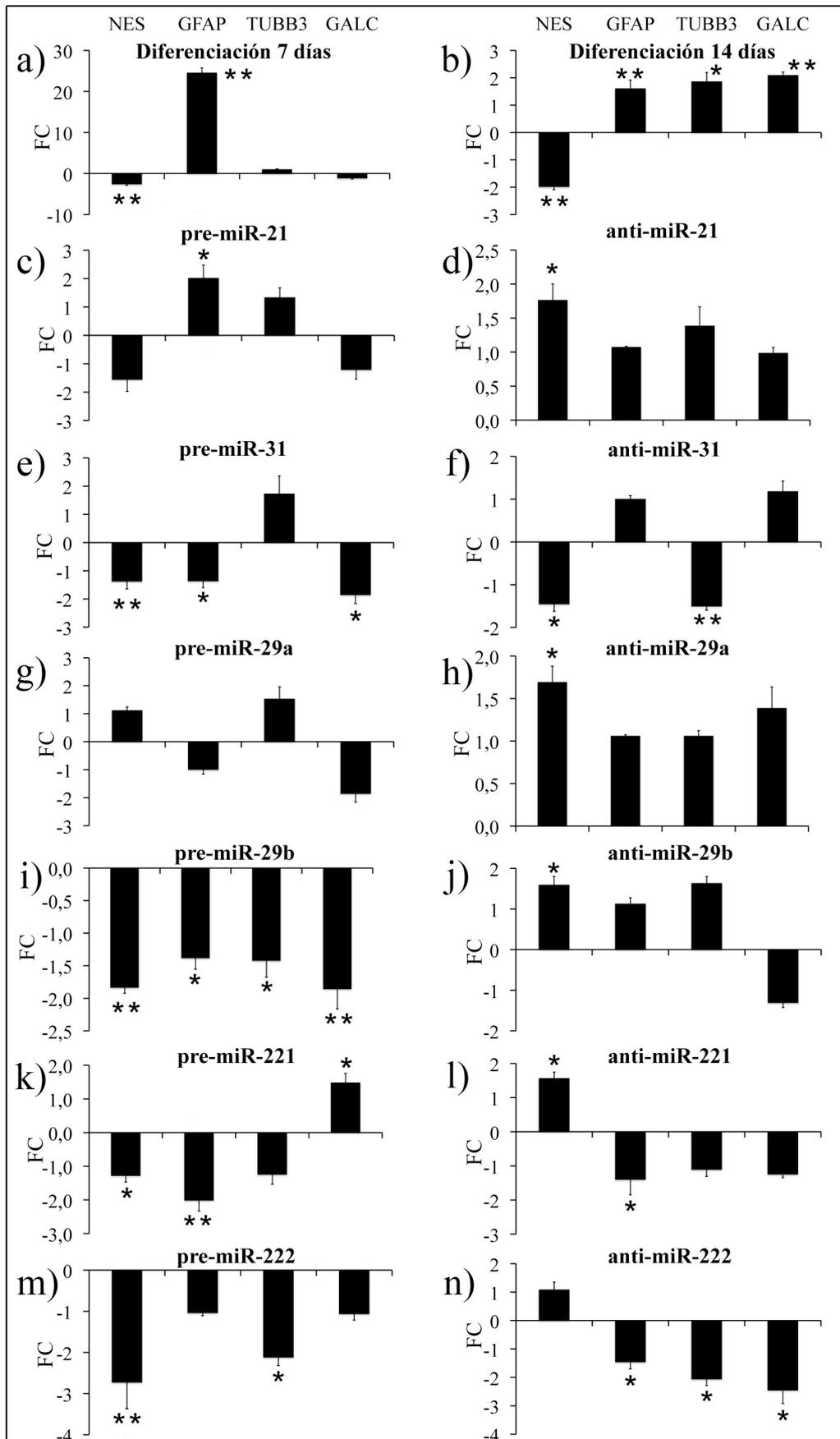


Figura R.18 Marcadores de BTSCs y de los diferentes linajes de diferenciación neural

durante la diferenciación *in vitro* de la línea de BTSCs GN1C y tras su transfección con pre-miRs y anti-miRs. Expresión, estudiada mediante RT-PCR cuantitativa, del marcador de BTSCs, Nestina (*NES*) y los marcadores de diferenciación astrocitaria (*GFAP*), neuronal (*TUBB3*) y oligodendroglial (*GALC*) **a)** durante la diferenciación *in vitro* de las células GN1C a los 7 días, y **b)** a los 14 días de cultivo; **(c, e, g, i, k, m)** tras transfectar los pre-miRNAs en las células GN1C en estado de neuroesferas, seguido de 7 días de crecimiento en medio de proliferación, y **(d, f, h, j, l, n)** tras 14 días creciendo en medio de diferenciación después de inhibir los miRNAs mediante transfección de las neuroesferas con los correspondientes anti-miRs. Los datos se presentan como *fold change* (FC) referido al estado de neuroesfera en los controles de diferenciación **(a y b)**, o con respecto a la línea transfectada con el control negativo de pre-miRs **(c, e, g, i, k, m)** o anti-miRs **(d, f, h, j, l, n)**. *, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; las comparaciones restantes no mostraron diferencias significativas.

Los mismos experimentos de transfección de pre-miRs y anti-miRs se realizaron en la línea G52. Esta línea, sin transfectar, mostró una disminución estadísticamente significativa en la expresión del marcador de células indiferenciadas, Nestina, a los 7 días de crecimiento en medio de diferenciación, con valores de expresión 4,42 veces inferiores a los hallados en el estado de neuroesfera ($p=0,049$; Figura R.19.a). Asimismo, presentó un incremento de una media de 1,59 veces en la expresión *GALC* ($p=0,047$, Figura R.19.a). Al comparar este perfil de expresión con la línea G52 transfectada con cada pre-miR, la tendencia más similar se observó al transfectar pre-miR-21 en esta línea y mantenerla 7 días en cultivo con medio de proliferación. En concreto, los niveles de *GALC* se incrementaron de manera estadísticamente significativa 2,43 veces ($p=0,041$) con respecto a los de la línea transfectada con el control negativo de pre-miRs, sin embargo, los valores de expresión de Nestina no mostraron cambios apreciables (Figura R.19.c). Estos datos evidencian una tendencia similar a lo que ocurre en la diferenciación normal de estas células, por lo que miR-21 podría estar implicado en la diferenciación de esta línea de BTSCs, al igual que ocurría en la línea GN1C. Asimismo, se detectó un aumento estadísticamente significativo del marcador oligodendrocitario *GALC* (13,63 veces; $p<0,001$) respecto al control negativo al transfectar la línea G52 con pre-miR-31. Por otro lado, las transfecciones con pre-mi-

29a y pre-miR-29b produjeron la inducción de diferenciación, aumentando los niveles de expresión de *GFAP* y especialmente los de *GALC*, 2,49 veces en el caso de pre-miR-29a ($p=0,003$; Figura R.19.g) y 3,5 veces en el caso de pre-miR-29b ($p=0,035$; Figura R.19.i). Además, tras observar las células transfectadas bajo el microscopio óptico, se apreció un incremento de muerte celular similar al observado en la línea GN1C.

Al igual que observamos para la línea GN1C, los niveles de expresión de marcadores en la línea G52 después de su crecimiento en medio de diferenciación durante 14 días presentaron un patrón de expresión de marcadores relativamente distinto al observado a los 7 días de diferenciación. Así, la disminución en la expresión de Nestina respecto al estado de neuroesfera fue menos marcada que a los 7 días (1,62 vs. 4,42 veces inferior) (Figura R.19.b), mientras que todos los marcadores de diferenciación aumentaron a niveles iguales o superiores que a los 7 días: para *GFAP* el incremento medio fue de 2,38 veces respecto a la expresión en estado de neuroesfera ($p=0,042$); para *TUBB3* 1,56 veces ($p=0,047$) y para *GALC* 2,47 veces ($p=0,01$). Al comparar este perfil de expresión con el de la misma línea transfectada con los distintos anti-miRs, observamos que la transfección con anti-miR-31 fue capaz de invertir estos cambios (Figura R.19.f); mostrando disminuciones relevantes en la expresión de los marcadores de diferenciación *GFAP* (media de 2,16 veces; $p=0,005$), *TUBB3* (media de 3,11 veces; $p<0,001$) y *GALC* (media de 2,45 veces, $p=0,045$) (Figura R.19.f) respecto a los valores del control negativo. Estos resultados de bloqueo de la diferenciación al inhibir miR-31 en la línea G52, junto a los resultados de inducción de la diferenciación al sobreexpresar miR-31 previamente comentados, sugieren que miR-31 podría estar implicado en la diferenciación de la línea de BTSCs G52. Asimismo, la transfección de G52 con anti-miR-29a y anti-miR-29b también pareció revertir la diferenciación a los

14 días (Figura R.19.h, j), especialmente en el caso de anti-miR-29b, con un nivel de *TUBB3* 3,3 veces inferior al del control negativo ($p=0,002$, R.19.j).

En el caso de la línea G52, la transfección con anti-miR-221 y anti-miR-222, no produjo un efecto de reversión de la diferenciación a los 14 días (Figura R.19.l, n), en contraste con lo observado en la línea GN1C. Este hecho podría deberse a que ambas líneas muestran una diferenciación a linajes celulares distintos.

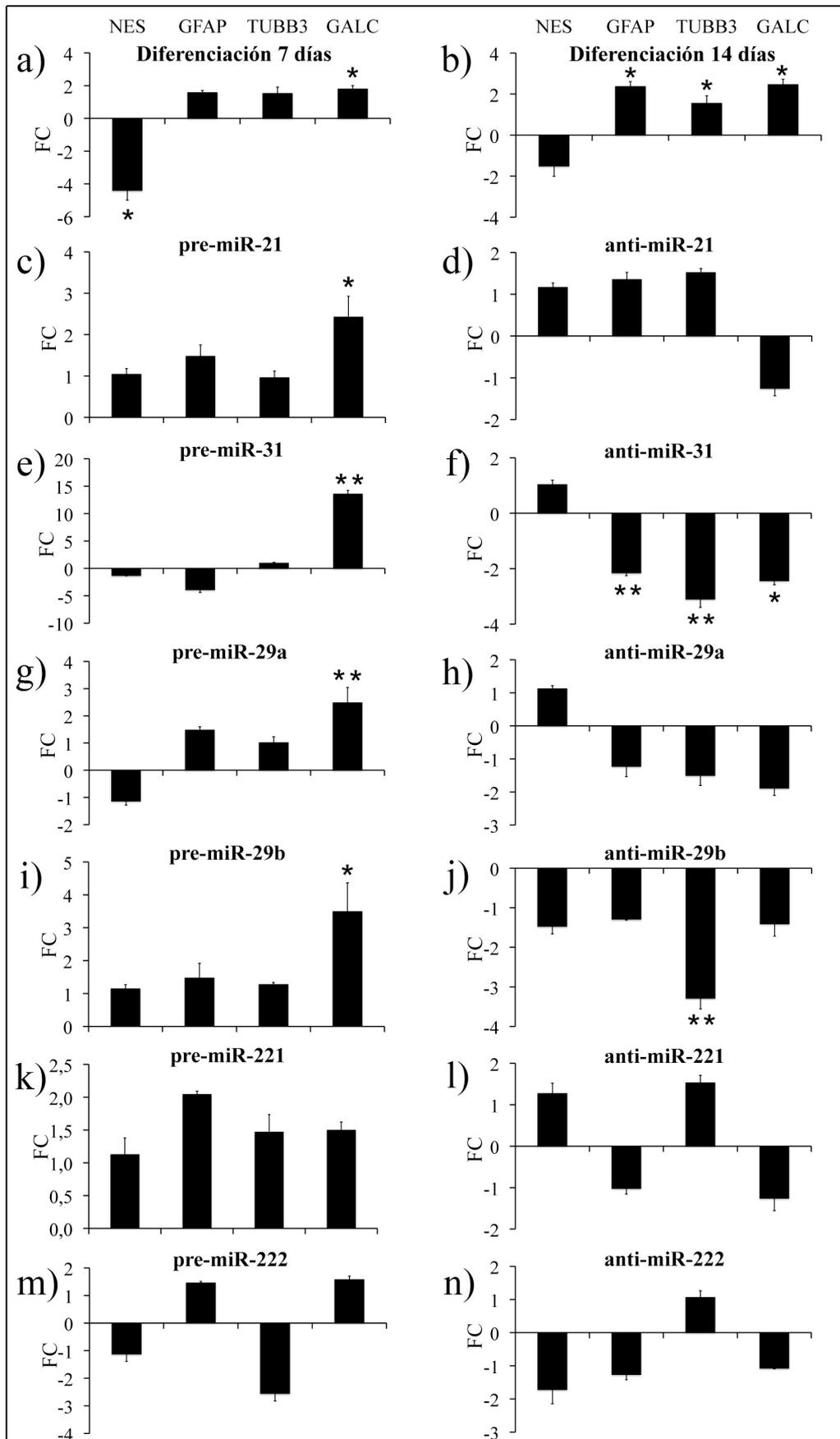


Figura R.19 Marcadores de BTSCs y de los diferentes linajes de diferenciación neural

durante la diferenciación *in vitro* de la línea de BTSCs G52 y tras su transfección con pre-miRs y anti-miRs. Expresión, estudiada mediante RT-PCR cuantitativa, del marcador de BTSCs, Nestina (*NES*) y los marcadores de diferenciación astrocitaria (*GFAP*), neuronal (*TUBB3*) y oligodendroglial (*GALC*) **a)** durante la diferenciación *in vitro* de las células G52 a los 7 días, y **b)** a los 14 días de cultivo; **(c, e, g, i, k, m)** tras transfectar los pre-miRNAs en las células G52 en estado de neuroesferas, seguido de 7 días de crecimiento en medio de proliferación, y **(d, f, h, j, l, n)** tras 14 días creciendo en medio de diferenciación después de inhibir los miRNAs mediante transfección de las neuroesferas con los correspondientes anti-miRs. Los datos se presentan como *fold change* (FC) referido al estado de neuroesfera en los controles de diferenciación **(a y b)**, o con respecto a la línea transfectada con el control negativo de pre-miRs **(c, e, g, i, k, m)** o anti-miRs **(d, f, h, j, l, n)**. *, valor de p menor que 0,05; **, valor de p menor que 0,01; las comparaciones restantes no mostraron diferencias significativas.

Para confirmar todos estos resultados, obtenidos cuantificando los marcadores a nivel de mRNA mediante RT-PCR cuantitativa, se analizó la presencia de dichos marcadores a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia.

R.3.2.2.2. Detección de los marcadores de diferenciación a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia

A partir de los resultados obtenidos con las transfecciones de pre-miRs y anti-miRs, se seleccionaron aquellos miRNAs que inducían cambios de expresión relevantes en los marcadores estudiados a nivel de mRNA (ver R.3.2.2.1), y se evaluaron los resultados mediante la técnica de inmunofluorescencia. Esta selección incluyó las transfecciones con pre-miR-21, anti-miR-221 y anti-miR-222 en la línea GN1C. En el caso de la línea G52 se escogió únicamente la transfección con anti-miR-31.

Se analizaron los cambios a nivel de proteína de los marcadores de células indiferenciadas (Nestina) y células diferenciadas del SNC (*GFAP*, *TUBB3* y *O4*) mediante inmunofluorescencia, según el protocolo descrito previamente (ver R.2.1.3), tanto en las células transfectadas con los pre-miRs y los anti-miRs (y sus correspondientes controles negativos) como en células no transfectadas mantenidas en

medio de diferenciación durante 14 días y neuroesferas en medio de proliferación sin transfectar.

La transfección de pre-miR-21 tras 7 días de transfección manteniendo las células en el medio de proliferación mostró una disminución considerable del marcador de células indiferenciadas Nestina (Figura R.20.21) con respecto a la expresión de dicho marcador en las células transfectadas con el control negativo de pre-miRs (Figura R.20.C-). Asimismo, la expresión del marcador de diferenciación astrocitaria GFAP, presentó un notable incremento en la línea transfectada con pre-miR-21 (Figura R.20.21), respecto a la expresión de dicho marcador en las células transfectadas con el control negativo de pre-miRs (Figura R.20.C-). En el caso de la expresión de TUBB3 se apreció un aumento leve en la transfección de pre-miR-21 (Figura R.20.21), respecto a su expresión en el control negativo (Figura R.20.C-); mientras que no se observaron variaciones en los niveles de expresión de GALC (Figura R.20.C-, 21). Todos estos cambios de expresión son paralelos a los que se observan en la línea GN1C sin transfectar crecida en medio de diferenciación durante 14 días (Figura R.20.MD). Por tanto, la sobreexpresión de miR-21 es capaz de poner en marcha el mecanismo de diferenciación molecular de esta línea hacia astrocitos, aunque sin llegar a inducir el cambio de morfología asociado con la diferenciación a estas células.

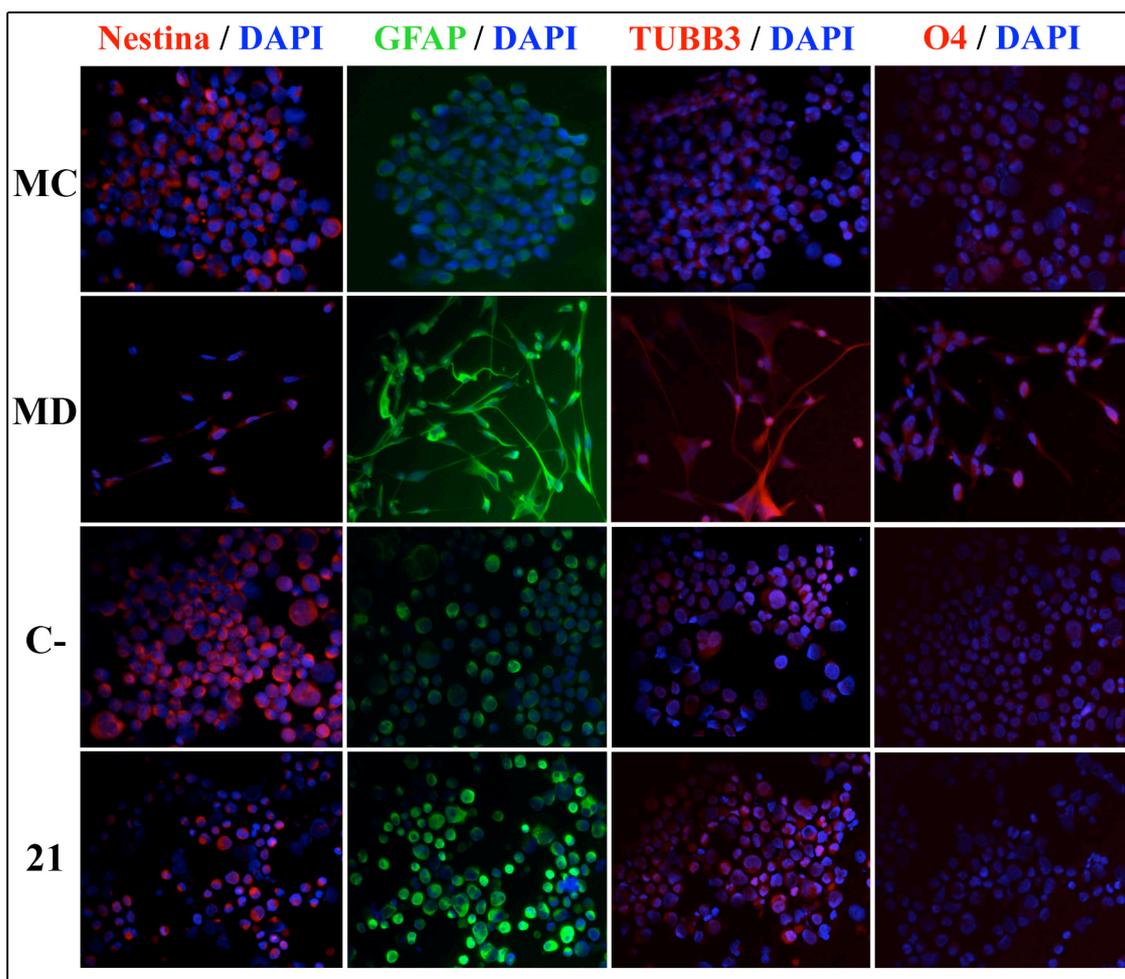


Figura R.20 Inmunofluorescencia para visualizar las proteínas marcadoras de BTSCs y de los principales linajes de células diferenciadas del SNC, tras la transfección de la línea de BTSCs GN1C con precursores de miRNAs. Se estudió la expresión de proteínas marcadoras del estado de BTSCs indiferenciadas, Nestina, y de diferenciación astrocitaria, GFAP; neuronal, TUBB3; y oligodendrocitaria, O4, en las células GN1C transfectadas con los precursores pre-miR control negativo (C-) y pre-miR-21 (**21**) a los 7 días de la transfección, para compararlas en paralelo con las células sin transfectar creciendo como neuroesferas en medio de proliferación (**MC**) y con las células crecidas en medio de diferenciación (**MD**) durante 14 días. Se utilizó DAPI para el contraste nuclear. Todas las imágenes están tomadas a una magnificación de 40X, y un tiempo de exposición de 0,2 segundos en el caso de Nestina y O4, y 0,12 segundos en el caso de GFAP y TUBB3.

A continuación se estudió el efecto de las transfecciones de anti-miRs de miR-221 y miR-222 en la línea GN1C en estado diferenciado. Los niveles de expresión proteica del marcador de células indiferenciadas Nestina aumentaron levemente en la transfección con anti-miR-221 (Figura R.21.221) y de forma notable en la transfección

con anti-miR-222 (Figura R.21.222), respecto a las células transfectadas con el control negativo de anti-miRs (Figura R.21.C-). Al mismo tiempo, se observó una disminución en la expresión del marcador astrocítico GFAP en las células transfectadas con estos anti-miRs. No se apreciaron diferencias detectables en los niveles de expresión de TUBB3 y GALC. Se observaron cambios notables en la morfología de las células diferenciadas al transfectarlas con anti-miR-221 y anti-miR-222: mientras que las células no transfectadas o transfectadas con el control negativo mostraron abundantes prolongaciones citoplasmáticas similares a las de los astrocitos y a las de las neuronas, estas prolongaciones se vieron severamente acortadas 14 días después de la transfección con estos anti-miRs, especialmente con anti-miR-222.

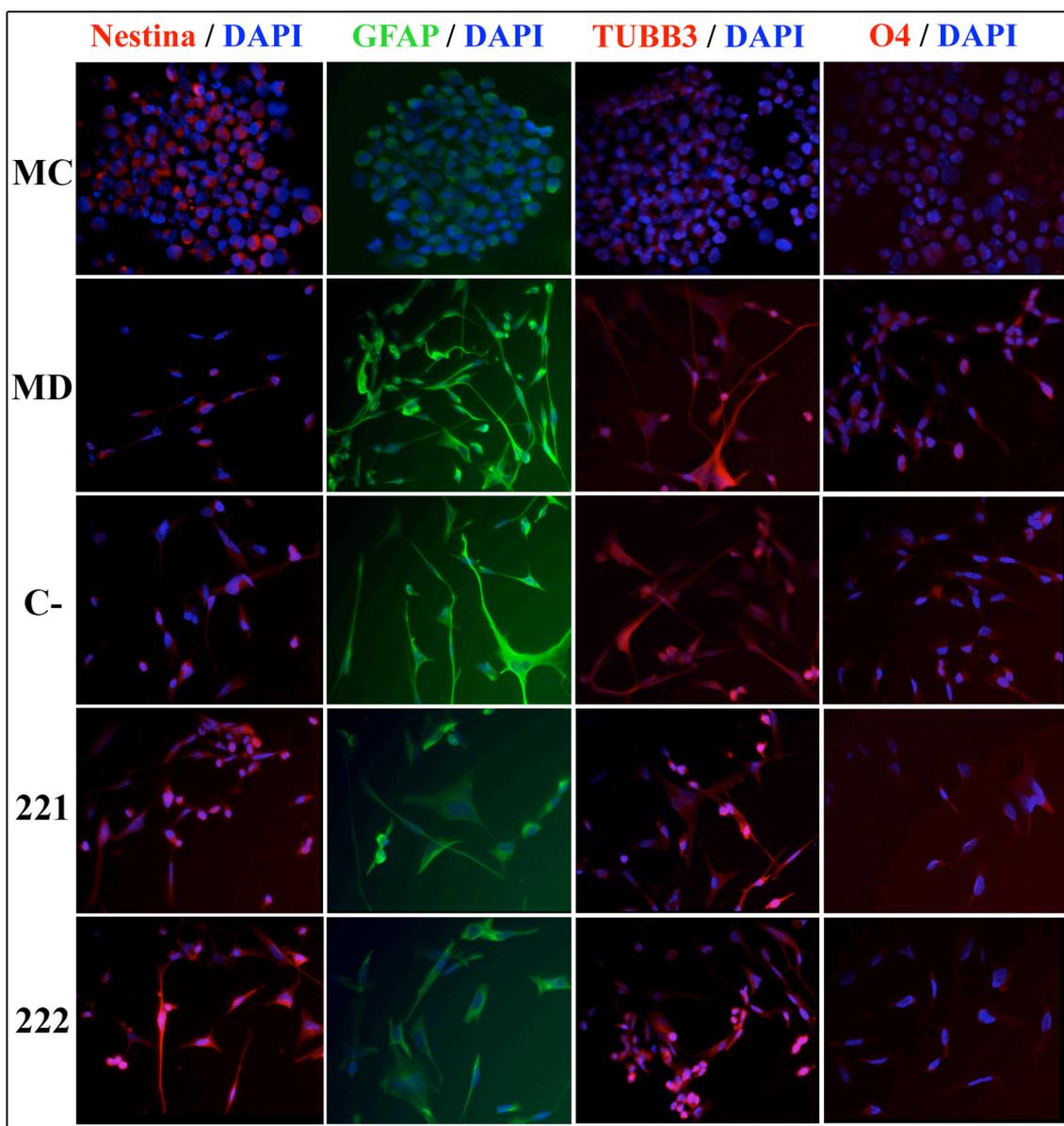


Figura R.21 Inmunofluorescencia para visualizar las proteínas marcadoras de BTSCs y de los principales linajes de células diferenciadas del SNC, tras la transfección de la línea de BTSCs GN1C con inhibidores de miRNAs. Se estudió la expresión de las proteínas marcadoras del estado de BTSCs indiferenciadas, Nestina, y de diferenciación astrocitaria, GFAP; neuronal, TUBB3; y oligodendrocitaria, O4, en las células GN1C transfectadas con los inhibidores anti-miR control negativo (C-), anti-miR-221 (221) y anti-miR-222 (222), a los 14 días de la transfección, para compararlas en paralelo con las células sin transfectar creciendo como neuroesferas en medio de proliferación (MC) y con las células crecidas en medio de diferenciación (MD) durante 14 días. Se utilizó DAPI para el contraste nuclear. Todas las imágenes están tomadas a una magnificación de 40X, y un tiempo de exposición de 0,2 segundos en el caso de Nestina y O4, y 0,12 segundos en el caso de GFAP y TUBB3.

El estudio de los efectos de la transfección de la línea G52 con anti-miR-31 no se pudo llevar a cabo a nivel de proteína porque no se consiguió optimizar la técnica de inmunofluorescencia en esta línea.

A continuación se procedió al estudio del posible efecto de inducción de muerte celular observado en las líneas de BTSCs tras transfectar pre-miR-29a y pre-miR-29b.

R.3.2.3. Análisis de viabilidad celular de las células transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b

En primer lugar se analizó la viabilidad de las células transfectadas mediante el ensayo de MTS. Este compuesto únicamente puede ser procesado por las células metabólicamente activas, dando lugar a un producto que puede medirse colorimétricamente en un espectrofotómetro (ver M.10). De esta forma, a mayor número de células vivas, mayor intensidad de color y mayor densidad óptica registrada.

Estos estudios de viabilidad celular se llevaron a cabo en las líneas de BTSCs GN1C y G63, tras transfectar pre-miR-29a, pre-miR-29b o el control negativo de pre-miRs, en el estado de neuroesfera y mantener las células en medio de proliferación durante 4 días. El análisis de los resultados confirmó una disminución estadísticamente significativa en el número de células vivas al transfectar pre-miR-29a tanto en la línea GN1C (34%, $p=0,001$, figura R.22.a) como en la línea G63 (15%, $p=0,003$, figura R.22.b), respecto a la viabilidad de las células transfectadas con el control negativo. En el caso de la transfección con pre-miR-29b, línea G63 también mostraba un descenso estadísticamente significativo en la viabilidad celular (28%, $p=0,002$, figura R.22.b), mientras que la disminución de la viabilidad en la línea GN1C no alcanzó diferencias estadísticamente significativas (17%, $p=0,29$), probablemente debido a variabilidad de los datos (Figura R.22.a).

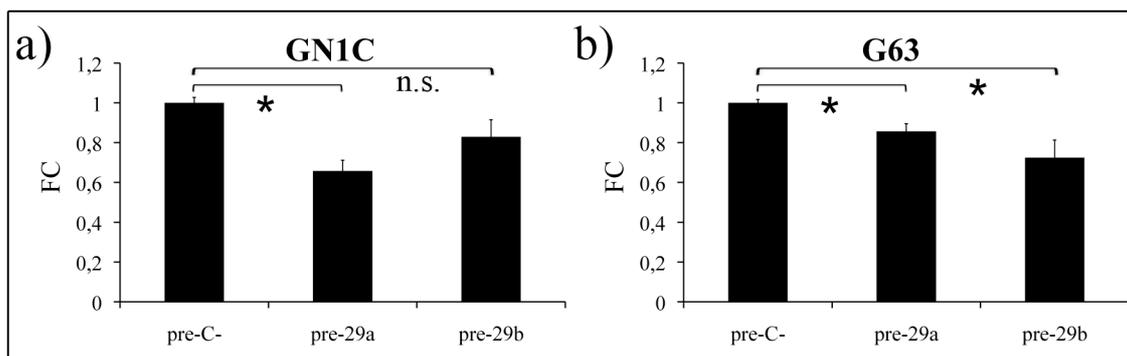


Figura R.22 Ensayo de viabilidad celular mediante MTS de las células GN1C y G63, 4 días después de ser transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b. Análisis de 3 experimentos independientes de transfección de los precursores de miRNA, pre-miR-29a (pre-29a) y pre-miR-29b (pre-29b), y el control negativo de pre-miR (pre-C-) en las líneas de BTSCs **a)** GN1C y **b)** G63. Se representa la media de los 3 experimentos junto con el error estándar de la media. *, valor de p menor que 0,05; n.s., valor de p no significativo.

Estos resultados indican que el cluster de miRNAs miR-29a y miR-29b, y en especial miR-29a, disminuye la viabilidad celular en las líneas de BTSCs analizadas. Por tanto, se decidió continuar estos estudios con ensayos de detección de muerte celular o apoptosis.

R.3.2.4. Análisis de muerte celular de las células transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b

Se realizaron análisis de las células transfectadas teñidas con anexina y yoduro de propidio (IP) por citometría de flujo, así como estudios de detección de proteínas implicadas en apoptosis mediante *Western blot*.

R.3.2.4.1. Análisis de muerte celular mediante citometría de flujo

Se analizó la muerte celular en las líneas de BTSCs GN1C y G63 mediante citometría de flujo utilizando el kit de marcaje *Annexin V-FITC* (ver M.11), 4 días después de la transfección de pre-miR-29a, pre-miR-29b, o el control negativo de pre-miRs.

En las figuras siguientes se muestra un experimento representativo para cada línea de BTSCs, GN1C (R.23) y G63 (R.24).

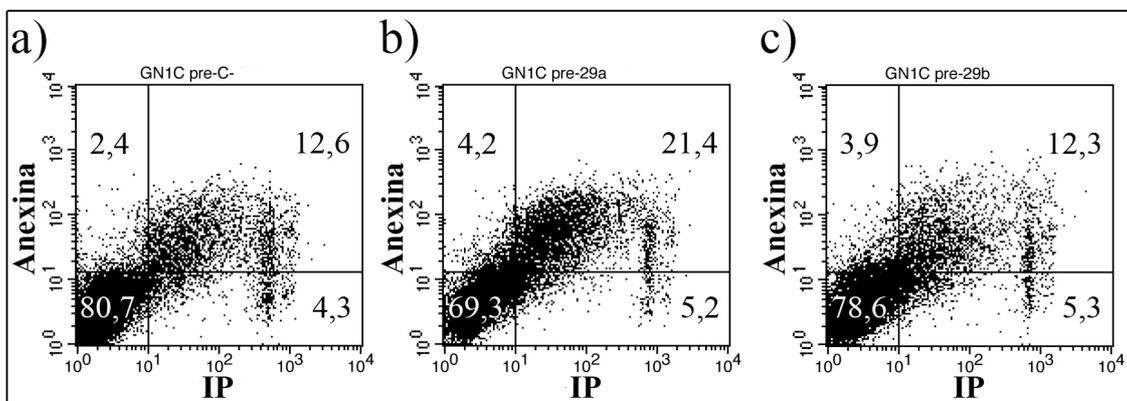


Figura R.23 Estudio mediante citometría de flujo de la muerte celular en las células BTSCs GN1C transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b. Se muestra un experimento representativo del análisis de muerte celular en la línea GN1C 4 días después de ser transfectada con los precursores de miRNAs: **b)** pre-miR-29a (pre-29a), **c)** pre-miR-29b (pre-29b), o **a)** control negativo de pre-miR (pre-C-), tras la tinción con anexina V-FITC (Anexina) y yoduro de propidio (IP). En los cuadrantes se indica el porcentaje de células.

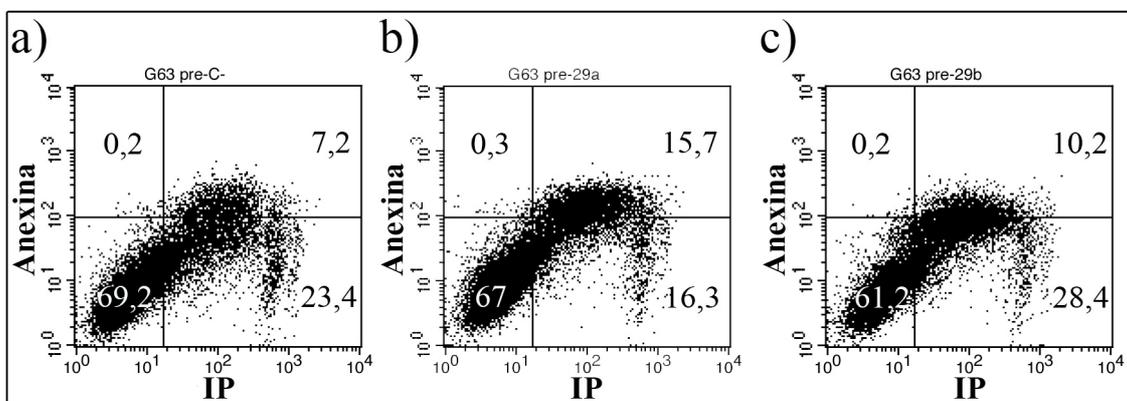


Figura R.24 Estudio mediante citometría de flujo de la muerte celular en las células BTSCs G63 transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b. Se muestra un experimento representativo del análisis de muerte celular en la línea G63 4 días después de ser transfectada con los precursores de miRNAs: **b)** pre-miR-29a (pre-29a), **c)** pre-miR-29b (pre-29b), o **a)** control negativo de pre-miR (pre-C-), tras la tinción con anexina V-FITC (Anexina) y yoduro de propidio (IP). En los cuadrantes se indica el porcentaje de células.

Tras llevar a cabo estos experimentos de transfección y análisis de muerte celular mediante citometría de flujo por triplicado, se analizaron las medias de los resultados obtenidos (Figura R.25).

En el caso de la línea GN1C (Figura R.25.a) las células vivas descendieron desde una media de 80,6% en la línea transfectada con el control negativo de pre-miRs, hasta 70,5% en la línea transfectada con pre-miR-29a y 75,2% con pre-miR-29b. El porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina +, IP -) no varió prácticamente, siendo de alrededor del 3%. Con respecto a la apoptosis tardía (Anexina +, IP +), la línea transfectada con pre-miR-29a mostró un leve aumento (13,6%) respecto al control negativo (10,9%); sin embargo, no sucedió así en el caso de pre-miR-29b (10,5%). Al analizar las células muertas por procesos diferentes a apoptosis (Anexina-, IP +), se observó un incremento tras transfectar con pre-miR-29a y pre-miR-29b, con valores de 12,7% y 11,9%, respectivamente, mientras que el control negativo presentó un 4,94% células en este estado.

Los estudios realizados con la línea de BTSCs G63 (Figura R.25.b) muestran resultados similares a los de GN1C. Las células vivas tras la transfección con el control negativo resultaron ser un 68% de la población celular. Tras la transfección con pre-miR-29a, este porcentaje disminuyó prácticamente un 20%, hasta el 49,4%, mientras que después de transfectar las células con pre-miR-29b apenas se observaron cambios con respecto al control (66,1%). Los porcentajes de células en apoptosis temprana permanecieron inalterables, en torno al 1% en todos los casos. Con respecto a la apoptosis tardía, se apreció un ligero incremento tras la transfección con pre-miR-29a (17,1%) respecto al control negativo (14%), pero con pre-miR-29b no se observó este efecto (9,9%). Por último, tal y como ocurría en la línea GN1C (Figura R.25.a), el mayor cambio se encontró en las células muertas por procesos diferentes a la apoptosis.

Así, tras la transfección con pre-miR-29a estas células representaron el 30,6% del total, prácticamente el doble que en línea transfectada con el control negativo (16,7%). En el caso de pre-miR-29b también se observó este aumento, aunque en menor medida, ya que las células muertas por procesos diferentes a apoptosis constituyeron el 20,7% de la población celular.

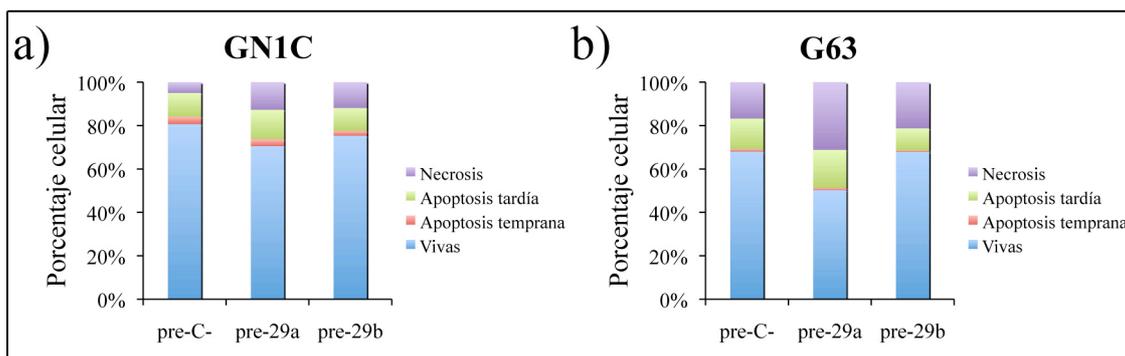


Figura R.25 Análisis de muerte celular en las líneas de BTSCs GN1C y G63 4 días después de la transfección con pre-miR-29a y pre-miR-29b, mediante citometría de flujo. Se muestran las medias de 3 experimentos independientes de citometría, tras la tinción con, anexina V-FITC y yoduro de propidio, en las BTSCs **a)** GN1C y **b)** G63, 4 días después de haber transfectado los precursores de miRNAs, pre-miR-29a (pre-29a) y pre-miR-29b (pre-29b), así como el control negativo de pre-miRs (pre-C-).

En resumen, tanto la línea GN1C como la línea G63 mostraron un leve aumento de la apoptosis tardía y un notable aumento de la muerte celular no apoptótica (necrosis) tras ser transfectadas con pre-miR-29a. En el caso de pre-miR-29b se observó la misma tendencia, aunque los cambios no fueron tan evidentes.

Para completar el estudio de la muerte celular inducida por miR-29a y miR-29b en las BTSCs se analizaron los cambios de expresión de algunas proteínas implicadas en apoptosis mediante *Western blot*.

R.3.2.4.2. Análisis de expresión de proteínas implicadas en apoptosis

Se estudiaron los cambios de expresión de dos proteínas relacionadas con la apoptosis, PARP y MCL1, en las líneas transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b.

PARP (polimerasa poli-(ADP-ribosa)) es una proteína nuclear que está implicada en la reparación del DNA en respuesta a estrés medioambiental (Satoh & Lindahl, 1992). Esta proteína puede ser escindida por numerosas caspasas *in vitro* (Lazebnik *et al.*, 1994; Cohen, 1997) y es una de las principales dianas de corte de caspasa-3 *in vivo* (Nicholson *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995), por lo que es marcadora de las células que están sufriendo un proceso de apoptosis (Oliver *et al.*, 1998). Este corte por parte de la caspasa-3 da lugar a un fragmento activo de 89 kDa que colabora en el proceso apoptótico.

MCL1 (*myeloid cell-leukemia-1*) es un miembro anti-apoptótico de la familia de proteínas de BCL2 que tiene un papel crítico en la regulación del equilibrio entre las señales de supervivencia y las de muerte celular (Yip & Reed, 2008). Los miembros de la familia anti-apoptótica de BCL2 se encuentran desregulados frecuentemente en diversos cánceres humanos (Backus *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2005), y muy recientemente se ha descrito que MCL1 es la proteína de la familia de BCL2 con mayor sobreexpresión en pacientes de GBM (Day *et al.*, 2011). Además, está descrito que el *cluster* miR-29 regula la expresión de MCL1 y el proceso de apoptosis (Mott *et al.*, 2007). Por todos estos motivos, resultaba de gran interés estudiar la expresión de MCL1 en las líneas de BTSCs transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b.

En el caso de la línea de BTSCs GN1C, las muestras transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b presentaron un ligero aumento del fragmento escindido de PARP (89 kDa), respecto a los niveles de dicha proteína en la línea transfectada con el control

negativo (Figura R.26). Este hecho va en consonancia con el leve aumento de apoptosis observado mediante citometría de flujo en esta línea (ver R.3.2.4.1). Con respecto a la proteína anti-apoptótica MCL1, la línea GN1C transfectada con pre-miR-29a y pre-miR-29b exhibió una disminución considerable de los niveles de expresión de la proteína en ambos casos (Figura R.26).

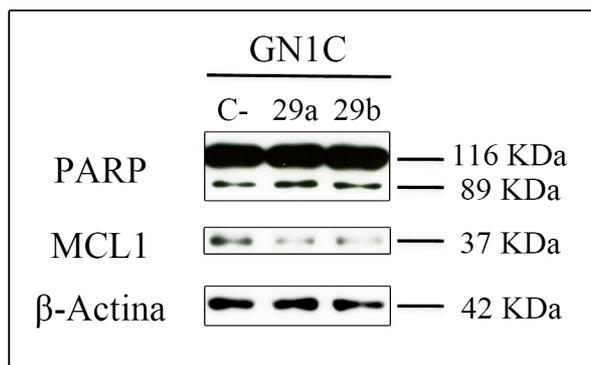


Figura R.26 Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea de BTSCs GN1C 4 días después de la transfección con pre-miR-29a y pre-miR-29b. Se analizaron mediante *Western blot* los niveles de proteínas de MCL1 y PARP, respecto al control endógeno de β -Actina, en la línea de BTSCs GN1C 4 días después de la transfección con los precursores de miRNAs control negativo (C-), pre-miR-29a (29a) y pre-miR-29b (29b). La proteína PARP presenta una forma larga inactiva de 116 KDa y una forma digerida, activa, de 89 KDa.

En el caso de la línea de BTSCs G63, las muestras transfectadas con pre-miR-29a y pre-miR-29b presentaron un aumento claro de los niveles de la proteína marcadora de apoptosis PARP, en su estado activo de 89 KDa (Figura R.27). Con respecto a la proteína anti-apoptótica MCL1, no se observaron los mismos efectos de disminución que los obtenidos con la línea GN1C (Figura R.26), quizá porque el nivel basal de la proteína en el control negativo era mucho menor (Figura R.27), pero si se aprecia una leve disminución de esta proteína tras la transfección con pre-miR-29a.

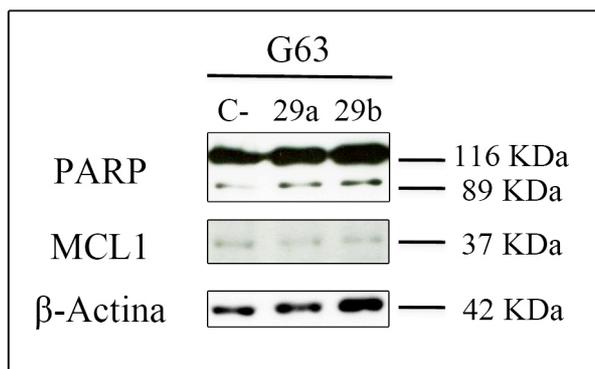


Figura R.27 Expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis en la línea de BTSCs G63 4 días después de la transfección con pre-miR-29a y pre-miR-29b. Se analizaron mediante *Western blot* los niveles de proteínas de MCL1 y PARP, respecto al control endógeno de β-Actina, en la línea de BTSCs G63 4 días después de la transfección con los precursores de miRNAs control negativo (C-), pre-miR-29a (29a) y pre-miR-29b (29b). La proteína PARP presenta una forma larga inactiva de 116 KDa y una forma digerida, activa, de 89 KDa.

En resumen, las líneas de BTSCs estudiadas presentaron un leve aumento de la proteína marcadora de apoptosis PARP, y la línea GN1C presentó una expresión de MCL1 menor, cuando se induce la expresión de miR-29a y miR-29b en el estado de neuroesfera. Estos resultados, junto con los de citometría del apartado anterior (ver R.3.2.4.1), apoyan la función de miR-29a y miR-29b como inductores de muerte celular en las líneas de BTSCs.

R.3.3. Análisis de las posibles rutas moleculares implicadas en la diferenciación de las BTSCs y su relación con microRNAs que se expresan diferencialmente durante este proceso

El siguiente paso de este trabajo consistió en analizar las rutas moleculares que podrían estar implicadas en la diferenciación de las BTSCs, para poder relacionarlas con los miRNAs que se expresan diferencialmente durante este proceso. Para ello se llevó a cabo un análisis global de la expresión génica antes y después del proceso de diferenciación mediante hibridación de microarrays de expresión.

R.3.3.1. Análisis de los cambios de expresión génica durante la diferenciación de las BTSCs mediante *high-throughput screening* con microarrays

Se estudiaron los cambios de expresión génica entre el estado de neuroesfera y el estado de 4 días de diferenciación, en 4 líneas de BTSCs derivadas de pacientes de GBM obtenidas en el laboratorio: G48, G52, G59 y G63. Para ello, los RNAs de estas muestras se hibridaron en el microarray de expresión génica *Human Genome U133 Plus 2.0 array* de Affymetrix, que contiene alrededor de 54000 sondas que detectan la expresión de aproximadamente 38500 genes (ver M.13). Tras el análisis bioinformático de los datos obtenidos en el microarray (ver M.13.1), se obtuvo una lista de 518 genes que incrementaron su expresión con la diferenciación y 415 genes cuya expresión disminuyó.

Esta lista de genes se analizó con el programa bioinformático *IPA 9.0* (ver M.13.1) para tratar de identificar las principales redes de genes, funciones biológicas y rutas moleculares canónicas que sufren cambios durante el proceso de diferenciación (Figura R.28).

Top Networks		
I	Associated Network Functions	Score
D		
1	Genetic Disorder, Neurological Disease, Cellular Assembly and Organization	43
2	Cellular Growth and Proliferation, Cell Death, Cellular Development	42
3	Embryonic Development , Cell Cycle, Hair and Skin Development and Function	31
4	Nucleic Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Organismal Development	29
5	Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry	28
Top Bio Functions		
Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Neurological Disease	2.69E-14 - 3.49E-03	262
Cancer	1.31E-10 - 3.69E-03	222
Genetic Disorder	1.35E-10 - 3.12E-03	378
Cardiovascular Disease	6.57E-10 - 9.24E-04	170
Hematological Disease	6.57E-10 - 3.69E-03	143
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	2.09E-10 - 3.55E-03	128
Cellular development	5.90E-08 - 3.69E-03	169
Cell Death	8.91E-08 - 3.62E-03	171
Cellular Growth and Proliferation	1.26E-06 - 3.69E-03	184
Cellular Assembly and Organization	1.09E-05 - 3.38E-03	76
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Organismal Development	9.57E-09 - 2.95E-03	102
Cardiovascular System Development and Function	2.30E-08 - 3.69E-03	73
Nervous System Development and Function	2.37E-08 - 3.29E-03	124
Tissue Development	1.00E-07 - 3.69E-03	108
Embryonic Development	3.35E-06 - 2.99E-03	59
Top Canonical Pathways		
Name	p-value	# Molecules
Wnt/B-catenin Signaling	2.01E-03	15/174 (0.086)
Methionine Metabolism	3.11E-03	5/78 (0.064)
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	3.64E-03	12/154 (0.078)
Glutamate Receptor Signaling	6.24E-03	7/69 (0.101)
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	8.1E-03	20/332 (0.06)

Figura R.28 Principales redes de genes y rutas moleculares, así como funciones biológicas, que se encuentran alteradas al comparar las muestras de BTSCs en estado indiferenciado y diferenciadas *in vitro* durante 4 días, según el análisis de los datos del microarray de expresión génica con el programa bioinformático *IPA 9.0*. Se resaltan en amarillo las que guardan mayor relación con procesos de desarrollo, diferenciación, malignización y relacionados con el sistema nervioso.

Asimismo, el análisis con el programa *IPA 9.0* permitió identificar los 10 genes con mayor sobreexpresión e inhibición durante el proceso de diferenciación (Figura R.29)

Top Molecules		
Log Ratio up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
AKR1C3	↑6.689	
IL8*	↑6.538	
IL1R1	↑5.466	
ANPEP	↑5.459	
KYNU*	↑5.398	
CYP1B1*	↑5.101	
DKK1	↑5.006	
GULP1*	↑4.922	
VCAM1	↑4.852	
NRG1*	↑4.514	
Log Ratio down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
OLIG1	↓3.583	
OLIG2*	↓2.406	
LPL*	↓2.035	
SLC1A3*	↓1.947	
RGS16*	↓1.902	
FGFBP3	↓1.898	
HSPD1*	↓1.844	
SP8*	↓1.820	
TMOD1*	↓1.784	
SLC1A2*	↓1.770	

Figura R.29 Genes con mayor cambio de expresión entre las muestras en estado indiferenciado y diferenciadas *in vitro* durante 4 días, según el microarray de expresión génica, analizado con el programa bioinformático *IPA 9.0*.

Una vez analizados los cambios en el perfil de expresión génica de las BTSCs durante la diferenciación, se procedió a relacionar estos resultados con los miRNAs que presentaron expresión diferencial durante este proceso (ver R.3.1).

R.3.3.2. Búsqueda bioinformática de posibles genes diana de los miRNA seleccionados entre los genes con expresión diferencial durante el proceso de diferenciación de las BTSCs

En primer lugar se realizó una búsqueda bioinformática de las posibles dianas de los 8 miRNAs validados a partir del microarray de miRNAs (miR-21, miR-31, miR-29a, miR-29b, miR-221, miR-222, miR-93 y miR-106a) en las siguientes bases de datos: miRanda, PicTar, TargetScan y MicroCosm (ver M.14). Una vez obtenida la lista de genes cuya expresión podría estar regulada por estos 8 miRNAs, se comparó con los datos obtenidos del microarray de expresión, teniendo en cuenta el hecho de que la regulación de los miRNAs se produce inhibiendo a sus genes diana.

Así se obtuvo una lista de 230 genes, cuya expresión disminuía durante la diferenciación, que podrían ser genes diana de los 6 miRNAs sobreexpresados durante este proceso (miR-21, miR-31, miR-29a, miR-29b, miR-221 y miR-222). Posteriormente se agruparon los datos de expresión de estos genes mediante un *clustering* jerárquico supervisado (ver M.14) para su representación gráfica (Figura R.30).

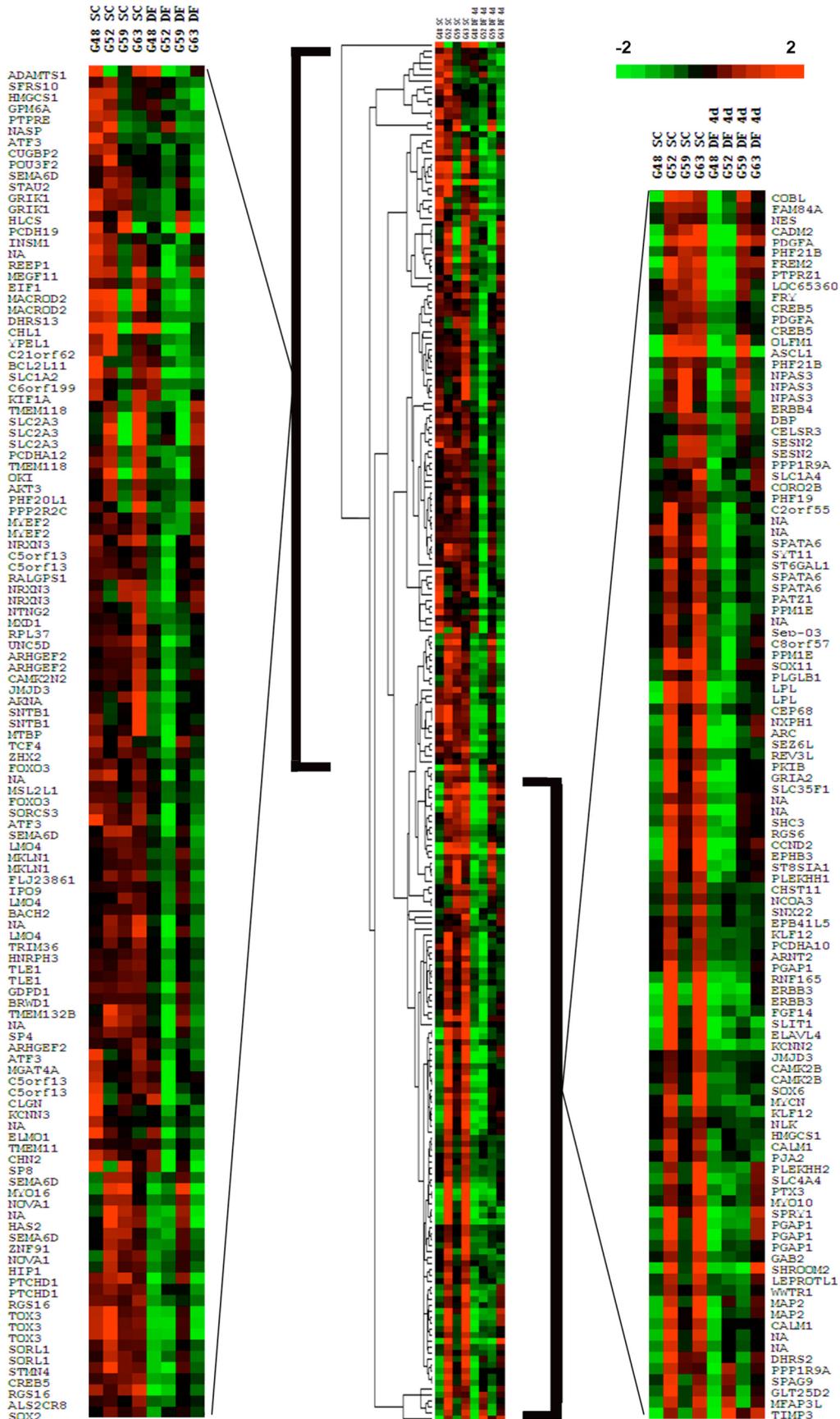


Figura R.30 Representación del *clustering* jerárquico supervisado de los 230 genes cuya expresión se inhibe tras 4 días de cultivo de las BTSCs en medio de diferenciación (DF) con

respecto al estado de neuroesfera (SC), y que además son posibles dianas de 6 microRNAs cuya expresión se incrementa durante el proceso de diferenciación. La intensidad de color corresponde al nivel de expresión de cada gen en escala logarítmica en base 2 normalizado con respecto su valor promedio entre las muestras.

Además se obtuvo una segunda lista de 108 genes: los que aparecían sobreexpresados durante la diferenciación de las BTSCs y además eran posibles genes diana de dos miRNAs cuya expresión se inhibía durante este proceso (miR-93 y miR-106a) Estos datos también se agruparon mediante un *clustering* jerárquico supervisado (ver M.14) para su representación gráfica (Figura R.31).

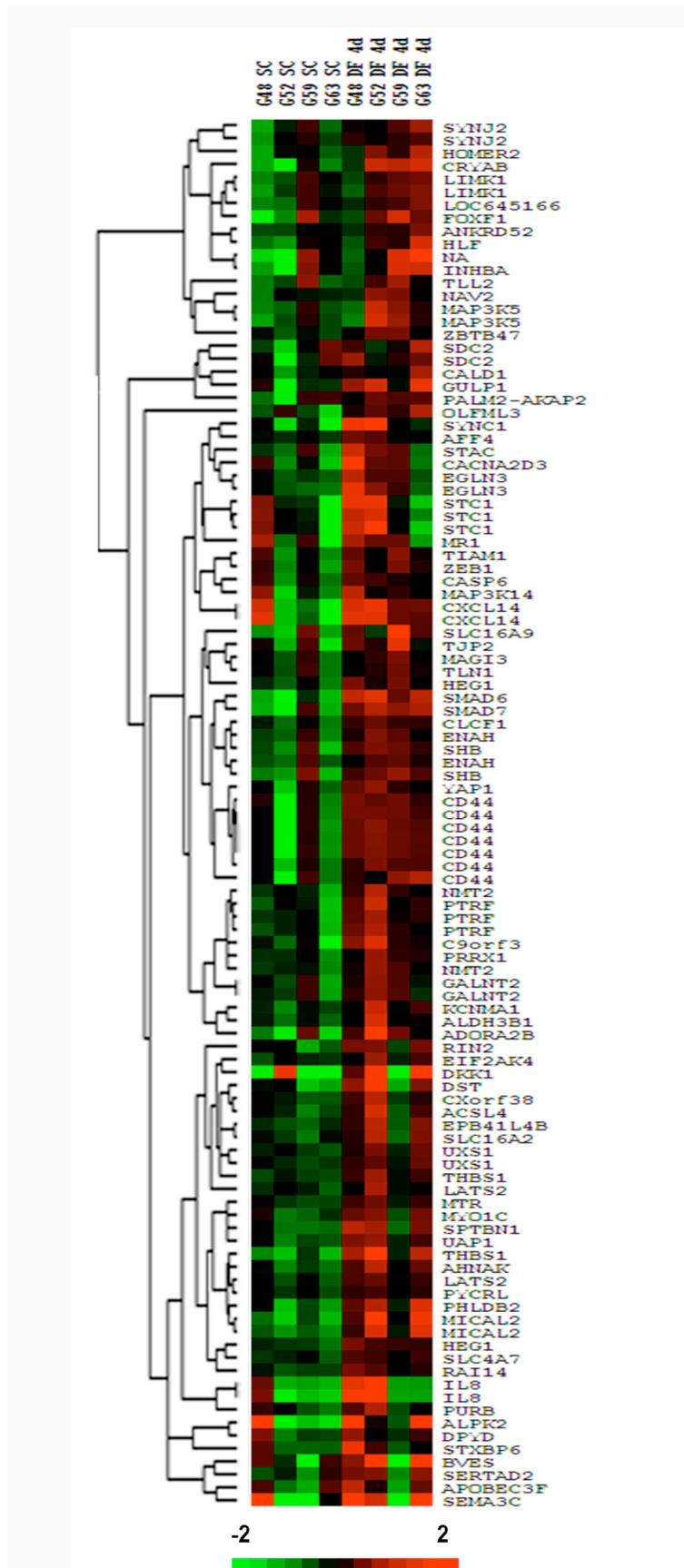


Figura R.31 Representación del *clustering* jerárquico supervisado de los 108 genes cuya expresión aumenta tras 4 días de cultivo de las BTSCs en medio de diferenciación (DF) con respecto al estado de neuroesfera (SC), y que además son posibles dianas de 2 microRNAs cuya

expresión disminuye durante el proceso de diferenciación: hsa-miR-93 y hsa-miR-106a. La intensidad de color corresponde al nivel de expresión de cada gen en escala logarítmica en base 2 normalizado con respecto a su valor promedio entre las muestras.

Posteriormente, se unieron estas dos listas de genes potencialmente regulados por los miRNAs seleccionados y con expresión diferencial en las muestras durante el proceso de diferenciación, y se generó una única lista, que se analizó mediante el programa bioinformático *IPA 9.0*. De esta forma, se descubrieron las principales redes de genes, funciones biológicas y rutas moleculares canónicas alteradas en estos datos (Figura R.32).

Top Networks		
I	Associated Network Functions	Score
D		
1	Cellular Assembly and Organization, Cellular Compromise, Gene Expression	39
2	Genetic Disorder, Neurological Disease, Gastrointestinal Disease	37
3	Cellular Growth and Proliferation, Cell Death, Organ Morphology	35
4	Cell Signaling, Cellular Development, Organismal Survival	31
5	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Gene Expression, Cell Death	28
Top Bio Functions		
Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Neurological Disease	5.54E-10 - 1.66E-02	119
Endocrine System Disorders	5.57E-07 - 1.77E-04	69
Gastrointestinal Disease	5.57E-07 - 1.66E-02	112
Genetic Disorder	5.57E-07 - 1.66E-02	159
Metabolic Disease	5.57E-07 - 1.66E-02	71
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Movement	6.63E-06 - 1.66E-02	49
Cellular Growth and Proliferation	1.79E-05 - 1.66E-02	68
Cellular Development	6.24E-05 - 1.66E-02	65
Cell Cycle	8.71E-05 - 1.66E-02	32
Cell Death	8.71E-05 - 1.66E-02	72
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Tissue Development	7.02E-07 - 1.66E-02	46
Nervous System Development and Function	1.32E-06 - 1.66E-02	61
Organismal Survival	1.69E-04 - 1.50E-02	37
Tissue Morphology	3.55E-04 - 1.66E-02	16
Cardiovascular System Development and Function	7.12E-04 - 1.66E-02	25
Top Canonical Pathways		
Name	p-value	Ratio
Glutamate Receptor Signaling	3.19E-04	6/69 (0.087)
Wnt/B-catenin Signaling	3.93E-04	10/174 (0.057)
B Cell Receptor Signaling	9.19E-03	7/156 (0.045)
Molecular Mechanisms of Cancer	9.83E-03	12/377 (0.032)
Inhibition of Angiogenesis by TSP1	1.71E-02	3/39 (0.077)

Figura R.32 Principales redes de genes y rutas moleculares, así como funciones biológicas, que se encuentran alteradas al comparar las muestras de BTSCs en estado indiferenciado y diferenciadas *in vitro* durante 4 días, según el análisis con el programa bioinformático *IPA 9.0* de los datos obtenidos al combinar los resultados del microarray de miRNAs y del microarray de expresión génica. Se resaltan en amarillo las que guardan mayor relación con procesos de desarrollo, diferenciación, malignización y relacionados con el sistema nervioso.

Los resultados obtenidos de este análisis son similares a los obtenidos al estudiar todos los datos de microarray de expresión génica sin tener en cuenta sólo las posibles

dianas de los miRNAs seleccionados (Figura R.28), lo que podría indicar que la regulación por miRNAs afecta a las funciones más importantes que sufren cambios durante la diferenciación de las BTSCs. Así, dos de las rutas moleculares canónicas alteradas con valores de probabilidad más significativos, se encontraron también entre las obtenidas a partir del estudio del microarray de expresión génica. Son las rutas de Wnt/ β -catenina, con 6 de 69 genes con expresión alterada (Figura R.32 y R.33), y la ruta del receptor del glutamato, con 10 de 174 genes con expresión alterada (Figura R.32 y R.34).

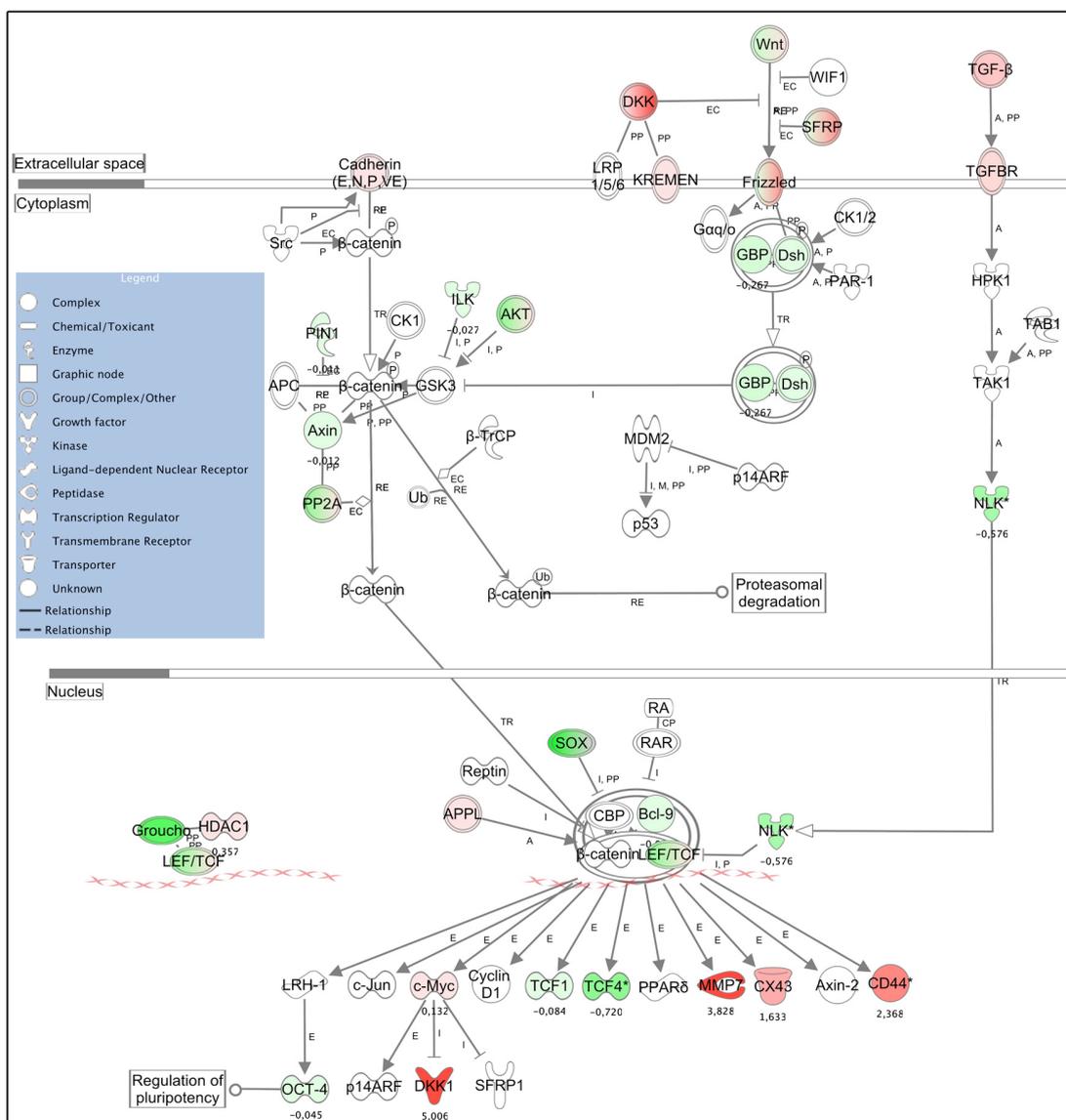


Figura R.33 Imagen de la ruta de Wnt/ β -catenina, con los genes que son posibles dianas de

los miRNAs seleccionados y que presentan expresión diferencial durante la diferenciación de las BTSCs resaltados en color. Esta imagen se ha creado con los datos analizados a través del programa bioinformático IPA 9.0. Se incluyen los valores de expresión relativa de los genes con expresión diferencial, calculados como logaritmo de *fold change* (logFC). El código de colores muestra las moléculas sobreexpresadas en rojo, mientras que las moléculas infraexpresadas aparecen en verde, y las intensidades de color son proporcionales al cambio de expresión.

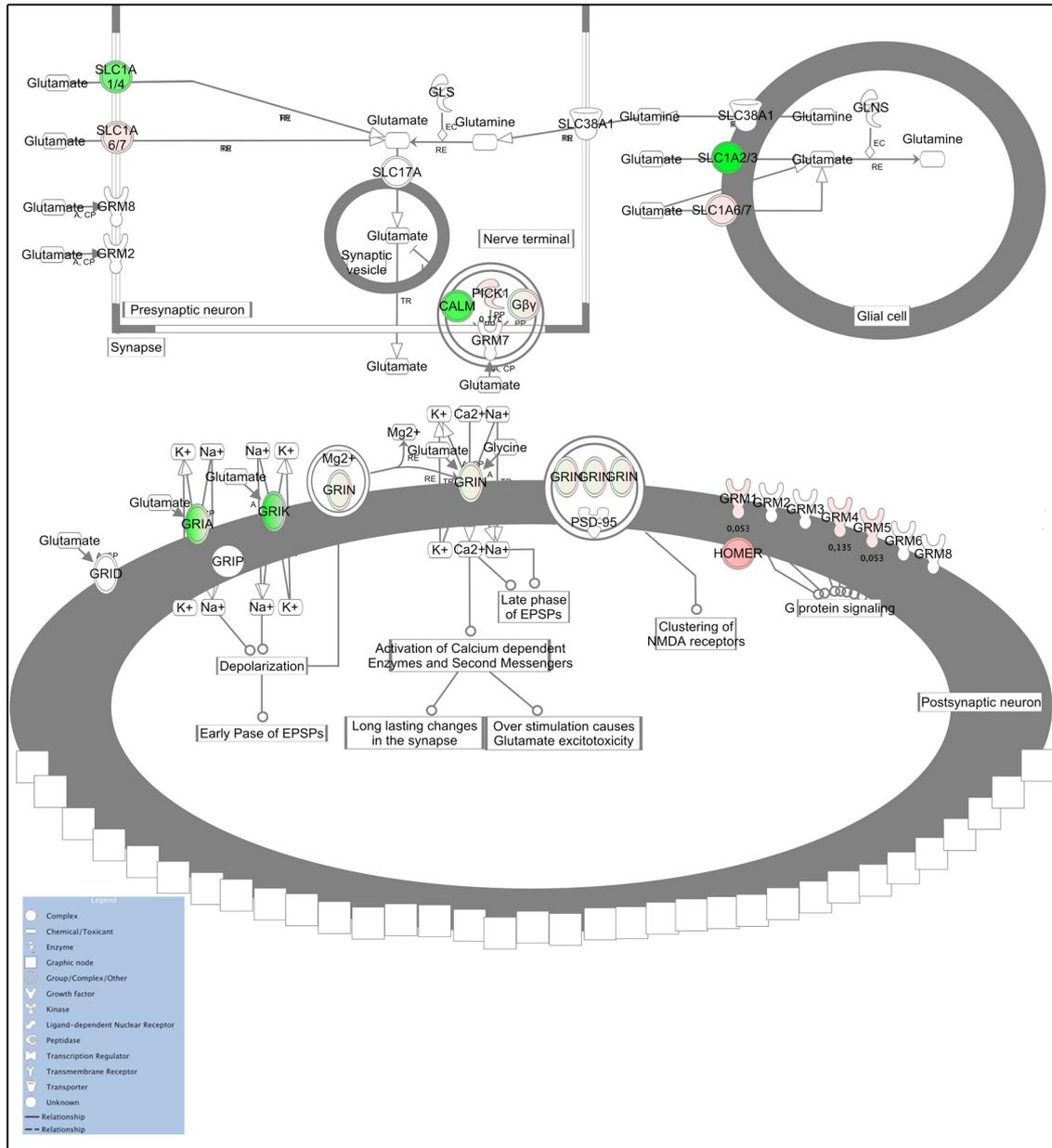


Figura R.34 Imagen de la ruta del receptor del glutamato, con los genes que son posibles dianas de los miRNAs seleccionados y que presentan expresión diferencial durante la diferenciación de las BTSCs resaltados en color. Esta imagen se ha creado con los datos analizados a través del programa bioinformático IPA 9.0. Se incluyen los valores de expresión relativa de los genes con expresión diferencial, calculados como logaritmo de *fold change* (logFC). El código de colores

muestra las moléculas sobreexpresadas en rojo, mientras que las moléculas infraexpresadas aparecen en verde, y las intensidades de color son proporcionales al cambio de expresión.

Por último, el análisis con el programa *IPA 9.0* permitió identificar los 10 genes con mayor sobreexpresión y los 10 con mayor inhibición resultantes de este estudio combinado de los datos de los dos experimentos de microarrays (Figura R.35).

Top Molecules		
Log Ratio up-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
AKR1C3	↑6.689	
IL8*	↑6.538	
IL1R1	↑5.466	
DKK1	↑5.006	
GULP1*	↑4.922	
VCAM1	↑4.852	
CXCL14*	↑4.504	
ALDH3A1	↑4.451	
FHL2	↑4.294	
SEMA3C*	↑4.195	
Log Ratio down-regulated		
Molecules	Exp. Value	Exp. Chart
LPL*	↓2.035	
RGS16*	↓1.902	
SP8*	↓1.820	
MACROD2*	↓1.805	
SLC1A2*	↓1.770	
TOX3*	↓1.752	
ATF3*	↓1.702	
PTCHD1*	↓1.698	
SPRY1*	↓1.614	
MEGF11*	↓1.606	

Figura R.35 Genes con mayor cambio de expresión entre las muestras en estado indiferenciado y diferenciadas *in vitro* durante 4 días, y que además son posibles dianas de los miRNAs seleccionados en este estudio, según el análisis con el programa bioinformático *IPA 9.0*.

DISCUSIÓN

El descubrimiento de la subpoblación de BTSCs dentro de los GBMs (escasa en número, pero resistente a la terapia y con capacidad de regenerar el tumor tras la supresión del tratamiento) sugiere que, tanto su eliminación de forma efectiva como la inducción de su diferenciación en células que pierdan tales capacidades oncogénicas podrían constituir aproximaciones terapéuticas que mejorarían la supervivencia de los pacientes. Por ejemplo, se ha demostrado que la inducción de la diferenciación de BTSCs CD133⁺ de GBM por parte de la proteína 4 morfogenética de hueso (BMP4) es capaz de inhibir el crecimiento tumoral intracerebral de GBM en ratones (Piccirillo *et al.*, 2006). Además de los genes codificantes, distintas moléculas de RNA no codificante podrían tener importancia para inducir la diferenciación terapéutica de las BTSCs. Resultan de especial interés los miRNAs, que son moléculas de RNA de alrededor de 21-23 nucleótidos, capaces de inducir la degradación y/o impedir la traducción de mRNAs al unirse a sus regiones 3' UTR por complementariedad parcial.

Desde el descubrimiento inicial de los miRNAs como responsables de fenotipos mutantes en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*, se ha ido haciendo evidente su papel como reguladores esenciales de los procesos de división de las células madre y del desarrollo de diferentes organismos. Por ejemplo, la anulación de la actividad de la enzima RNasa III Dicer, hecho que impide la biogénesis de miRNAs, interrumpe la división de las células madre de línea germinal en insectos (Hatfield *et al.*, 2005) y células madre embrionarias murinas (Murchison *et al.*, 2005), e impide el desarrollo embrionario temprano en pez cebra (Wienholds *et al.*, 2003) y ratón (Bernstein *et al.*, 2003). Asimismo, se ha descrito que los miRNAs son importantes en la etiología del cáncer, pudiendo actuar como oncogenes o como supresores tumorales. En este sentido, la expresión del cluster de miRNAs miR-17-92 aumenta la angiogénesis tumoral (Dews *et al.*, 2006) y acelera el desarrollo de linfomas de células B inducidos por c-Myc en

ratones (He *et al.*, 2005), mientras que miRNA let-7 regula transcripcionalmente al oncogén *ras* (Johnson *et al.*, 2005) e inhibe el crecimiento de las células de adenocarcinoma pulmonar (Takamizawa *et al.*, 2004). Parece que la disminución de la expresión de miRNAs supresores tumorales es especialmente importante en la transformación tumoral, ya que el bloqueo de la biogénesis de los miRNAs provoca la transformación celular y la tumorigénesis (Kumar *et al.*, 2007). Además, se ha observado una inhibición global de la expresión de miRNAs en múltiples tipos tumorales en comparación con los tejidos normales correspondientes (Lu *et al.*, 2005).

También se ha implicado a los miRNAs en la diferenciación de los cultivos derivados de células madre embrionarias murinas (ES). Por ejemplo, la expresión de miR-124 y miR-9 aumenta durante la diferenciación de progenitores neurales derivados de células ES murinas, y la manipulación experimental de miR-124 y miR-9 induce la diferenciación hacia el linaje neural en los cultivos derivados de estas células ES (Krichevsky *et al.*, 2006). Además, la sobreexpresión de miR-124 induce la diferenciación neuronal en células de neuroblastoma murino y líneas celulares tumorales de ratón embrionarias (Makeyev *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito que las NSCs corticales murinas deficientes en Dicer muestran una diferenciación aberrante y sufren muerte celular cuando se retiran los factores de crecimiento del medio, mientras que en células con Dicer funcional esta falta de factores de crecimiento induce la diferenciación. Este hecho demuestra la implicación de los miRNAs en la regulación de la diferenciación de las NSCs (Kawase-Koga *et al.*, 2010). La gran similitud que existe entre las células NSCs y las BTSCs (Liu *et al.*, 2008) ha llevado a analizar el papel que pueden jugar los miRNAs en la biología de las BTSCs. Silber *et al.* estudiaron 192 miRNAs en las NSCs de ratón y hallaron que miR-124 y miR-137 promueven la parada de ciclo celular en G0/G1 e inducen la diferenciación *neuronal-*

like en las NSCs murinas en ausencia de la señalización de factores de crecimiento. Al trasladar estos estudios a las GBM-BTSCs, observaron el mismo efecto (Silber *et al.*, 2008).

En base a las crecientes evidencias que apoyan el papel de los miRNAs en la promoción de la diferenciación y proliferación de las BTSCs derivadas de pacientes de GBM, en este estudio hemos investigado el papel de los miRNAs en la diferenciación de estas células. Para ello hemos utilizado un modelo de diferenciación de BTSCs desarrollado en colaboración con el laboratorio del Dr. Fernández Luna, en el que ha participado la autora de este trabajo de tesis doctoral (Nogueira *et al.*, 2011). Este modelo emplea un medio de cultivo de inducción de diferenciación *in vitro* ligeramente diferente al que se ha utilizado en otros estudios con BTSCs en forma de neuroesferas, ya que no se retiran los factores de crecimiento FGF2 y EGF del medio de cultivo, sino que se elimina el suplemento B27 y se añade suero de ternera fetal al 10% de concentración. Con esta modificación se busca mantener unas condiciones lo más similares posibles al microambiente tumoral del GBM en el cerebro de los pacientes, donde los factores de crecimiento se encuentran presentes permanentemente y provocan la proliferación de las BTSCs. En este estudio se demuestra que la diferenciación de las BTSCs tiene lugar en esta situación, evidenciándose un cambio de expresión de marcadores de células indiferenciadas y de diferenciación hacia los principales linajes neurales del SNC, tanto a nivel de mRNA como de proteína. Además, este mismo modelo de diferenciación se ha empleado para estudiar los efectos de un inhibidor de la ruta NFκB en la diferenciación de las BTSCs (Nogueira *et al.*, 2011).

Los resultados de nuestro estudio sugieren que los miRNAs podrían jugar un papel importante en el proceso de diferenciación de las BTSCs, ya que los posibles

genes diana de los miRNAs seleccionados forman parte de las mismas rutas que se ven alteradas en el proceso de diferenciación (ver Figura R.28 y Figura R.32).

Otro dato a tener en cuenta es que muchos de los miRNAs que hemos hallado con cambios en la expresión durante la diferenciación de las BTSCs pertenecen a *clusters* de miRNAs, y varios de ellos son *clusters* parálogos entre sí. El miRNA hsa-miR-106a se localiza en el *cluster* miR-106a/363 situado en la región cromosómica Xq26.2 (Fujita *et al.*, 2011), junto con hsa-miR-363, hsa-miR-92-2, hsa-miR-19b-2, hsa-miR-20 y hsa-miR-18b (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). De la misma forma, hsa-miR-106b forma parte del *cluster* miR-106b/25 localizado en la región cromosómica 7q22.1 (Fujita *et al.*, 2011), junto con hsa-miR-25 y hsa-miR-93 (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). Estos dos *clusters* son parálogos entre sí y con un tercer *cluster* de miRNAs, el *cluster* miR-17/92 localizado en la región cromosómica 13q31–q32 (Fujita *et al.*, 2011), que contiene los miRNAs hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR-19b-1 y hsa-miR-92a-1 (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). El hecho de que la mayoría de los miRNAs que componen estos *clusters* parálogos presenten una expresión disminuida en el estado diferenciado de las BTSCs sugiere que estos tres *clusters* parálogos siguen un patrón de expresión similar durante este proceso. De esta forma, se apoya la hipótesis de que estos *clusters* de miRNAs podrían estar implicados en procesos similares y esto sugiere la presencia de redes de regulación coordinadas de miRNAs que podrían jugar papeles importantes durante la diferenciación de las BTSCs, así como ocurre en la diferenciación de los linfocitos, por ejemplo (Malumbres & Lossos, 2010).

Además, los resultados obtenidos tras el *screening* global de expresión de miRNAs en las muestras de BTSCs durante el proceso de diferenciación, muestran que 3 de los miRNAs del *cluster* miR-17/92 se encuentran inhibidos en este proceso (ver

R.3.1.1). Se trata de los miRNAs miR-17, miR-19a y miR-20a. Se ha descrito que en la subclase de precursores oligoneurales de GBM, el oncogén *MYC* presenta amplificación genómica e induce la expresión del *cluster* oncogénico miR-17/92 (Kim *et al.*, 2011). Estos datos sugieren que miR-17/92 podría funcionar como un componente del programa oncogénico de MYC en GBM. Se ha observado además la sobreexpresión del *cluster* miR-17/92 en linfomas de células B (He *et al.*, 2005), cáncer de pulmón (Hayashita *et al.*, 2005), meduloblastoma (Uziel *et al.*, 2009) y cáncer tiroideo anaplásico (Takakura *et al.*, 2008), estando dicha sobreexpresión relacionada con la sobreexpresión de MYC. El *cluster* miR-17/92 es una diana directa de c-Myc (O'Donnell *et al.*, 2005) y colabora con c-Myc en el desarrollo de linfomas de células B (He *et al.*, 2005). En este contexto, miR-17/92 podría proveer a las células de ventajas proliferativas, impidiendo la salida del ciclo celular o la diferenciación. Además de su sobreexpresión en células tumorales, se ha observado que este *cluster* está altamente expresado en células ES murinas y dichos niveles disminuyen durante el desarrollo embrionario en el ratón (Thomson *et al.*, 2004). Concretamente, se ha descrito que este *cluster* se encuentra expresado a altos niveles en el desarrollo temprano del tejido pulmonar, mientras que esta expresión decrece conforme avanza dicho desarrollo (Lu *et al.*, 2007). En este mismo estudio realizaron experimentos de sobreexpresión del *cluster* miR-17/92 en el epitelio pulmonar embrionario murino y comprobaron que los pulmones de estos animales transgénicos presentaban un fenotipo aberrante, con numerosas células epiteliales proliferativas. Asimismo, la diferenciación hacia células epiteliales proximales se encontraba inhibida en este tejido. En este mismo trabajo, descubrieron a Rbl2 (de la familia de Rb) como diana de miR-17-5p. Estos datos apuntan al papel del *cluster* miR-17/92 como promotor de la proliferación y el estado indiferenciado en progenitores epiteliales de pulmón murinos. Los resultados obtenidos

en nuestro estudio indican que los niveles de expresión del cluster miR-17/92 disminuyen durante el proceso de diferenciación de las células BTSCs de GBM. Esta observación concuerda con los datos de la literatura que muestran una disminución de su expresión en la diferenciación celular de progenitores epiteliales pulmonares embrionarios murinos.

Tras el análisis de los cambios de los perfiles de expresión globales de miRNAs durante el proceso de diferenciación, seleccionamos 6 miRNAs con aumento de expresión durante este proceso y evaluamos su influencia sobre la inducción de la diferenciación (en el caso de miR-21, miR-31, miR-221 y miR-222) o la muerte celular (miR-29a y miR-29b).

MiR-21 es uno de los miRNAs con mayor sobreexpresión en el estado diferenciado de las BTSCs estudiadas en este trabajo, respecto a las células en estado indiferenciado (Ver R.3.1). Este miRNA está localizado en la región cromosómica 17q23.1 (Fujita *et al.*, 2011), sin formar parte de ningún *cluster* de miRNAs (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). MiR-21 ha sido históricamente descrito como un onco-miR y se conoce su importante implicación en la malignidad del GBM, especialmente como factor anti-apoptótico (Ver I.5.3.2.1.1). Sin embargo, se han publicado resultados conflictivos respecto al papel de miR-21 en la biología de las células madre. Se ha descrito que el represor neural REST mantiene la autorrenovación y la pluripotencia de las células ES murinas a través de la supresión de miR-21 (Singh *et al.*, 2008) con lo que podría estar comportándose como un factor antiproliferativo en estas células. Además, miR-21 tiene como dianas a Nanog y Sox2 en las células ES murinas, los cuales son factores necesarios para la autorrenovación de dichas células (Singh *et al.*, 2008). De esta forma, existen crecientes evidencias que implican a miR-21 en la biología de las células madre, mientras que sus efectos en las BTSCs no se habían

estudiado hasta este trabajo. Con respecto a su papel en otros procesos de diferenciación, se ha descrito que miR-21 regula la diferenciación adipogénica a través de TGF β en células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (Kim *et al.*, 2009b). También se ha descrito la inducción de la expresión de miR-21 durante la diferenciación de líneas celulares que expresan niveles bajos o indetectables de miR-21, como es el caso de las células ES murinas, neuroblastoma y la línea mieloide HL-60 (Chan *et al.*, 2005; Houbaviy *et al.*, 2003; Talotta *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2008). Asimismo, se ha observado que la inducción de diferenciación en la línea celular de cáncer de mama MCF7 mediante ATRA, aumenta la expresión de miR-21 (Terao *et al.*, 2011). También se ha descrito que la proteína BMP4 (comentada previamente en esta discusión, como inductora de diferenciación en BTSCs de GBM y capaz de inhibir el crecimiento tumoral en ratones (Piccirillo *et al.*, 2006)), aumenta la expresión de miR-21 en las células de músculo liso vascular (Davis & Hata, 2009). En el presente trabajo encontramos que miR-21 induce la diferenciación de la línea de BTSCs GN1C hacia linaje astrocitario (aumento sustancial de la proteína GFAP, ver R.3.2.2.2) cuando se sobreexpresa en el estado de neuroesfera. A pesar de su conocido papel como oncogén en GBM, el hecho de que la expresión de miR-21 aumente en la diferenciación de las BTSCs de GBM concuerda con los datos de la literatura que evidencian el aumento de este miRNA en otros procesos de diferenciación, como en la diferenciación inducida de líneas celulares de neuroblastoma o en células de cáncer de mama tratadas con ATRA, y su implicación en la regulación de otros procesos de diferenciación celular como la adipogénica o la miogénica.

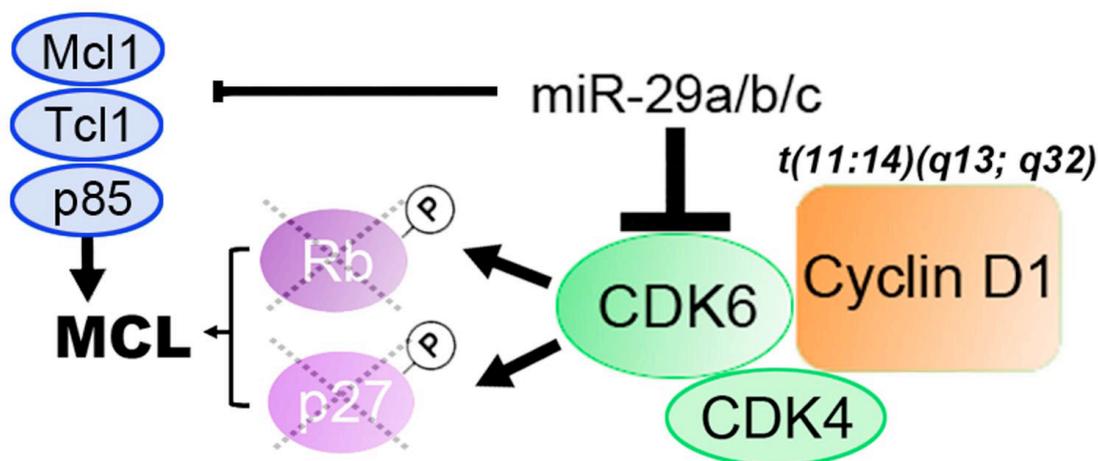
MiR-31 también se ha hallado sobreexpresado en las muestras de BTSCs en estado de diferenciación en este trabajo (Ver R.3.1). Este miRNA se encuentra en la región cromosómica 9p21.3 (Fujita *et al.*, 2011) y no se asocia a ningún *cluster* de

miRNAs (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). Se ha observado su sobreexpresión en diversos tipos de cáncer. En un trabajo publicado recientemente hallaron que miR-31 era uno de los miRNAs más sobreexpresados en cánceres de pulmón tanto murinos como humanos, y actuaba como onco-miR mediante la represión directa de dos genes supresores tumorales, LATS2 y PPP2R2A (Liu *et al.*, 2010). Asimismo, se ha evidenciado relación entre el aumento de expresión de miR-31 (y miR-21) y las características clinicopatológicas del cáncer colorrectal (Slaby *et al.*, 2007). Respecto a su papel en la diferenciación celular, existe un estudio sobre diferenciación en líneas celulares de células madre mesenquimales murinas, en el que observaron que al exponer dichas células a la proteína pro-diferenciativa de adipocitos BMP-2, las células aumentaban significativamente la expresión de miR-31 (y miR-24) (Sun *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha descrito que la sobreexpresión de miR-31 en células de cáncer de mama agresivo inhibe la metástasis en este tipo tumoral (Valastyan *et al.*, 2009). Esto sugiere que la expresión elevada de miR-31 en células con alta actividad proliferativa podría prevenir alteraciones relacionadas con la progresión tumoral (Mardaryev *et al.*, 2010). En este trabajo mostramos que miR-31 provoca un aumento de expresión del mRNA del marcador de diferenciación GALC en la línea de BTSCs G52 cuando se sobreexpresa en el estado de neuroesfera (Ver R.3.2.2.1), hecho que va en consonancia con los datos de la literatura que apuntan a su papel en la regulación de la diferenciación adipogénica inducida por BMP-2.

Los miRNAs hsa-miR-221 y hsa-miR-222 conforman un *cluster* (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011) en la región cromosómica Xp11.3 (Fujita *et al.*, 2011), que también se halla sobreexpresado en las BTSCs en estado de diferenciación. Se ha descrito la sobreexpresión de los miRNAs de este *cluster* en los gliomas de alto grado, incluido el GBM, y se les considera implicados en la regulación del ciclo celular y la

ruta AKT en esta enfermedad (Ver I.5.3.2.1.2). Respecto a su papel en la diferenciación celular, se ha publicado que este *cluster* se sobreexpresa durante el proceso de inducción de diferenciación en la línea celular mieloide HL-60 (Chen *et al.*, 2008). Asimismo, se ha descrito su implicación en la diferenciación miogénica del músculo esquelético (Cardinali *et al.*, 2009), la diferenciación condrogénica mediante inhibición de Mdm2 (Kim *et al.*, 2010); en la eritropoiesis, siendo su diana el receptor de Kit (Felli *et al.*, 2005) y en la diferenciación de células dendríticas humanas del sistema inmune, en las que regulan el desarrollo, la apoptosis y la producción de IL-12 a través de la inhibición de p27^{kip1}, KPC1 y SOCS-1 (Lu *et al.*, 2011). En este trabajo observamos que la inhibición tanto de miR-221 como de miR-222 en la línea de BTSCs GN1C en estado de diferenciación, provoca una notable reducción de los marcadores de diferenciación neural, especialmente de la proteína de diferenciación astrocitaria GFAP, y además se observaron cambios morfológicos asociados a esta inhibición (Ver R.3.2.2.2): las células pierden su morfología característica en el estado diferenciado, mostrando prologaciones citoplásmicas visiblemente reducidas. Estos datos van en consonancia con la implicación de este cluster de miRNAs descrita en otros procesos de diferenciación celular, como la condrogénica o la eritropoyética; pese a la conocida sobreexpresión de miR-221 en pacientes de GBM, que apoya su papel como oncogén en esta enfermedad. En este sentido, este cluster podría ejercer la regulación de los procesos de diferenciación en las BTSCs de GBM mediante su conocido papel como activador de la ruta AKT (Zhang *et al.*, 2010), ya que la activación de esta ruta es necesaria para otros procesos de diferenciación neural, como es el caso de la diferenciación inducida por ácido retinoico en líneas celulares de neuroblastoma (Lopez-Carballo *et al.*, 2002).

El miRNA hsa-miR-29a se encuentra en un *cluster* en la región cromosómica 7q32.3 (Fujita *et al.*, 2011) junto con hsa-miR-29b-1 (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011), ambos sobreexpresados en el estado diferenciado de las BTSCs. Estos miRNAs se han relacionado con funciones antimutorales, así, se ha demostrado que el *cluster* miR-29 suprime la tumorigenicidad en el cáncer pulmonar no microcítico al normalizar los patrones alterados de metilación, inhibiendo a DNMT3A y DNMT3B (Fabbri *et al.*, 2007). Además, estos miRNAs actúan como activadores de la diferenciación miogénica y como supresores del rhabdomiosarcoma (Wang *et al.*, 2008) donde aparecen silenciados epigenéticamente. MiR-29a y miR-29b están implicados también en la regulación del ciclo celular y la apoptosis en cáncer. Se ha comprobado que los *clusters* de miRNAs miR-29a/b/c inhiben de forma directa a la quinasa dependiente de ciclina 6 (*CDK6*) en estudios llevados a cabo en células de pacientes de linfoma de células del manto (MCL) (Zhao *et al.*, 2010). Esta proteína está implicada en la liberación del factor de transcripción E2F de su unión a RB1 y la consiguiente progresión a la fase S del ciclo celular. Además, se ha comprobado que el *cluster* miR-29 regula negativamente otros genes importantes, incluyendo oncogenes como *Tcl1* (Pekarsky *et al.*, 2006) y *Mcl1* (Mott *et al.*, 2007), así como genes implicados en crecimiento celular y supervivencia tales como *YY1* (Wang *et al.*, 2008), *p53* y *CDC42* (la inhibición de ambos provoca el aumento de *p53*) (Park *et al.*, 2009) y *DNMT3* (Fabbri *et al.*, 2007). A continuación se muestra un esquema del mecanismo de acción del *cluster* miR-29 en el MCL (Zhao *et al.*, 2010):



Con respecto al GBM, un análisis previo de las proteínas anti-apoptóticas de la familia de BCL2 en esta enfermedad demostró que MCL1 es la proteína de dicha familia más expresada en la mayoría de gliomas malignos (Day *et al.*, 2011). En este mismo trabajo, comprobaron que MCL1 poseía una importancia funcional en las células de GBM, ya que su neutralización inducía la apoptosis por sí misma e incrementaba la apoptosis inducida por quimioterapia. En el trabajo llevado a cabo para esta tesis doctoral hemos demostrado que miR-29a y miR-29b inducen la muerte celular al ser sobreexpresados en las BTSCs en el estado de neuroesfera (Ver R.3.2.3 y R.3.2.4), y hemos comprobado que la inhibición de MCL1 por parte de miR-29a y miR-29b ocurre también en las BTSCs (Ver R.3.2.4.2). Por tanto, proponemos que miR-29 podría estar induciendo mecanismos de muerte celular en las células diferenciadas a partir de BTSCs, mediante un mecanismo de acción similar al observado en MCL.

Una vez estudiada la implicación de los miRNAs seleccionados en la diferenciación o inducción de la muerte celular de las BTSCs, nos preguntamos sobre las posibles vías moleculares implicadas en el proceso de diferenciación que podrían estar reguladas por estos miRNAs. Una de las rutas más alteradas en las que participan posibles dianas de los miRNAs seleccionados es la ruta de WNT (Ver R.3.3.1).

La ruta de señalización WNT se encarga de regular el equilibrio entre autorrenovación y diferenciación en el SNC (Zechner *et al.*, 2003). A pesar de que la señalización de WNT es capaz de influir en las decisiones de linaje celular tales como la diferenciación neural de NSCs (Muroyama *et al.*, 2004), la diferenciación de células ES hacia interneuronas dorsales (Murashov *et al.*, 2005), y la diferenciación de NSCs hacia neuronas dopaminérgicas (Haegeler *et al.*, 2003), la señalización WNT predomina en la proliferación de las células madre y la expansión de las NSCs (Chenn & Walsh, 2002), e inhibe la diferenciación (Haegeler *et al.*, 2003; Aubert *et al.*, 2002). En un trabajo en el que indujeron la diferenciación de NSCs mediante sobreexpresión de Olig2, se observó la inhibición de la señalización WNT (Ahn *et al.*, 2008), acompañada por un aumento de expresión de Dkk1 (Dickkopf-1), un potente antagonista de la ruta. Al tratar las NSCs con Dkk1, se producía una inducción de la diferenciación hacia astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, junto con un bloqueo de la ruta de WNT. Estos mismos efectos son los que observamos en nuestro modelo de diferenciación de BTSCs. Los genes de la vía de señalización Wnt aparecen inhibidos (Figura R.33) y *DKK1* es uno de los genes con mayor incremento de expresión según los datos del microarray de expresión génica (Figuras R.29 y R.35). En el análisis bioinformático de las posibles dianas de los miRNAs estudiados, encontramos posibles sitios de unión para miR-106a en la región 3' UTR de *DKK1*. A la vista de nuestros resultados, proponemos que la disminución de la expresión de miR-106a que encontramos en la diferenciación de las BTSCs podría conllevar la sobreexpresión de DKK1, que a su vez inhibiría la señalización WNT, permitiendo la diferenciación. Por otra parte, se ha implicado a miR-21, y su diana WNT1, en la regulación de la diferenciación de células dendríticas del sistema inmune (Hashimi *et al.*, 2009). Como WNT1 es capaz de inducir la vía WNT (Hashimi *et al.*, 2009), la sobreexpresión de este miRNA que hallamos en la

diferenciación de las BTSCs podría participar también en la represión de la vía WNT y así favorecer la diferenciación de estas células.

Además de los cambios en la expresión de genes que forman parte de esta ruta, cabe destacar la disminución de la expresión de *SPRY1* (*Sprouty homolog 1*) (Ver Figura R.35), antagonista de la señalización Fgf en la ruta de la neurotrofina/TRK. Se ha descrito que la eliminación de *SPRY1* y *SPRY2* en ratones *knock-out* homocigotos, aumenta la diferenciación de las células progenitoras en el desarrollo embrionario (Faedo *et al.*, 2010). Asimismo, se ha descrito que *SPRY1* es diana directa de miR-21 (Thum *et al.*, 2008). Por tanto, proponemos que parte del efecto pro-diferenciativo de miR-21 en las BTSCs observado en nuestro estudio, podría estar ocurriendo mediante la represión de *SPRY1*.

En resumen, nuestro trabajo resalta la importancia de ciertos miRNAs en el proceso de diferenciación de las BTSCs, lo cual podría ser de utilidad en el tratamiento del GBM. El descubrimiento de que los patrones de expresión de miRNAs se hallan alterados en numerosas enfermedades humanas, incluido el cáncer, ha llevado a la propuesta de una "terapia de re-expresión de miRNAs". Para este tipo de terapias son especialmente interesantes los miRNAs que son capaces de inhibir represores de rutas de diferenciación, proteínas que participan en la degradación de fármacos antitumorales y oncogenes. Este tipo de terapias se ven favorecidas en el tratamiento del cáncer, ya que son menos habituales los miRNAs que actúan como onco-miRs que los que actúan como supresores tumorales. La re-expresión de uno de estos miRNAs con función de supresor tumoral podría inhibir la expresión de múltiples oncogenes (Chuang & Jones, 2007). Además, la re-expresión de miRNAs específicos de tejido, cuya expresión se ha inhibido en el cáncer, hasta sus niveles fisiológicos, puede inducir la desdiferenciación de las células tumorales (Taulli *et al.*, 2009; Garofalo *et al.*, 2008). Esto se debe a que

existen miRNAs que actúan como inductores muy potentes de la diferenciación a un tipo celular concreto. Por ejemplo, la transfección de miR-1 (miomiR) o miR-124 (neuromiR) en células de la línea celular HeLa provoca la infra-expresión de cientos de genes y cambiaba el perfil de expresión de mRNAs hacia el perfil del tejido en el que estos miRNAs se encuentran enriquecidos (Lim *et al.*, 2005). Además se ha descrito que la transfección de miR-124 induce cambios fenotípicos neuronales, al afectar la expresión de marcadores específicos de neuronas en células madre derivadas de tumores neurales/cerebrales de ratón y de GBM humano (Silber *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que los miRNAs específicos de tejido con función supresora de tumores poseen el potencial de promover la re-diferenciación de las células tumorales hacia sus semejantes normales, y de los tumores sólidos a sus tejidos originales, haciendo especialmente interesante la posibilidad de utilizarlos como inductores de diferenciación para tratar distintos cánceres.

Ya existen evidencias de la utilidad de los miRNAs como agentes terapéuticos contra enfermedades humanas en modelos animales. Un modelo terapéutico de metástasis ósea mediante xenotransplante de cáncer de próstata, reveló que el atelocolágeno podía administrar eficientemente de forma sistémica miR-16 a las células tumorales de tejidos óseos en ratones cuando se inyectaba por la vena de la cola, e inhibía el crecimiento tumoral del cáncer de próstata en hueso, al regular la expresión de *CDK1* y *CDK2*, inductores del ciclo celular y la proliferación (Takeshita *et al.*, 2010). Esos resultados obtenidos en el modelo murino podrían trasladarse al tratamiento de pacientes con cáncer de próstata avanzado, mediante inyección sistémica de miR-16 embebido en atelocolágeno.

En resumen, la capacidad de inducción de efectos pro-diferenciativos en las BTSCs encontrada para miR-21, miR-31, miR-221 y miR-222, así como inducción de

muerte celular de BTSCs por parte de miR-29a y miR-29b, sugiere su valor potencial en el tratamiento del GBM. Las terapias basadas en miRNAs y RNAs de interferencia suponen una gran promesa para el desarrollo de estrategias terapéuticas completamente nuevas en el tratamiento de enfermedades (Mathupala *et al.*, 2006), y se están llevando a cabo ensayos clínicos que utilizan siRNAs y shRNAs (Burnett *et al.*, 2011). Con respecto a la posibilidad de aplicar estos tratamientos al GBM, la llegada de siRNAs o miRNAs al SNC es un reto debido a la presencia de la barrera hematoencefálica, pero ya se han desarrollado varias estrategias prometedoras para salvar este obstáculo. Estas técnicas incluyen la administración intranasal de oligonucleótidos (Hashizume *et al.*, 2008), la encapsulación lipídica y administración de ácidos nucleicos dirigida (Hayes *et al.*, 2006a; Hayes *et al.*, 2006b), y la administración directa de agentes terapéuticos a los tejidos tumorales del cerebro mediante administración ayudada por convección (Saito *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007). Un estudio del efecto de la expresión de los miRNAs seleccionados en este estudio en modelos pre-clínicos de GBM (Pandita *et al.*, 2004; Sarkaria *et al.*, 2007), en conjunción con varias estrategias de administración, ayudarían a definir su potencial terapéutico para el tratamiento del GBM.

CONCLUSIONES

1 - Las neuroesferas derivadas a partir de las muestras quirúrgicas de pacientes con glioblastoma multiforme muestran las características cardinales de las células madre de tumor cerebral: capacidad de autorrenovación, tumorigenicidad y diferenciación hacia los principales linajes neurales presentes en el sistema nervioso central adulto.

2 - El modelo de inducción de la diferenciación de células madre de tumor cerebral en células diferenciadas ha resultado adecuado y eficaz, como se demuestra por el aumento de expresión de los marcadores específicos de diferenciación de los linajes neurales y los cambios morfológicos asociados a este proceso.

3 - El análisis de la expresión global de los microRNAs durante el proceso de diferenciación de las células madre de tumor cerebral identificó 21 microRNAs con expresión diferencial, 11 de ellos con sobreexpresión y 10 con infraexpresión. De ellos, 8 miRNAs (6 con aumento de expresión: hsa-miR-21, hsa-miR-31, hsa-miR-29a, hsa-miR-29b, hsa-miR-221 y hsa-miR-222; y 2 con disminución de la expresión: hsa-miR-93 y hsa-miR-106a) se validaron mediante la técnica independiente de RT-PCR cuantitativa.

4 - La sobreexpresión de hsa-miR-21 en células madre de tumor cerebral induce especialmente la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP), marcador de diferenciación astrocitaria, tanto a nivel de mRNA como de proteína, sugiriendo que este miRNA podría desempeñar un papel en este proceso.

5 - La inhibición de hsa-miR-221 y hsa-miR-222 en células diferenciadas, provoca una reducción de los niveles de expresión de los marcadores de diferenciación neural (principalmente de proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y de III- β -tubulina (TUBB3)), tanto a nivel de mRNA como de proteína, así como cambios morfológicos

que evidencian la implicación de estos miRNAs en la regulación del proceso de diferenciación de las células madre de tumor cerebral.

6 - La sobreexpresión del microRNA hsa-miR-31 en células madre de tumor cerebral induce la expresión del marcador de diferenciación oligodendrocitaria galactocerebrosidasa (GALC), a nivel de RNA mensajero.

7 - La sobreexpresión de los microRNAs hsa-miR-29a y hsa-miR-29b en células madre de tumor cerebral no induce cambios notables en la diferenciación, pero incrementa la muerte celular mediante procesos apoptóticos y no apoptóticos. Hsa-miR-29a y miR-29b inhiben la expresión de la proteína anti-apoptótica MCL1 en estas células madre de tumor cerebral, sugiriendo el mecanismo responsable de la disminución de la viabilidad celular de estas células mediada por miR-29a/b.

8 - Las rutas moleculares más importantes cuya expresión se altera en el proceso de diferenciación inducida de las células madre de tumor cerebral contienen un número significativo de posibles genes diana de los 8 miRNAs validados en este estudio.

ABREVIATURAS

3'-UTR: Región 3' no traducida (Del inglés, *3' Untranslated region*)

5-FU: 5-Fluorouracilo

AB: Applied Biosystems

ABC: Del inglés *ATP-binding cassette*

ADP: adenosín difosfato

ATCC: *American Type Culture Collection*

ATRA: Ácido retinoico *all-trans* (Del inglés, *All-trans retinoic acid*)

BCNU: 1, 3-bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea

BCPCs: Células propagadoras del cáncer cerebral (Del inglés, *Brain Cancer Propagating Cells*),

BMF: Factor de modificación de BCL-2 (Del inglés, *BCL-2 modifying factor*)

BMPs: Proteínas morfogenéticas de hueso (Del inglés, *Bone Morphogenetic Proteins*)

BSA: Albúmina sérica bovina (Del inglés, *Bovine serum albumin*)

CD15: Del inglés *Cluster of differentiation 15*

CD44: Del inglés *Cluster of differentiation 44*

CD133: Del inglés *Cluster of differentiation 133*

CMV: Citomegalovirus

CPCs: Células propagadoras de cáncer (Del inglés, *Cancer Propagating Cells*)

cRNA: RNA complementario

CSC: Células madre de cáncer (Del inglés, *Cancer Stem Cells*)

Ct: Ciclo Umbral (Ciclo *threshold*)

CV: Coeficiente de variación

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol (Del inglés, *4,6-diamidino-2-phenylindole*).

DE: Desviación estándar

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (Del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (Del inglés, *Deoxyribonucleic acid*)

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato (Del inglés, *Deoxyribonucleotide triphosphate*)

ECs: Células endoteliales (Del inglés, *Endothelial Cells*)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico (Del inglés, *Epidermal Growth Factor*)

EMEM: Medio mínimo esencial de Eagle (Del inglés, *Eagle's modified essential medium*)

ENU: N-etil-N-nitrosourea

ES: células madre embrionarias (Del inglés, *embryonic stem cells*)

FACS: Separación celular de activación fluorescente (Del inglés, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

FC: cambio de múltiplo (Del inglés, *fold-change*)

FGF2: Factor de crecimiento fibroblástico 2 (Del inglés, *Fibroblast Growth Factor 2*)

FITC: Fluoresceína-5-Isotiocianato

FOV: campo de visión (Del inglés, *field of view*)

g: gramos

GABA: Ácido γ -aminobutírico (Del inglés, *γ -aminobutyric acid*)

GBM: Glioblastoma multiforme

GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía (Del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GFP: Proteína verde fluorescente (Del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

H3: Histona 3

HA: Ácido hialurónico (Del inglés, *Hyaluronic Acid*)

HRP: Del inglés, *Horseradish peroxidase*

HSA: Antígeno estable al calor (Del inglés, *Heat-Stable Antigen*)

HSV1-tk: Del inglés, *Herpes simplex virus thymidine kinase*.

i.p.: Intraperitoneal

IP: Yoduro de propidio

KDa: KiloDaltons

LNA: Del inglés, *Locked nucleic acid*.

LOH: Pérdida de heterocigosidad (Del inglés, *Loss of heterozygosity*)

Luc: Luciferasa de *Photinus pyralis*

MAP2: Proteína 2 asociada a microtúbulos (Del inglés, *Microtubule-Associated Protein*

2)

MBq: Megabequerelios.

MCL1: Del inglés, *myeloid cell-leukemia-1*

MB: Meduloblastoma

MELK: Del inglés, *Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase*

mRNA: RNA mensajero (Del inglés, *messenger RNA*)

miRNA: microRNA

MRI: Imagen de resonancia magnética (Del inglés, *Magnetic Resonance Imaging*)

NCAM-1: Molécula de adhesión de célula neural 1 (Del inglés, *Neural Cell Adhesion Molecule 1*)

NES: Nestina

NOD-SCID: Diabéticos no obesos, con inmunodeficiencia severa combinada (Del inglés, *Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficiency*)

OMS: *Organización Mundial de la Salud*

p: valor de probabilidad estadística

PARP: proteína nuclear polimerasa poli-(ADP-ribosa) (Del inglés, *poly-ADP-ribose polymerase*)

PBS: Tampón fosfato salino (Del inglés, *Phosphate buffered saline*)

PDCD4: Muerte celular programada 4 (Del inglés, *programmed cell death 4*)

PET: Tomografía por Emisión de Positrones (Del inglés, *Positron Emission Tomography*)

PFA: Paraformaldehído

PGCs: Células progenitoras gliales (Del inglés, *Progenitor Glial Cells*)

PSA: Ácido polisiálico (Del inglés, *Polisyalic Acid*)

qRT-PCR: retrotranscripción (RT)-reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa.

R.c.f.: Del inglés, *relative centrifugal force*

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA (Del inglés, *RNA-induced silencing complex*)

RMA: Del inglés, *Robust Multichip Average*

RMS: Corriente migratoria rostral (Del inglés, *Rostral Migratory Stream*)

RNA: Ácido ribonucleico (Del inglés, *Ribonucleic Acid*)

ROI: Regiones de interés (Del inglés, *Regions of interest*)

RT-PCR: PCR previa retrotranscripción

SA: Del inglés, *signal-anchor*

SD: secuencia de Shine-Dalgarno

SGZ: Zona Subgranular (Del inglés, *Subgranular zone*)

Shh: Ruta *Sonic Hedgehog*

siRNA: RNA de interferencia pequeño (Del inglés, *Small interfering RNA*)

SNC: Sistema nervioso central

SNP: Polimorfismo de un único nucleótido (Del inglés, *Single nucleotide polymorphism*)

Sox2: Del inglés, *Sex determining region Y-box 2*

SP: Población lateral (Del inglés, *Side Population*)

SPF: Zona libre de patógenos específicos (Del inglés, *Specific Pathogen Free*)

sPNETs: Tumores supratentoriales de neuroectodermo primitivo (Del inglés, *Supratentorial Primitive Neuroectodermal Tumours*)

STF: Suero de ternera fetal

SUV_{max}: Valor máximo de captación estandarizada (Del inglés, *maximum standardized uptake value*)

SVZ: Zona Subventricular (Del inglés, *Subventricular zone*)

TAC: Células transitoriamente amplificadoras (Del inglés, *Transiently Amplifying Cells*)

TDCs: Células tumorales diferenciadas terminalmente (Del inglés, *Terminally Differentiated Cancer cells*)

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TICs: Células iniciadoras de tumor (Del inglés, *Tumor Initiating Cells*)

TMZ: Temozolamida

TS-miRs: miRNAs supresores tumorales (Del inglés, *Tumor supressor-miRNAs*)

U.I: Unidades internacionales

BIBLIOGRAFÍA

- Ahn, S.M., Byun, K., Kim, D., Lee, K., Yoo, J.S., Kim, S.U., Jho, E.H., Simpson, R.J. & Lee, B. 2008, "Olig2-induced neural stem cell differentiation involves downregulation of Wnt signaling and induction of Dickkopf-1 expression", *PLoS one*, vol. 3, no. 12, pp. e3917.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A. & Parada, L.F. 2009, "Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model", *Cancer cell*, vol. 15, no. 1, pp. 45-56.
- Al-Hajj, M. & Clarke, M.F. 2004, "Self-renewal and solid tumor stem cells", *Oncogene*, vol. 23, no. 43, pp. 7274-7282.
- Almqvist, P.M., Mah, R., Lendahl, U., Jacobsson, B. & Hendson, G. 2002, "Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 50, no. 2, pp. 147-158.
- Alonso, M.M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., de Munain, A.L., Sampron, N., Aramburu, A., Tejada-Solis, S., Vicente, C., Odero, M.D., Bandres, E., Garcia-Foncillas, J., Idoate, M.A., Lang, F.F., Fueyo, J. & Gomez-Manzano, C. 2011, "Genetic and epigenetic modifications of sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas", *PLoS one*, vol. 6, no. 11, pp. e26740.
- Altman, J. 1966, "Proliferation and migration of undifferentiated precursor cells in the rat during postnatal gliogenesis", *Experimental neurology*, vol. 16, no. 3, pp. 263-278.
- Altman, J. & Das, G.D. 1965, "Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats", *The Journal of comparative neurology*, vol. 124, no. 3, pp. 319-335.
- Ambros, V. 2004, "The functions of animal microRNAs", *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 350-355.
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. & Smith, A. 2002, "Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation", *Nature biotechnology*, vol. 20, no. 12, pp. 1240-1245.
- Backus, H.H., van Riel, J.M., van Groeningen, C.J., Vos, W., Dukers, D.F., Bloemena, E., Wouters, D., Pinedo, H.M. & Peters, G.J. 2001, "Rb, mcl-1 and p53 expression correlate with clinical outcome in patients with liver metastases from colorectal cancer", *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, vol. 12, no. 6, pp. 779-785.
- Badouel, C., Korner, R., Frank-Vaillant, M., Couturier, A., Nigg, E.A. & Tassan, J.P. 2006, "M-phase MELK activity is regulated by MPF and MAPK", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 5, no. 8, pp. 883-889.

- Bailey, P. & Cushing, H. 1926, *A Classification of the Tumors of the Glioma Group on a Histogenetic Basis with a Correlated Study of Prognosis*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D. & Rich, J.N. 2006a, "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response", *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D. & Rich, J.N. 2006b, "Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor", *Cancer research*, vol. 66, no. 16, pp. 7843-7848.
- Bar, E.E., Chaudhry, A., Lin, A., Fan, X., Schreck, K., Matsui, W., Piccirillo, S., Vescovi, A.L., DiMeco, F., Olivi, A. & Eberhart, C.G. 2007, "Cyclopamine-mediated hedgehog pathway inhibition depletes stem-like cancer cells in glioblastoma", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 25, no. 10, pp. 2524-2533.
- Barbarotto, E., Schmittgen, T.D. & Calin, G.A. 2008, "MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile", *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 122, no. 5, pp. 969-977.
- Bartel, D.P. 2009, "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions", *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215-233.
- Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M., Ancukiewicz, M., Mrugala, M.M., Plotkin, S., Drappatz, J., Louis, D.N., Ivy, P., Scadden, D.T., Benner, T., Loeffler, J.S., Wen, P.Y. & Jain, R.K. 2007, "AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients", *Cancer cell*, vol. 11, no. 1, pp. 83-95.
- Baumann, N. & Pham-Dinh, D. 2001, "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system", *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 2, pp. 871-927.
- Behin, A., Hoang-Xuan, K., Carpentier, A.F. & Delattre, J.Y. 2003, "Primary brain tumours in adults", *Lancet*, vol. 361, no. 9354, pp. 323-331.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P.J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U. & Beier, C.P. 2007, "CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles", *Cancer research*, vol. 67, no. 9, pp. 4010-4015.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V. & Hannon, G.J. 2003, "Dicer is essential for mouse development", *Nature genetics*, vol. 35, no. 3, pp. 215-217.
- Bleau, A.M., Huse, J.T. & Holland, E.C. 2009, "The ABCG2 resistance network of glioblastoma", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 8, no. 18, pp. 2936-2944.

- Brennan, C., Momota, H., Hambarzumyan, D., Ozawa, T., Tandon, A., Pedraza, A. & Holland, E. 2009, "Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations", *PloS one*, vol. 4, no. 11, pp. e7752.
- Buckner, J.C., Brown, P.D., O'Neill, B.P., Meyer, F.B., Wetmore, C.J. & Uhm, J.H. 2007, "Central nervous system tumors", *Mayo Clinic proceedings.Mayo Clinic*, vol. 82, no. 10, pp. 1271-1286.
- Burger, P.C. & Kleihues, P. 1989, "Cytologic composition of the untreated glioblastoma with implications for evaluation of needle biopsies", *Cancer*, vol. 63, no. 10, pp. 2014-2023.
- Burnett, J.C., Rossi, J.J. & Tiemann, K. 2011, "Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials", *Biotechnology journal*, vol. 6, no. 9, pp. 1130-1146.
- Cabeen, M.T. & Jacobs-Wagner, C. 2010, "The bacterial cytoskeleton", *Annual Review of Genetics*, vol. 44, pp. 365-392.
- Cai, X., Hagedorn, C.H. & Cullen, B.R. 2004, "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 10, no. 12, pp. 1957-1966.
- Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., Ramsay, D.A. & Louis, D.N. 1998, "Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 19, pp. 1473-1479.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., Frank, A., Bayazitov, I.T., Zakharenko, S.S., Gajjar, A., Davidoff, A. & Gilbertson, R.J. 2007, "A perivascular niche for brain tumor stem cells", *Cancer cell*, vol. 11, no. 1, pp. 69-82.
- Calin, G.A. 2009, "MicroRNAs and cancer: what we know and what we still have to learn", *Genome medicine*, vol. 1, no. 8, pp. 78.
- Cancer Genome Atlas Research Network 2008, "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways", *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1061-1068.
- Cao, X., Pfaff, S.L. & Gage, F.H. 2007, "A functional study of miR-124 in the developing neural tube", *Genes & development*, vol. 21, no. 5, pp. 531-536.
- Capela, A. & Temple, S. 2002, "LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal", *Neuron*, vol. 35, no. 5, pp. 865-875.
- Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alema, S., Martelli, F. & Falcone, G. 2009, "MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells", *PloS one*, vol. 4, no. 10, pp. e7607.

- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S. 2005, "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells", *Cancer research*, vol. 65, no. 14, pp. 6029-6033.
- Chen, A., Luo, M., Yuan, G., Yu, J., Deng, T., Zhang, L., Zhou, Y., Mitchelson, K. & Cheng, J. 2008, "Complementary analysis of microRNA and mRNA expression during phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA)-induced differentiation of HL-60 cells", *Biotechnology Letters*, vol. 30, no. 12, pp. 2045-2052.
- Chen, C., Ridzon, D., Lee, C.T., Blake, J., Sun, Y. & Strauss, W.M. 2007, "Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets", *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, vol. 18, no. 5, pp. 316-327.
- Chen, Y., Liu, W., Chao, T., Zhang, Y., Yan, X., Gong, Y., Qiang, B., Yuan, J., Sun, M. & Peng, X. 2008, "MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G", *Cancer letters*, vol. 272, no. 2, pp. 197-205.
- Chen, Y.Q., Rafi, M.A., de Gala, G. & Wenger, D.A. 1993, "Cloning and expression of cDNA encoding human galactocerebrosidase, the enzyme deficient in globoid cell leukodystrophy", *Human molecular genetics*, vol. 2, no. 11, pp. 1841-1845.
- Cheng, L.C., Pastrana, E., Tavazoie, M. & Doetsch, F. 2009, "miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche", *Nature neuroscience*, vol. 12, no. 4, pp. 399-408.
- Chenn, A. & Walsh, C.A. 2002, "Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, no. 5580, pp. 365-369.
- Chuang, J.C. & Jones, P.A. 2007, "Epigenetics and microRNAs", *Pediatric research*, vol. 61, no. 5 Pt 2, pp. 24R-29R.
- Clarke, I.D. & Dirks, P.B. 2003, "A human brain tumor-derived PDGFR-alpha deletion mutant is transforming", *Oncogene*, vol. 22, no. 5, pp. 722-733.
- Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L. & Wahl, G.M. 2006, "Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells", *Cancer research*, vol. 66, no. 19, pp. 9339-9344.
- Cohen, G.M. 1997, "Caspases: the executioners of apoptosis", *The Biochemical journal*, vol. 326 (Pt 1), no. Pt 1, pp. 1-16.
- Conti, A., Aguenouz, M., La Torre, D., Tomasello, C., Cardali, S., Angileri, F.F., Maio, F., Cama, A., Germano, A., Vita, G. & Tomasello, F. 2009, "miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors", *Journal of neuro-oncology*, vol. 93, no. 3, pp. 325-332.

- Corbeil, D., Roper, K., Weigmann, A. & Huttner, W.B. 1998, "AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family?", *Blood*, vol. 91, no. 7, pp. 2625-2626.
- Corsten, M.F., Miranda, R., Kasmieh, R., Krichevsky, A.M., Weissleder, R. & Shah, K. 2007, "MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas", *Cancer research*, vol. 67, no. 19, pp. 8994-9000.
- Costello, J.F., Plass, C., Arap, W., Chapman, V.M., Held, W.A., Berger, M.S., Su Huang, H.J. & Cavenee, W.K. 1997, "Cyclin-dependent kinase 6 (CDK6) amplification in human gliomas identified using two-dimensional separation of genomic DNA", *Cancer research*, vol. 57, no. 7, pp. 1250-1254.
- Cui, J.G., Zhao, Y., Sethi, P., Li, Y.Y., Mahta, A., Culicchia, F. & Lukiw, W.J. 2010, "Micro-RNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation", *Journal of neuro-oncology*, vol. 98, no. 3, pp. 297-304.
- Cullen, B.R. 2005, "RNAi the natural way", *Nature genetics*, vol. 37, no. 11, pp. 1163-1165.
- Dacey, M.L. & Wallace, R.B. 1974, "Postnatal neurogenesis in the feline cerebellum: a structural-functional investigation", *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, vol. 34, no. 2, pp. 253-263.
- Dahlstrand, J., Collins, V.P. & Lendahl, U. 1992, "Expression of the class VI intermediate filament nestin in human central nervous system tumors", *Cancer research*, vol. 52, no. 19, pp. 5334-5341.
- Dai, C., Celestino, J.C., Okada, Y., Louis, D.N., Fuller, G.N. & Holland, E.C. 2001, "PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo", *Genes & development*, vol. 15, no. 15, pp. 1913-1925.
- Daumas-Duport, C., Scheithauer, B., O'Fallon, J. & Kelly, P. 1988, "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method", *Cancer*, vol. 62, no. 10, pp. 2152-2165.
- Davis, B.N. & Hata, A. 2009, "Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms", *Cell communication and signaling : CCS*, vol. 7, pp. 18.
- Day, B.W., Stringer, B.W., Spanevello, M.D., Charmsaz, S., Jamieson, P.R., Ensbej, K.S., Carter, J.C., Cox, J.M., Ellis, V.J., Brown, C.L., Walker, D.G., Inglis, P.L., Allan, S., Reynolds, B.A., Lickliter, J.D. & Boyd, A.W. 2011, "ELK4 neutralization sensitizes glioblastoma to apoptosis through downregulation of the anti-apoptotic protein Mcl-1", *Neuro-oncology*, .

- Deck, J.H., Eng, L.F., Bigbee, J. & Woodcock, S.M. 1978, "The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors", *Acta Neuropathologica*, vol. 42, no. 3, pp. 183-190.
- Deltour, I., Johansen, C., Auvinen, A., Feychting, M., Klaeboe, L. & Schuz, J. 2009, "Time trends in brain tumor incidence rates in Denmark, Finland, Norway, and Sweden, 1974-2003", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 101, no. 24, pp. 1721-1724.
- Deng, W. & Poretz, R.D. 2001, "Lead alters the developmental profile of the galactolipid metabolic enzymes in cultured oligodendrocyte lineage cells", *Neurotoxicology*, vol. 22, no. 4, pp. 429-437.
- Deorah, S., Lynch, C.F., Sibenaller, Z.A. & Ryken, T.C. 2006, "Trends in brain cancer incidence and survival in the United States: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, 1973 to 2001", *Neurosurgical focus*, vol. 20, no. 4, pp. E1.
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Seignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T. & Thomas-Tikhonenko, A. 2006, "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster", *Nature genetics*, vol. 38, no. 9, pp. 1060-1065.
- Di Rocco, F., Carroll, R.S., Zhang, J. & Black, P.M. 1998, "Platelet-derived growth factor and its receptor expression in human oligodendrogliomas", *Neurosurgery*, vol. 42, no. 2, pp. 341-346.
- Dietrich, J., Han, R., Yang, Y., Mayer-Proschel, M. & Noble, M. 2006, "CNS progenitor cells and oligodendrocytes are targets of chemotherapeutic agents in vitro and in vivo", *Journal of biology*, vol. 5, no. 7, pp. 22.
- Ding, H., Roncari, L., Shannon, P., Wu, X., Lau, N., Karaskova, J., Gutmann, D.H., Squire, J.A., Nagy, A. & Guha, A. 2001, "Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas", *Cancer research*, vol. 61, no. 9, pp. 3826-3836.
- Ding, H., Shannon, P., Lau, N., Wu, X., Roncari, L., Baldwin, R.L., Takebayashi, H., Nagy, A., Gutmann, D.H. & Guha, A. 2003, "Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model", *Cancer research*, vol. 63, no. 5, pp. 1106-1113.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. 1999, "Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain", *Cell*, vol. 97, no. 6, pp. 703-716.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. 2002, "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells", *Neuron*, vol. 36, no. 6, pp. 1021-1034.

- Donnenberg, V.S. & Donnenberg, A.D. 2005, "Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis", *Journal of clinical pharmacology*, vol. 45, no. 8, pp. 872-877.
- Duffy, P.E., Huang, Y.Y. & Rapport, M.M. 1982, "The relationship of glial fibrillary acidic protein to the shape, motility, and differentiation of human astrocytoma cells", *Experimental cell research*, vol. 139, no. 1, pp. 145-157.
- Duffy, P.E., Huang, Y.Y., Rapport, M.M. & Graf, L. 1980, "Glial fibrillary acidic protein in giant cell tumors of brain and other gliomas. A possible relationship to malignancy, differentiation, and pleomorphism of glia", *Acta Neuropathologica*, vol. 52, no. 1, pp. 51-57.
- Easter, S.S., Jr, Ross, L.S. & Frankfurter, A. 1993, "Initial tract formation in the mouse brain", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 13, no. 1, pp. 285-299.
- Eberhart, C.G. 2008, "Even cancers want commitment: lineage identity and medulloblastoma formation", *Cancer cell*, vol. 14, no. 2, pp. 105-107.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. & Botstein, D. 1998, "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 25, pp. 14863-14868.
- Emmenegger, B.A. & Wechsler-Reya, R.J. 2008, "Stem cells and the origin and propagation of brain tumors", *Journal of child neurology*, vol. 23, no. 10, pp. 1172-1178.
- Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.M. & Goldman, R.D. 2009, "Introducing intermediate filaments: from discovery to disease", *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 7, pp. 1763-1771.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A. & Gage, F.H. 1998, "Neurogenesis in the adult human hippocampus", *Nature medicine*, vol. 4, no. 11, pp. 1313-1317.
- Eyler, C.E., Foo, W.C., LaFiura, K.M., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B. & Rich, J.N. 2008, "Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 26, no. 12, pp. 3027-3036.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C.D., Chan, K.K., Marcucci, G., Calin, G.A., Huebner, K. & Croce, C.M. 2007, "MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 40, pp. 15805-15810.

- Faedo, A., Borello, U. & Rubenstein, J.L. 2010, "Repression of Fgf signaling by sprouty1-2 regulates cortical patterning in two distinct regions and times", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 11, pp. 4015-4023.
- Fan, X., Matsui, W., Khaki, L., Stearns, D., Chun, J., Li, Y.M. & Eberhart, C.G. 2006, "Notch pathway inhibition depletes stem-like cells and blocks engraftment in embryonal brain tumors", *Cancer research*, vol. 66, no. 15, pp. 7445-7452.
- Fasano, C.A., Phoenix, T.N., Kokovay, E., Lowry, N., Elkabetz, Y., Dimos, J.T., Lemischka, I.R., Studer, L. & Temple, S. 2009, "Bmi-1 cooperates with Foxg1 to maintain neural stem cell self-renewal in the forebrain", *Genes & development*, vol. 23, no. 5, pp. 561-574.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., Valtieri, M., Calin, G.A., Liu, C.G., Sorrentino, A., Croce, C.M. & Peschle, C. 2005, "MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 50, pp. 18081-18086.
- Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Cicchillitti, L., Filippetti, F., Gallo, D., Fattorusso, C., Campiani, G. & Scambia, G. 2005, "The seco-taxane IDN5390 is able to target class III beta-tubulin and to overcome paclitaxel resistance", *Cancer research*, vol. 65, no. 6, pp. 2397-2405.
- Fineberg, S.K., Kosik, K.S. & Davidson, B.L. 2009, "MicroRNAs potentiate neural development", *Neuron*, vol. 64, no. 3, pp. 303-309.
- Fisher, J.L., Schwartzbaum, J.A., Wrensch, M. & Wiemels, J.L. 2007, "Epidemiology of brain tumors", *Neurologic clinics*, vol. 25, no. 4, pp. 867-90, vii.
- Frederick, L., Wang, X.Y., Eley, G. & James, C.D. 2000, "Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas", *Cancer research*, vol. 60, no. 5, pp. 1383-1387.
- Fuchs, E. & Weber, K. 1994, "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 63, pp. 345-382.
- Fujita, P.A., Rhead, B., Zweig, A.S., Hinrichs, A.S., Karolchik, D., Cline, M.S., Goldman, M., Barber, G.P., Clawson, H., Coelho, A., Diekhans, M., Dreszer, T.R., Gardine, B.M., Harte, R.A., Hillman-Jackson, J., Hsu, F., Kirkup, V., Kuhn, R.M., Learned, K., Li, C.H., Meyer, L.R., Pohl, A., Raney, B.J., Rosenbloom, K.R., Smith, K.E., Haussler, D. & Kent, W.J. 2011, "The UCSC Genome Browser database: update 2011", *Nucleic acids research*, vol. 39, no. Database issue, pp. D876-82.

- Fults, D., Pedone, C.A., Morse, H.G., Rose, J.W. & McKay, R.D. 1992, "Establishment and characterization of a human primitive neuroectodermal tumor cell line from the cerebral hemisphere", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 51, no. 3, pp. 272-280.
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C.C., Burchard, J., Linsley, P.S. & Krichevsky, A.M. 2008, "MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators", *Molecular and cellular biology*, vol. 28, no. 17, pp. 5369-5380.
- Gal, H., Pandi, G., Kanner, A.A., Ram, Z., Lithwick-Yanai, G., Amariglio, N., Rechavi, G. & Givol, D. 2008, "MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 376, no. 1, pp. 86-90.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F. & Vescovi, A. 2004, "Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma", *Cancer research*, vol. 64, no. 19, pp. 7011-7021.
- Galli, R., Fiocco, R., De Filippis, L., Muzio, L., Gritti, A., Mercurio, S., Broccoli, V., Pellegrini, M., Mallamaci, A. & Vescovi, A.L. 2002, "Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system", *Development (Cambridge, England)*, vol. 129, no. 7, pp. 1633-1644.
- Garofalo, M., Condorelli, G. & Croce, C.M. 2008, "MicroRNAs in diseases and drug response", *Current opinion in pharmacology*, vol. 8, no. 5, pp. 661-667.
- Gilbertson, R.J. & Rich, J.N. 2007, "Making a tumour's bed: glioblastoma stem cells and the vascular niche", *Nature reviews.Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 733-736.
- Gillies, J.K. & Lorimer, I.A. 2007, "Regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 6, no. 16, pp. 2005-2009.
- Godlewski, J., Bronisz, A., Nowicki, M.O., Chiocca, E.A. & Lawler, S. 2010, "microRNA-451: A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, no. 14, pp. 2742-2748.
- Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H.B., Chiocca, E.A. & Lawler, S. 2008, "Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal", *Cancer research*, vol. 68, no. 22, pp. 9125-9130.
- Gonzalez-Gomez, P., Sanchez, P. & Mira, H. 2011, "MicroRNAs as Regulators of Neural Stem Cell-Related Pathways in Glioblastoma Multiforme", *Molecular neurobiology*, vol. 44, no.2, pp 1-15.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. & Fuchs, E. 1997, "Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 17, no. 7, pp. 2492-2498.

- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G. & Fuchs, E. 1998, "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 6, pp. 3168-3171.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. 2003, "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity", *Neuron*, vol. 39, no. 5, pp. 749-765.
- Gritti, A., Frolichsthal-Schoeller, P., Galli, R., Parati, E.A., Cova, L., Pagano, S.F., Bjornson, C.R. & Vescovi, A.L. 1999, "Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 19, no. 9, pp. 3287-3297.
- Gritti, A., Parati, E.A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D.J., Roisen, F., Nickel, D.D. & Vescovi, A.L. 1996, "Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 16, no. 3, pp. 1091-1100.
- Guessous, F., Zhang, Y., Kofman, A., Catania, A., Li, Y., Schiff, D., Purow, B. & Abounader, R. 2010, "microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells", *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 9, no. 6, pp. 1031-1036.
- Guha, A., Feldkamp, M.M., Lau, N., Boss, G. & Pawson, A. 1997, "Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation", *Oncogene*, vol. 15, no. 23, pp. 2755-2765.
- Hadjipanayis, C.G. & Van Meir, E.G. 2009, "Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies", *Trends in molecular medicine*, vol. 15, no. 11, pp. 519-530.
- Haegle, L., Ingold, B., Naumann, H., Tabatabai, G., Ledermann, B. & Brandner, S. 2003, "Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression", *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 24, no. 3, pp. 696-708.
- Hammond, S.M. 2006, "MicroRNAs as oncogenes", *Current opinion in genetics & development*, vol. 16, no. 1, pp. 4-9.
- Hasegawa, S., Miyoshi, Y., Egawa, C., Ishitobi, M., Taguchi, T., Tamaki, Y., Monden, M. & Noguchi, S. 2003, "Prediction of response to docetaxel by quantitative analysis of class I and III beta-tubulin isotype mRNA expression in human breast cancers", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 9, no. 8, pp. 2992-2997.
- Hashimi, S.T., Fulcher, J.A., Chang, M.H., Gov, L., Wang, S. & Lee, B. 2009, "MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1

- and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation", *Blood*, vol. 114, no. 2, pp. 404-414.
- Hashizume, R., Ozawa, T., Gryaznov, S.M., Bollen, A.W., Lamborn, K.R., Frey, W.H., 2nd & Deen, D.F. 2008, "New therapeutic approach for brain tumors: Intranasal delivery of telomerase inhibitor GRN163", *Neuro-oncology*, vol. 10, no. 2, pp. 112-120.
- Hatfield, S.D., Shcherbata, H.R., Fischer, K.A., Nakahara, K., Carthew, R.W. & Ruohola-Baker, H. 2005, "Stem cell division is regulated by the microRNA pathway", *Nature*, vol. 435, no. 7044, pp. 974-978.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y. & Takahashi, T. 2005, "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation", *Cancer research*, vol. 65, no. 21, pp. 9628-9632.
- Hayes, M.E., Drummond, D.C., Hong, K., Zheng, W.W., Khorosheva, V.A., Cohen, J.A., C, O.N., 4th, Park, J.W., Marks, J.D., Benz, C.C. & Kirpotin, D.B. 2006a, "Increased target specificity of anti-HER2 genospheres by modification of surface charge and degree of PEGylation", *Molecular pharmaceuticals*, vol. 3, no. 6, pp. 726-736.
- Hayes, M.E., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Zheng, W.W., Noble, C.O., Park, J.W., Marks, J.D., Benz, C.C. & Hong, K. 2006b, "Genospheres: self-assembling nucleic acid-lipid nanoparticles suitable for targeted gene delivery", *Gene therapy*, vol. 13, no. 7, pp. 646-651.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J. & Hammond, S.M. 2005, "A microRNA polycistron as a potential human oncogene", *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 828-833.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M. & Kornblum, H.I. 2003, "Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 25, pp. 15178-15183.
- Henson, J.W., Schnitker, B.L., Correa, K.M., von Deimling, A., Fassbender, F., Xu, H.J., Benedict, W.F., Yandell, D.W. & Louis, D.N. 1994, "The retinoblastoma gene is involved in malignant progression of astrocytomas", *Annals of Neurology*, vol. 36, no. 5, pp. 714-721.
- Hess, K.R., Broglio, K.R. & Bondy, M.L. 2004, "Adult glioma incidence trends in the United States, 1977-2000", *Cancer*, vol. 101, no. 10, pp. 2293-2299.
- Hirschmann-Jax, C., Foster, A.E., Wulf, G.G., Nuchtern, J.G., Jax, T.W., Gobel, U., Goodell, M.A. & Brenner, M.K. 2004, "A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 39, pp. 14228-14233.

- Holland, E.C. 2001, "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models", *Nature reviews.Genetics*, vol. 2, no. 2, pp. 120-129.
- Holland, E.C. 2000, "Glioblastoma multiforme: the terminator", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 12, pp. 6242-6244.
- Holland, E.C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R.E. & Fuller, G.N. 2000, "Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice", *Nature genetics*, vol. 25, no. 1, pp. 55-57.
- Honore, S., Pasquier, E. & Braguer, D. 2005, "Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy", *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, vol. 62, no. 24, pp. 3039-3056.
- Horvath, S., Zhang, B., Carlson, M., Lu, K.V., Zhu, S., Felciano, R.M., Laurance, M.F., Zhao, W., Qi, S., Chen, Z., Lee, Y., Scheck, A.C., Liao, L.M., Wu, H., Geschwind, D.H., Febbo, P.G., Kornblum, H.I., Cloughesy, T.F., Nelson, S.F. & Mischel, P.S. 2006, "Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 46, pp. 17402-17407.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F. & Sharp, P.A. 2003, "Embryonic stem cell-specific MicroRNAs", *Developmental cell*, vol. 5, no. 2, pp. 351-358.
- Hu, X., Pandolfi, P.P., Li, Y., Koutcher, J.A., Rosenblum, M. & Holland, E.C. 2005, "mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma", *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 7, no. 4, pp. 356-368.
- Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T. & Holland, E.C. 2009, "The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo", *Genes & development*, vol. 23, no. 11, pp. 1327-1337.
- Huse, J.T. & Holland, E.C. 2010, "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma", *Nature reviews.Cancer*, vol. 10, no. 5, pp. 319-331.
- Hutvagner, G. & Zamore, P.D. 2002, "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 297, no. 5589, pp. 2056-2060.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D. & Steindler, D.A. 2002, "Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro", *Glia*, vol. 39, no. 3, pp. 193-206.
- James, C.D., Carlom, E., Dumanski, J.P., Hansen, M., Nordenskjold, M., Collins, V.P. & Cavenee, W.K. 1988, "Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages", *Cancer research*, vol. 48, no. 19, pp. 5546-5551.

- Jang, T., Litofsky, N.S., Smith, T.W., Ross, A.H. & Recht, L.D. 2004, "Aberrant nestin expression during ethylnitrosourea-(ENU)-induced neurocarcinogenesis", *Neurobiology of disease*, vol. 15, no. 3, pp. 544-552.
- Jiang, Y.Q. & Oblinger, M.M. 1992, "Differential regulation of beta III and other tubulin genes during peripheral and central neuron development", *Journal of cell science*, vol. 103 (Pt 3), no. Pt 3, pp. 643-651.
- Jirasek, T., Pisarikova, E., Viklicky, V. & Mandys, V. 2007, "Expression of class III beta-tubulin in malignant epithelial tumours: an immunohistochemical study using TU-20 and TuJ-1 antibodies", *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, vol. 45, no. 1, pp. 41-45.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D. & Slack, F.J. 2005, "RAS is regulated by the let-7 microRNA family", *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 635-647.
- Jouhilahti, E.M., Peltonen, S. & Peltonen, J. 2008, "Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types", *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, vol. 56, no. 12, pp. 1113-1119.
- Jukich, P.J., McCarthy, B.J., Surawicz, T.S., Freels, S. & Davis, F.G. 2001, "Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994", *Neuro-oncology*, vol. 3, no. 3, pp. 141-151.
- Kalcheva, N., Albala, J., O'Guin, K., Rubino, H., Garner, C. & Shafit-Zagardo, B. 1995, "Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 24, pp. 10894-10898.
- Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T. & Okano, H. 2000, "Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells", *Developmental neuroscience*, vol. 22, no. 1-2, pp. 139-153.
- Katsetos, C.D., Frankfurter, A., Christakos, S., Mancall, E.L., Vlachos, I.N. & Urich, H. 1993, "Differential localization of class III, beta-tubulin isotype and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 52, no. 6, pp. 655-666.
- Katsetos, C.D., Herman, M.M. & Mork, S.J. 2003a, "Class III beta-tubulin in human development and cancer", *Cell motility and the cytoskeleton*, vol. 55, no. 2, pp. 77-96.

- Katsetos, C.D., Legido, A., Perentes, E. & Mork, S.J. 2003b, "Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology", *Journal of child neurology*, vol. 18, no. 12, pp. 851-66; discussion 867.
- Kawase-Koga, Y., Low, R., Otaegi, G., Pollock, A., Deng, H., Eisenhaber, F., Maurer-Stroh, S. & Sun, T. 2010, "RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells", *Journal of cell science*, vol. 123, no. Pt 4, pp. 586-594.
- Kefas, B., Comeau, L., Floyd, D.H., Seleverstov, O., Godlewski, J., Schmittgen, T., Jiang, J., diPierro, C.G., Li, Y., Chiocca, E.A., Lee, J., Fine, H., Abounader, R., Lawler, S. & Purow, B. 2009, "The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with notch and has therapeutic potential against brain tumors", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 29, no. 48, pp. 15161-15168.
- Kernohan, J.W. & Mabon, R.F. 1949, "A simplified classification of the gliomas", *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, vol. 24, no. 3, pp. 71-75.
- Kim, D., Song, J. & Jin, E.J. 2010, "MicroRNA-221 regulates chondrogenic differentiation through promoting proteosomal degradation of slug by targeting Mdm2", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 35, pp. 26900-26907.
- Kim, M. & Morshead, C.M. 2003, "Distinct populations of forebrain neural stem and progenitor cells can be isolated using side-population analysis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 23, no. 33, pp. 10703-10709.
- Kim, T.M., Huang, W., Park, R., Park, P.J. & Johnson, M.D. 2011, "A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs", *Cancer research*, vol. 71, no. 9, pp. 3387-3399.
- Kim, V.N., Han, J. & Siomi, M.C. 2009a, "Biogenesis of small RNAs in animals", *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 10, no. 2, pp. 126-139.
- Kim, Y.J., Hwang, S.J., Bae, Y.C. & Jung, J.S. 2009b, "MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 27, no. 12, pp. 3093-3102.
- Kondo, T., Setoguchi, T. & Taga, T. 2004, "Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 3, pp. 781-786.
- Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. 2011, "miRBase: Tools for microRNA genomics", *versión 17*.

- Krichevsky, A.M., King, K.S., Donahue, C.P., Khrapko, K. & Kosik, K.S. 2003, "A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development", *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 9, no. 10, pp. 1274-1281.
- Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isacson, O. & Kosik, K.S. 2006, "Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 24, no. 4, pp. 857-864.
- Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. 2010, "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay", *Nature reviews. Genetics*, vol. 11, no. 9, pp. 597-610.
- Kukharsky, V., Sulimenko, V., Macurek, L., Sulimenko, T., Draberova, E. & Draber, P. 2004, "Complexes of gamma-tubulin with nonreceptor protein tyrosine kinases Src and Fyn in differentiating P19 embryonal carcinoma cells", *Experimental cell research*, vol. 298, no. 1, pp. 218-228.
- Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R. & Jacks, T. 2007, "Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis", *Nature genetics*, vol. 39, no. 5, pp. 673-677.
- Kwak, H.J., Kim, Y.J., Chun, K.R., Woo, Y.M., Park, S.J., Jeong, J.A., Jo, S.H., Kim, T.H., Min, H.S., Chae, J.S., Choi, E.J., Kim, G., Shin, S.H., Gwak, H.S., Kim, S.K., Hong, E.K., Lee, G.K., Choi, K.H., Kim, J.H., Yoo, H., Park, J.B. & Lee, S.H. 2011, "Downregulation of Spry2 by miR-21 triggers malignancy in human gliomas", *Oncogene*, vol. 30, no. 21, pp. 2433-2442.
- Kwon, C.H., Zhao, D., Chen, J., Alcantara, S., Li, Y., Burns, D.K., Mason, R.P., Lee, E.Y., Wu, H. & Parada, L.F. 2008, "Pten haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas", *Cancer research*, vol. 68, no. 9, pp. 3286-3294.
- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M. & Kellenberger, E. 1970, "Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4", *Journal of Molecular Biology*, vol. 49, no. 1, pp. 99-113.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. 2001, "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. & Tuschl, T. 2002, "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse", *Current biology : CB*, vol. 12, no. 9, pp. 735-739.
- Lahat, G., Zhu, Q.S., Huang, K.L., Wang, S., Bolshakov, S., Liu, J., Torres, K., Langley, R.R., Lazar, A.J., Hung, M.C. & Lev, D. 2010, "Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies", *PloS one*, vol. 5, no. 4, pp. e10105.
- Laks, D.R., Visnyei, K. & Kornblum, H.I. 2010, "Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma", *Yonsei medical journal*, vol. 51, no. 5, pp. 633-640.

- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P. 2001, "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 858-862.
- Lavon, I., Zrihan, D., Granit, A., Einstein, O., Fainstein, N., Cohen, M.A., Cohen, M.A., Zelikovitch, B., Shoshan, Y., Spektor, S., Reubinoff, B.E., Felig, Y., Gerlitz, O., Ben-Hur, T., Smith, Y. & Siegal, T. 2010, "Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells", *Neuro-oncology*, vol. 12, no. 5, pp. 422-433.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. & Earnshaw, W.C. 1994, "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE", *Nature*, vol. 371, no. 6495, pp. 346-347.
- le Sage, C., Nagel, R., Egan, D.A., Schrier, M., Mesman, E., Mangiola, A., Anile, C., Maira, G., Mercatelli, N., Ciafre, S.A., Farace, M.G. & Agami, R. 2007, "Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation", *The EMBO journal*, vol. 26, no. 15, pp. 3699-3708.
- Le, M.T., Xie, H., Zhou, B., Chia, P.H., Rizk, P., Um, M., Udolph, G., Yang, H., Lim, B. & Lodish, H.F. 2009, "MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets", *Molecular and cellular biology*, vol. 29, no. 19, pp. 5290-5305.
- Leader, M., Collins, M., Patel, J. & Henry, K. 1987, "Vimentin: an evaluation of its role as a tumour marker", *Histopathology*, vol. 11, no. 1, pp. 63-72.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N.M., Pastorino, S., Purow, B.W., Christopher, N., Zhang, W., Park, J.K. & Fine, H.A. 2006, "Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines", *Cancer cell*, vol. 9, no. 5, pp. 391-403.
- Lee, J., Son, M.J., Woolard, K., Donin, N.M., Li, A., Cheng, C.H., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Walling, J., Ahn, S., Kim, M., Totonchy, M., Cusack, T., Ene, C., Ma, H., Su, Q., Zenklusen, J.C., Zhang, W., Maric, D. & Fine, H.A. 2008, "Epigenetic-mediated dysfunction of the bone morphogenetic protein pathway inhibits differentiation of glioblastoma-initiating cells", *Cancer cell*, vol. 13, no. 1, pp. 69-80.
- Lee, K.M., Cao, D., Itami, A., Pour, P.M., Hruban, R.H., Maitra, A. & Ouellette, M.M. 2007, "Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia", *Histopathology*, vol. 51, no. 4, pp. 539-546.
- Lee, R.C. & Ambros, V. 2001, "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, no. 5543, pp. 862-864.

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. 1993, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*", *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843-854.
- Lee, W.C., Tsoi, Y.K., Troendle, F.J., DeLucia, M.W., Ahmed, Z., Dicky, C.A., Dickson, D.W. & Eckman, C.B. 2007, "Single-dose intracerebroventricular administration of galactocerebrosidase improves survival in a mouse model of globoid cell leukodystrophy", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 21, no. 10, pp. 2520-2527.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B. & McKay, R.D. 1990, "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein", *Cell*, vol. 60, no. 4, pp. 585-595.
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M. & Marino, S. 2004, "Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas", *Nature*, vol. 428, no. 6980, pp. 337-341.
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H. & Parsons, R. 1997, "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 275, no. 5308, pp. 1943-1947.
- Li, K.K., Pang, J.C., Ching, A.K., Wong, C.K., Kong, X., Wang, Y., Zhou, L., Chen, Z. & Ng, H.K. 2009a, "miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1", *Human pathology*, vol. 40, no. 9, pp. 1234-1243.
- Li, Y., Guessous, F., Zhang, Y., Dipierro, C., Kefas, B., Johnson, E., Marcinkiewicz, L., Jiang, J., Yang, Y., Schmittgen, T.D., Lopes, B., Schiff, D., Purow, B. & Abounader, R. 2009b, "MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes", *Cancer research*, vol. 69, no. 19, pp. 7569-7576.
- Li, Y., Li, W., Yang, Y., Lu, Y., He, C., Hu, G., Liu, H., Chen, J., He, J. & Yu, H. 2009c, "MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme", *Brain research*, vol. 1286, pp. 13-18.
- Li, Z., Wang, H., Eyler, C.E., Hjelmeland, A.B. & Rich, J.N. 2009d, "Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways", *The Journal of biological chemistry*, vol. 284, no. 25, pp. 16705-16709.
- Libermann, T.A., Nusbaum, H.R., Razon, N., Kris, R., Lax, I., Soreq, H., Whittle, N., Waterfield, M.D., Ullrich, A. & Schlessinger, J. 1985, "Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin", *Nature*, vol. 313, no. 5998, pp. 144-147.

- Libermann, T.A., Razon, N., Bartal, A.D., Yarden, Y., Schlessinger, J. & Soreq, H. 1984, "Expression of epidermal growth factor receptors in human brain tumors", *Cancer research*, vol. 44, no. 2, pp. 753-760.
- Lie, D.C., Song, H., Colamarino, S.A., Ming, G.L. & Gage, F.H. 2004, "Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases", *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 44, pp. 399-421.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. & Johnson, J.M. 2005, "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs", *Nature*, vol. 433, no. 7027, pp. 769-773.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L. & Yu, J.S. 2006, "Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma", *Molecular cancer*, vol. 5, pp. 67.
- Liu, W., Shen, G., Shi, Z., Shen, F., Zheng, X., Wen, L. & Yang, X. 2008, "Brain tumour stem cells and neural stem cells: still explored by the same approach?", *The Journal of international medical research*, vol. 36, no. 5, pp. 890-895.
- Liu, X., Sempere, L.F., Ouyang, H., Memoli, V.A., Andrew, A.S., Luo, Y., Demidenko, E., Korc, M., Shi, W., Preis, M., Dragnev, K.H., Li, H., Drenzo, J., Bak, M., Freemantle, S.J., Kauppinen, S. & Dmitrovsky, E. 2010, "MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors", *The Journal of clinical investigation*, vol. 120, no. 4, pp. 1298-1309.
- Loeffler, M. 1997, "Stem cells and cellular pedigrees-a conceptual introduction." in *Stem Cells*, ed. M. Stojkovic, Academic Press, London, pp. 1-27.
- Lopata, M.A. & Cleveland, D.W. 1987, "In vivo microtubules are copolymers of available beta-tubulin isotypes: localization of each of six vertebrate beta-tubulin isotypes using polyclonal antibodies elicited by synthetic peptide antigens", *The Journal of cell biology*, vol. 105, no. 4, pp. 1707-1720.
- Lopez-Carballo, G., Moreno, L., Masia, S., Perez, P. & Baretino, D. 2002, "Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 28, pp. 25297-25304.
- Louis, D.N. 1994, "The p53 gene and protein in human brain tumors", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 53, no. 1, pp. 11-21.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W. & Kleihues, P. 2007, "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system", *Acta Neuropathologica*, vol. 114, no. 2, pp. 97-109.

- Lu, C., Huang, X., Zhang, X., Roensch, K., Cao, Q., Nakayama, K.I., Blazar, B.R., Zeng, Y. & Zhou, X. 2011, "miR-221 and miR-155 regulate human dendritic cell development, apoptosis, and IL-12 production through targeting of p27kip1, KPC1, and SOCS-1", *Blood*, vol. 117, no. 16, pp. 4293-4303.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. & Golub, T.R. 2005, "MicroRNA expression profiles classify human cancers", *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 834-838.
- Lu, Y., Thomson, J.M., Wong, H.Y., Hammond, S.M. & Hogan, B.L. 2007, "Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells", *Developmental biology*, vol. 310, no. 2, pp. 442-453.
- Luan, S., Sun, L. & Huang, F. 2010, "MicroRNA-34a: a novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251", *Archives of Medical Research*, vol. 41, no. 2, pp. 67-74.
- Luduena, R.F. 1998, "Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications", *International review of cytology*, vol. 178, pp. 207-275.
- Luzi, P., Rafi, M.A. & Wenger, D.A. 1995, "Structure and organization of the human galactocerebrosidase (GALC) gene", *Genomics*, vol. 26, no. 2, pp. 407-409.
- Maglott, D., Ostell, J., Pruitt, K.D. & Tatusova, T. 2007, "Entrez Gene: gene-centered information at NCBI", *Nucleic acids research*, vol. 35, no. Database issue, pp. D26-31.
- Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A. & Maniatis, T. 2007, "The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing", *Molecular cell*, vol. 27, no. 3, pp. 435-448.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Jr, Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z. & Tainsky, M.A. 1990, "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 250, no. 4985, pp. 1233-1238.
- Malumbres, R. & Lossos, I.S. 2010, "Expression of miRNAs in lymphocytes: a review", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 667, pp. 129-143.
- Mardaryev, A.N., Ahmed, M.I., Vlahov, N.V., Fessing, M.Y., Gill, J.H., Sharov, A.A. & Botchkareva, N.V. 2010, "Micro-RNA-31 controls hair cycle-associated changes in gene expression programs of the skin and hair follicle", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 24, no. 10, pp. 3869-3881.

- Marino, S., Vooijs, M., van Der Gulden, H., Jonkers, J. & Berns, A. 2000, "Induction of medulloblastomas in p53-null mutant mice by somatic inactivation of Rb in the external granular layer cells of the cerebellum", *Genes & development*, vol. 14, no. 8, pp. 994-1004.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., Calabrese, J.M., Dennis, L.M., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Hannett, N., Sharp, P.A., Bartel, D.P., Jaenisch, R. & Young, R.A. 2008, "Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells", *Cell*, vol. 134, no. 3, pp. 521-533.
- Mathupala, S.P., Guthikonda, M. & Sloan, A.E. 2006, "RNAi based approaches to the treatment of malignant glioma", *Technology in cancer research & treatment*, vol. 5, no. 3, pp. 261-269.
- McKean, P.G., Vaughan, S. & Gull, K. 2001, "The extended tubulin superfamily", *Journal of cell science*, vol. 114, no. Pt 15, pp. 2723-2733.
- Medina, R., Zaidi, S.K., Liu, C.G., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., Croce, C.M. & Stein, G.S. 2008, "MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival", *Cancer research*, vol. 68, no. 8, pp. 2773-2780.
- Mellinghoff, I.K., Wang, M.Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D.A., Zhu, S., Dia, E.Q., Lu, K.V., Yoshimoto, K., Huang, J.H., Chute, D.J., Riggs, B.L., Horvath, S., Liao, L.M., Cavenee, W.K., Rao, P.N., Beroukhim, R., Peck, T.C., Lee, J.C., Sellers, W.R., Stokoe, D., Prados, M., Cloughesy, T.F., Sawyers, C.L. & Mischel, P.S. 2005, "Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors", *The New England journal of medicine*, vol. 353, no. 19, pp. 2012-2024.
- Memberg, S.P. & Hall, A.K. 1995, "Dividing neuron precursors express neuron-specific tubulin", *Journal of neurobiology*, vol. 27, no. 1, pp. 26-43.
- Merzak, A., Koocheckpour, S. & Pilkington, G.J. 1994, "CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion in vitro", *Cancer research*, vol. 54, no. 15, pp. 3988-3992.
- Miller, C.R. & Perry, A. 2007, "Glioblastoma", *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, vol. 131, no. 3, pp. 397-406.
- Ming, G.L. & Song, H. 2005, "Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 28, pp. 223-250.
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A.H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J.T., Bray, R.A., Waller, E.K. & Buck, D.W. 1997, "A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning", *Blood*, vol. 90, no. 12, pp. 5013-5021.

- Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Townsend, M., Yoshii, A., Sestan, N., Rakic, P., Constantine-Paton, M. & Horvitz, H.R. 2004, "Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain", *Genome biology*, vol. 5, no. 9, pp. R68.
- Molofsky, A.V., Pardal, R., Iwashita, T., Park, I.K., Clarke, M.F. & Morrison, S.J. 2003, "Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation", *Nature*, vol. 425, no. 6961, pp. 962-967.
- Moore, J.K., Guan, Y.L. & Shi, S.R. 1998, "MAP2 expression in developing dendrites of human brainstem auditory neurons", *Journal of chemical neuroanatomy*, vol. 16, no. 1, pp. 1-15.
- Morshead, C.M., Reynolds, B.A., Craig, C.G., McBurney, M.W., Staines, W.A., Morassutti, D., Weiss, S. & van der Kooy, D. 1994, "Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells", *Neuron*, vol. 13, no. 5, pp. 1071-1082.
- Mott, J.L., Kobayashi, S., Bronk, S.F. & Gores, G.J. 2007, "mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis", *Oncogene*, vol. 26, no. 42, pp. 6133-6140.
- Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R. & Ilsley, D. 2000, "A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation", *Electrophoresis*, vol. 21, no. 1, pp. 128-134.
- Murashov, A.K., Pak, E.S., Hendricks, W.A., Owensby, J.P., Sierpinski, P.L., Tatko, L.M. & Fletcher, P.L. 2005, "Directed differentiation of embryonic stem cells into dorsal interneurons", *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 252-254.
- Murchison, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S. & Hannon, G.J. 2005, "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 34, pp. 12135-12140.
- Muroyama, Y., Kondoh, H. & Takada, S. 2004, "Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 313, no. 4, pp. 915-921.
- Nakano, I., Joshi, K., Visnyei, K., Hu, B., Watanabe, M., Lam, D., Wexler, E., Saigusa, K., Nakamura, Y., Laks, D.R., Mischel, P.S., Viapiano, M. & Kornblum, H.I. 2011, "Siomycin A targets brain tumor stem cells partially through a MELK-mediated pathway", *Neuro-oncology*, vol. 13, no. 6, pp. 622-634.

- Nakano, I., Masterman-Smith, M., Saigusa, K., Paucar, A.A., Horvath, S., Shoemaker, L., Watanabe, M., Negro, A., Bajpai, R., Howes, A., Lelievre, V., Waschek, J.A., Lazareff, J.A., Freije, W.A., Liau, L.M., Gilbertson, R.J., Cloughesy, T.F., Geschwind, D.H., Nelson, S.F., Mischel, P.S., Terskikh, A.V. & Kornblum, H.I. 2008, "Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells", *Journal of neuroscience research*, vol. 86, no. 1, pp. 48-60.
- Nakano, I., Paucar, A.A., Bajpai, R., Dougherty, J.D., Zewail, A., Kelly, T.K., Kim, K.J., Ou, J., Groszer, M., Imura, T., Freije, W.A., Nelson, S.F., Sofroniew, M.V., Wu, H., Liu, X., Terskikh, A.V., Geschwind, D.H. & Kornblum, H.I. 2005, "Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation", *The Journal of cell biology*, vol. 170, no. 3, pp. 413-427.
- Nan, Y., Han, L., Zhang, A., Wang, G., Jia, Z., Yang, Y., Yue, X., Pu, P., Zhong, Y. & Kang, C. 2010, "MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells", *Brain research*, vol. 1359, pp. 14-21.
- Nass, D., Rosenwald, S., Meiri, E., Gilad, S., Tabibian-Keissar, H., Schlosberg, A., Kuker, H., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Kharenko, O., Sitbon, E., Lithwick Yanai, G., Elyakim, E., Cholakh, H., Gibori, H., Spector, Y., Bentwich, Z., Barshack, I. & Rosenfeld, N. 2009, "MiR-92b and miR-9/9* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors", *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 19, no. 3, pp. 375-383.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M. & Donlon, T.A. 1986, "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2", *Brain research*, vol. 387, no. 3, pp. 271-280.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M. & Lazebnik, Y.A. 1995, "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis", *Nature*, vol. 376, no. 6535, pp. 37-43.
- Nogueira, L., Ruiz-Ontanon, P., Vazquez-Barquero, A., Lafarga, M., Berciano, M.T., Aldaz, B., Grande, L., Casafont, I., Segura, V., Robles, E.F., Suarez, D., Garcia, L.F., Martinez-Climent, J.A. & Fernandez-Luna, J.L. 2011, "Blockade of the NFkappaB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both in vitro and in vivo", *Oncogene*, vol. 30, no. 32, pp. 3537-3548.
- Nottebohm, F. 2004, "The road we travelled: discovery, choreography, and significance of brain replaceable neurons", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1016, pp. 628-658.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J.E. 2007, "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice", *Nature*, vol. 445, no. 7123, pp. 106-110.

- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V. & Mendell, J.T. 2005, "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression", *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 839-843.
- Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., McCormick, P.C., Canoll, P. & Bruce, J.N. 2008, "Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas", *Neurosurgery*, vol. 62, no. 2, pp. 505-14; discussion 514-5.
- Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S. & Imai, T. 2005, "Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells", *Experimental cell research*, vol. 306, no. 2, pp. 349-356.
- Oliver, F.J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M.C., de Murcia, G. & Murcia, J.M. 1998, "Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant", *The Journal of biological chemistry*, vol. 273, no. 50, pp. 33533-33539.
- Pandita, A., Aldape, K.D., Zadeh, G., Guha, A. & James, C.D. 2004, "Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR", *Genes, chromosomes & cancer*, vol. 39, no. 1, pp. 29-36.
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K.S. 2008, "MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells", *Cancer research*, vol. 68, no. 19, pp. 8164-8172.
- Park, S.Y., Lee, J.H., Ha, M., Nam, J.W. & Kim, V.N. 2009, "miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42", *Nature structural & molecular biology*, vol. 16, no. 1, pp. 23-29.
- Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J.E., Nakafuku, M., Vescovi, A. & Guillemot, F. 2004, "Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain", *The EMBO journal*, vol. 23, no. 22, pp. 4495-4505.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. & Ruvkun, G. 2000, "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA", *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 86-89.
- Passegue, E., Jamieson, C.H., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. 2003, "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100 Suppl 1, pp. 11842-11849.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A. & Rafii, S. 2000, "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors", *Blood*, vol. 95, no. 3, pp. 952-958.

- Pekarsky, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C.G., Rassenti, L., Calin, G.A., Hagan, J.P., Kipps, T. & Croce, C.M. 2006, "Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181", *Cancer research*, vol. 66, no. 24, pp. 11590-11593.
- Peraud, A., Mondal, S., Hawkins, C., Mastronardi, M., Bailey, K. & Rutka, J.T. 2003, "Expression of fascin, an actin-bundling protein, in astrocytomas of varying grades", *Brain tumor pathology*, vol. 20, no. 2, pp. 53-58.
- Pfenninger, C.V., Roschupkina, T., Hertwig, F., Kottwitz, D., Englund, E., Bengzon, J., Jacobsen, S.E. & Nuber, U.A. 2007, "CD133 is not present on neurogenic astrocytes in the adult subventricular zone, but on embryonic neural stem cells, ependymal cells, and glioblastoma cells", *Cancer research*, vol. 67, no. 12, pp. 5727-5736.
- Phillips, H.S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W.F., Soriano, R.H., Wu, T.D., Misra, A., Nigro, J.M., Colman, H., Soroceanu, L., Williams, P.M., Modrusan, Z., Feuerstein, B.G. & Aldape, K. 2006, "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis", *Cancer cell*, vol. 9, no. 3, pp. 157-173.
- Piccirillo, S.G., Reynolds, B.A., Zanetti, N., Lamorte, G., Binda, E., Broggi, G., Brem, H., Olivi, A., Dimeco, F. & Vescovi, A.L. 2006, "Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells", *Nature*, vol. 444, no. 7120, pp. 761-765.
- Pieper, R.O. 2009, "Transformed Human Brain Cells in Culture as a Model for Brain Tumors" in *CNS Cancer*, ed. E.G. Meir, Humana Press, New York, pp. 163-180.
- Pilkington, G.J., Akinwunmi, J., Ognjenovic, N. & Rogers, J.P. 1993, "Differential binding of anti-CD44 on human gliomas in vitro", *Neuroreport*, vol. 4, no. 3, pp. 259-262.
- Pilkington, G.J. & Lantos, P.L. 1994, "Biological markers for tumours of the brain", *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, vol. 21, pp. 3-41.
- Pirouzmand, F. & Sadanand, V. 2007, "The incidence trends of primary brain tumors in Saskatchewan from 1970 to 2001", *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, vol. 34, no. 2, pp. 181-186.
- Ponomarev, V., Doubrovin, M., Serganova, I., Vider, J., Shavrin, A., Beresten, T., Ivanova, A., Ageyeva, L., Tourkova, V., Balatoni, J., Bornmann, W., Blasberg, R. & Gelovani Tjuvajev, J. 2004, "A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging", *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, vol. 31, no. 5, pp. 740-751.

- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M. & Alvarez-Buylla, A. 2006, "Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells", *The Journal of comparative neurology*, vol. 494, no. 3, pp. 415-434.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M. & Morrison, S.J. 2008, "Efficient tumour formation by single human melanoma cells", *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 593-598.
- Read, T.A., Fogarty, M.P., Markant, S.L., McLendon, R.E., Wei, Z., Ellison, D.W., Febbo, P.G. & Wechsler-Reya, R.J. 2009, "Identification of CD15 as a marker for tumor-propagating cells in a mouse model of medulloblastoma", *Cancer cell*, vol. 15, no. 2, pp. 135-147.
- Reeves, S.A., Helman, L.J., Allison, A. & Israel, M.A. 1989, "Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 86, no. 13, pp. 5178-5182.
- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K., Meltzer, P.S. & Collins, V.P. 1994, "Amplification of multiple genes from chromosomal region 12q13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplicons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2", *Cancer research*, vol. 54, no. 16, pp. 4299-4303.
- Reilly, K.M., Loisel, D.A., Bronson, R.T., McLaughlin, M.E. & Jacks, T. 2000, "Nf1;Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects", *Nature genetics*, vol. 26, no. 1, pp. 109-113.
- Reilly, K.M., Rubin, J.B., Gilbertson, R.J., Garbow, J.R., Roussel, M.F. & Gutmann, D.H. 2008, "Rethinking brain tumors: the fourth Mouse Models of Human Cancers Consortium nervous system tumors workshop", *Cancer research*, vol. 68, no. 14, pp. 5508-5511.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. & Ruvkun, G. 2000, "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, vol. 403, no. 6772, pp. 901-906.
- Ren, Y., Kang, C.S., Yuan, X.B., Zhou, X., Xu, P., Han, L., Wang, G.X., Jia, Z., Zhong, Y., Yu, S., Sheng, J. & Pu, P.Y. 2010a, "Co-delivery of as-miR-21 and 5-FU by poly(amidoamine) dendrimer attenuates human glioma cell growth in vitro", *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, vol. 21, no. 3, pp. 303-314.
- Ren, Y., Zhou, X., Mei, M., Yuan, X.B., Han, L., Wang, G.X., Jia, Z.F., Xu, P., Pu, P.Y. & Kang, C.S. 2010b, "MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol", *BMC cancer*, vol. 10, pp. 27.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. 2001, "Stem cells, cancer, and cancer stem cells", *Nature*, vol. 414, no. 6859, pp. 105-111.
- Reynolds, B.A. & Rietze, R.L. 2005, "Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship", *Nature methods*, vol. 2, no. 5, pp. 333-336.
- Reynolds, B.A. & Weiss, S. 1996, "Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell", *Developmental biology*, vol. 175, no. 1, pp. 1-13.
- Reynolds, B.A. & Weiss, S. 1992, "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 255, no. 5052, pp. 1707-1710.
- Rich, J.N. 2007, "Cancer stem cells in radiation resistance", *Cancer research*, vol. 67, no. 19, pp. 8980-8984.
- Rietze, R.L., Valcanis, H., Brooker, G.F., Thomas, T., Voss, A.K. & Bartlett, P.F. 2001, "Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain", *Nature*, vol. 412, no. 6848, pp. 736-739.
- Ringertz, N. 1950, "Grading of gliomas", *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, vol. 27, no. 1, pp. 51-64.
- Romer, J.T., Kimura, H., Magdaleno, S., Sasai, K., Fuller, C., Baines, H., Connelly, M., Stewart, C.F., Gould, S., Rubin, L.L. & Curran, T. 2004, "Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in Ptc1(+/-)p53(-/-) mice", *Cancer cell*, vol. 6, no. 3, pp. 229-240.
- Rooprai, H.K., Liyanage, K., King, A., Davies, D., Martin, K. & Pilkington, G.J. 1999, "CD44 expression in human meningiomas: An immunocytochemical, immunohistochemical and flow cytometric analysis", *International journal of oncology*, vol. 14, no. 5, pp. 855-860.
- Roy, N.S., Wang, S., Jiang, L., Kang, J., Benraiss, A., Harrison-Restelli, C., Fraser, R.A., Couldwell, W.T., Kawaguchi, A., Okano, H., Nedergaard, M. & Goldman, S.A. 2000, "In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus", *Nature medicine*, vol. 6, no. 3, pp. 271-277.
- Rutka, J.T., Muller, M., Hubbard, S.L., Forsdike, J., Dirks, P.B., Jung, S., Tsugu, A., Ivanchuk, S., Costello, P., Mondal, S., Ackerley, C. & Becker, L.E. 1999, "Astrocytoma adhesion to extracellular matrix: functional significance of integrin and focal adhesion kinase expression", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 58, no. 2, pp. 198-209.
- Saito, R., Krauze, M.T., Noble, C.O., Drummond, D.C., Kirpotin, D.B., Berger, M.S., Park, J.W. & Bankiewicz, K.S. 2006, "Convection-enhanced delivery of Ls-TPT enables an effective, continuous, low-dose chemotherapy against malignant glioma xenograft model", *Neuro-oncology*, vol. 8, no. 3, pp. 205-214.

- Sakariassen, P.O., Prestegarden, L., Wang, J., Skaftnesmo, K.O., Mahesparan, R., Molthoff, C., Sminia, P., Sundlisaeter, E., Misra, A., Tysnes, B.B., Chekenya, M., Peters, H., Lende, G., Kalland, K.H., Oyan, A.M., Petersen, K., Jonassen, I., van der Kogel, A., Feuerstein, B.G., Terzis, A.J., Bjerkvig, R. & Enger, P.O. 2006, "Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 44, pp. 16466-16471.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A. & Berger, M.S. 2005, "Neural stem cells and the origin of gliomas", *The New England journal of medicine*, vol. 353, no. 8, pp. 811-822.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., Berger, M.S. & Alvarez-Buylla, A. 2004, "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration", *Nature*, vol. 427, no. 6976, pp. 740-744.
- Sarkaria, J.N., Yang, L., Grogan, P.T., Kitange, G.J., Carlson, B.L., Schroeder, M.A., Galanis, E., Giannini, C., Wu, W., Dinca, E.B. & James, C.D. 2007, "Identification of molecular characteristics correlated with glioblastoma sensitivity to EGFR kinase inhibition through use of an intracranial xenograft test panel", *Molecular cancer therapeutics*, vol. 6, no. 3, pp. 1167-1174.
- Satoh, M.S. & Lindahl, T. 1992, "Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair", *Nature*, vol. 356, no. 6367, pp. 356-358.
- Schmittgen, T.D., Lee, E.J., Jiang, J., Sarkar, A., Yang, L., Elton, T.S. & Chen, C. 2008, "Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA", *Methods (San Diego, Calif.)*, vol. 44, no. 1, pp. 31-38.
- Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D. & Wrensch, M. 2006, "Epidemiology and molecular pathology of glioma", *Nature clinical practice.Neurology*, vol. 2, no. 9, pp. 494-503; quiz 1 p following 516.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. 2004, "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus", *The Journal of comparative neurology*, vol. 478, no. 4, pp. 359-378.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J.M., McEwen, B.S. & Alvarez-Buylla, A. 2001, "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 21, no. 18, pp. 7153-7160.
- Shete, S., Hosking, F.J., Robertson, L.B., Dobbins, S.E., Sanson, M., Malmer, B., Simon, M., Marie, Y., Boisselier, B., Delattre, J.Y., Hoang-Xuan, K., El Hallani, S., Idbaih, A., Zelenika, D., Andersson, U., Henriksson, R., Bergenheim, A.T., Feychting, M., Lonn, S., Ahlbom, A., Schramm, J., Linnebank, M., Hemminki, K., Kumar, R., Hepworth, S.J., Price, A., Armstrong, G., Liu, Y., Gu, X., Yu, R., Lau, C., Schoemaker, M., Muir, K., Swerdlow, A., Lathrop, M., Bondy, M. & Houlston, R.S. 2009, "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma", *Nature genetics*, vol. 41, no. 8, pp. 899-904.

- Shi, L., Chen, J., Yang, J., Pan, T., Zhang, S. & Wang, Z. 2010a, "MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity", *Brain research*, vol. 1352, pp. 255-264.
- Shi, L., Zhang, J., Pan, T., Zhou, J., Gong, W., Liu, N., Fu, Z. & You, Y. 2010b, "MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation", *Brain research*, vol. 1312, pp. 120-126.
- Shih, A.H., Dai, C., Hu, X., Rosenblum, M.K., Koutcher, J.A. & Holland, E.C. 2004, "Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis", *Cancer research*, vol. 64, no. 14, pp. 4783-4789.
- Silber, J., Lim, D.A., Petritsch, C., Persson, A.I., Maunakea, A.K., Yu, M., Vandenberg, S.R., Ginzinger, D.G., James, C.D., Costello, J.F., Bergers, G., Weiss, W.A., Alvarez-Buylla, A. & Hodgson, J.G. 2008, "miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells", *BMC medicine*, vol. 6, pp. 14.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J. & Dirks, P.B. 2003, "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors", *Cancer research*, vol. 63, no. 18, pp. 5821-5828.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D. & Dirks, P.B. 2004, "Identification of human brain tumour initiating cells", *Nature*, vol. 432, no. 7015, pp. 396-401.
- Singh, S.K., Kagalwala, M.N., Parker-Thornburg, J., Adams, H. & Majumder, S. 2008, "REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells", *Nature*, vol. 453, no. 7192, pp. 223-227.
- Slaby, O., Svoboda, M., Fabian, P., Smerdova, T., Knoflickova, D., Bednarikova, M., Nenutil, R. & Vyzula, R. 2007, "Altered expression of miR-21, miR-31, miR-143 and miR-145 is related to clinicopathologic features of colorectal cancer", *Oncology*, vol. 72, no. 5-6, pp. 397-402.
- Smith, M.A., Freidlin, B., Ries, L.A. & Simon, R. 1998, "Trends in reported incidence of primary malignant brain tumors in children in the United States", *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, no. 17, pp. 1269-1277.
- Sommer, I. & Schachner, M. 1981, "Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system", *Developmental biology*, vol. 83, no. 2, pp. 311-327.
- Song, J.J., Smith, S.K., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. 2004, "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 305, no. 5689, pp. 1434-1437.

- Song, L., Coppola, D., Livingston, S., Cress, D. & Haura, E.B. 2005, "Mcl-1 regulates survival and sensitivity to diverse apoptotic stimuli in human non-small cell lung cancer cells", *Cancer biology & therapy*, vol. 4, no. 3, pp. 267-276.
- Soria, J.M., Tagliatela, P., Gil-Perotin, S., Galli, R., Gritti, A., Verdugo, J.M. & Bertuzzi, S. 2004, "Defective postnatal neurogenesis and disorganization of the rostral migratory stream in absence of the Vax1 homeobox gene", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 24, no. 49, pp. 11171-11181.
- Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W. & Chang, E.H. 1990, "Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome", *Nature*, vol. 348, no. 6303, pp. 747-749.
- Stiles, C.D. & Rowitch, D.H. 2008, "Glioma stem cells: a midterm exam", *Neuron*, vol. 58, no. 6, pp. 832-846.
- Stockhausen, M.T., Kristoffersen, K. & Poulsen, H.S. 2010, "The functional role of Notch signaling in human gliomas", *Neuro-oncology*, vol. 12, no. 2, pp. 199-211.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group 2009, "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial", *The lancet oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 459-466.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups & National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group 2005, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma", *The New England journal of medicine*, vol. 352, no. 10, pp. 987-996.
- Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D. & Collins, V.P. 1990, "Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 21, pp. 8602-8606.
- Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., Kim, V.N. & Kim, K.S. 2004, "Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs", *Developmental biology*, vol. 270, no. 2, pp. 488-498.

- Sullivan, K.F. 1988, "Structure and utilization of tubulin isotypes", *Annual Review of Cell Biology*, vol. 4, pp. 687-716.
- Sun, F., Wang, J., Pan, Q., Yu, Y., Zhang, Y., Wan, Y., Wang, J., Li, X. & Hong, A. 2009, "Characterization of function and regulation of miR-24-1 and miR-31", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 380, no. 3, pp. 660-665.
- Takakura, S., Mitsutake, N., Nakashima, M., Namba, H., Saenko, V.A., Rogounovitch, T.I., Nakazawa, Y., Hayashi, T., Ohtsuru, A. & Yamashita, S. 2008, "Oncogenic role of miR-17-92 cluster in anaplastic thyroid cancer cells", *Cancer science*, vol. 99, no. 6, pp. 1147-1154.
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. 2004, "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival", *Cancer research*, vol. 64, no. 11, pp. 3753-3756.
- Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A.G., Brown, D. & Ochiya, T. 2010, "Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes", *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 18, no. 1, pp. 181-187.
- Talotta, F., Cimmino, A., Matarazzo, M.R., Casalino, L., De Vita, G., D'Esposito, M., Di Lauro, R. & Verde, P. 2009, "An autoregulatory loop mediated by miR-21 and PDCD4 controls the AP-1 activity in RAS transformation", *Oncogene*, vol. 28, no. 1, pp. 73-84.
- Tamaki, S., Eckert, K., He, D., Sutton, R., Doshe, M., Jain, G., Tushinski, R., Reitsma, M., Harris, B., Tsukamoto, A., Gage, F., Weissman, I. & Uchida, N. 2002, "Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain", *Journal of neuroscience research*, vol. 69, no. 6, pp. 976-986.
- Taulli, R., Bersani, F., Foglizzo, V., Linari, A., Vigna, E., Ladanyi, M., Tuschl, T. & Ponzetto, C. 2009, "The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation", *The Journal of clinical investigation*, vol. 119, no. 8, pp. 2366-2378.
- Taylor, M.D., Poppleton, H., Fuller, C., Su, X., Liu, Y., Jensen, P., Magdaleno, S., Dalton, J., Calabrese, C., Board, J., Macdonald, T., Rutka, J., Guha, A., Gajjar, A., Curran, T. & Gilbertson, R.J. 2005, "Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma", *Cancer cell*, vol. 8, no. 4, pp. 323-335.

- Terao, M., Fratelli, M., Kurosaki, M., Zanetti, A., Guarnaccia, V., Paroni, G., Tsykin, A., Lupi, M., Gianni, M., Goodall, G.J. & Garattini, E. 2011, "Induction of miR-21 by retinoic acid in estrogen receptor-positive breast carcinoma cells: biological correlates and molecular targets", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 5, pp. 4027-4042.
- Tewari, M., Quan, L.T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S. & Dixit, V.M. 1995, "Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase", *Cell*, vol. 81, no. 5, pp. 801-809.
- Thomson, J.M., Parker, J., Perou, C.M. & Hammond, S.M. 2004, "A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression", *Nature methods*, vol. 1, no. 1, pp. 47-53.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., Castoldi, M., Soutschek, J., Koteliansky, V., Rosenwald, A., Basson, M.A., Licht, J.D., Pena, J.T., Rouhanifard, S.H., Muckenthaler, M.U., Tuschl, T., Martin, G.R., Bauersachs, J. & Engelhardt, S. 2008, "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts", *Nature*, vol. 456, no. 7224, pp. 980-984.
- Tirabosco, R., De Maglio, G., Skrap, M., Falconieri, G. & Pizzolitto, S. 2008, "Expression of the Polycomb-Group protein BMI1 and correlation with p16 in astrocytomas an immunohistochemical study on 80 cases", *Pathology, research and practice*, vol. 204, no. 9, pp. 625-631.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A. & Manz, M.G. 2004, "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 304, no. 5667, pp. 104-107.
- Tunici, P., Bissola, L., Lualdi, E., Pollo, B., Cajola, L., Broggi, G., Sozzi, G. & Finocchiaro, G. 2004, "Genetic alterations and in vivo tumorigenicity of neurospheres derived from an adult glioblastoma", *Molecular cancer*, vol. 3, pp. 25.
- Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H. & Weissman, I.L. 2000, "Direct isolation of human central nervous system stem cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 26, pp. 14720-14725.
- Uhrbom, L., Dai, C., Celestino, J.C., Rosenblum, M.K., Fuller, G.N. & Holland, E.C. 2002, "Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt", *Cancer research*, vol. 62, no. 19, pp. 5551-5558.
- Uhrbom, L., Hesselager, G., Nister, M. & Westermarck, B. 1998, "Induction of brain tumors in mice using a recombinant platelet-derived growth factor B-chain retrovirus", *Cancer research*, vol. 58, no. 23, pp. 5275-5279.

- Uziel, T., Karginov, F.V., Xie, S., Parker, J.S., Wang, Y.D., Gajjar, A., He, L., Ellison, D., Gilbertson, R.J., Hannon, G. & Roussel, M.F. 2009, "The miR-17~92 cluster collaborates with the Sonic Hedgehog pathway in medulloblastoma", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 8, pp. 2812-2817.
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L. & Weinberg, R.A. 2009, "A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis", *Cell*, vol. 137, no. 6, pp. 1032-1046.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., Alexe, G., Lawrence, M., O'Kelly, M., Tamayo, P., Weir, B.A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., Feiler, H.S., Hodgson, J.G., James, C.D., Sarkaria, J.N., Brennan, C., Kahn, A., Spellman, P.T., Wilson, R.K., Speed, T.P., Gray, J.W., Meyerson, M., Getz, G., Perou, C.M., Hayes, D.N. & Cancer Genome Atlas Research Network 2010, "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1", *Cancer cell*, vol. 17, no. 1, pp. 98-110.
- Vescovi, A.L., Galli, R. & Reynolds, B.A. 2006, "Brain tumour stem cells", *Nature reviews.Cancer*, vol. 6, no. 6, pp. 425-436.
- Vescovi, A.L., Parati, E.A., Gritti, A., Poulin, P., Ferrario, M., Wanke, E., Frolichsthal-Schoeller, P., Cova, L., Arcellana-Panlilio, M., Colombo, A. & Galli, R. 1999, "Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation", *Experimental neurology*, vol. 156, no. 1, pp. 71-83.
- Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., 2nd, Dowell, J.M., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., Bigner, D.D., Friedman, A.H. & Friedman, H.S. 2007, "Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 13, no. 4, pp. 1253-1259.
- Walczak, C.E. & Heald, R. 2008, "Mechanisms of mitotic spindle assembly and function", *International review of cytology*, vol. 265, pp. 111-158.
- Wang, H., Garzon, R., Sun, H., Ladner, K.J., Singh, R., Dahlman, J., Cheng, A., Hall, B.M., Qualman, S.J., Chandler, D.S., Croce, C.M. & Guttridge, D.C. 2008, "NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma", *Cancer cell*, vol. 14, no. 5, pp. 369-381.
- Wang, H., Wang, H., Zhang, W., Huang, H.J., Liao, W.S. & Fuller, G.N. 2004, "Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 84, no. 8, pp. 941-951.

- Watanabe, T., Yokoo, H., Yokoo, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P. & Ohgaki, H. 2001, "Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, vol. 60, no. 12, pp. 1181-1189.
- Wei, Q., Clarke, L., Scheidenhelm, D.K., Qian, B., Tong, A., Sabha, N., Karim, Z., Bock, N.A., Reti, R., Swoboda, R., Purev, E., Lavoie, J.F., Bajenaru, M.L., Shannon, P., Herlyn, D., Kaplan, D., Henkelman, R.M., Gutmann, D.H. & Guha, A. 2006, "High-grade glioma formation results from postnatal pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model", *Cancer research*, vol. 66, no. 15, pp. 7429-7437.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A. & Huttner, W.B. 1997, "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 23, pp. 12425-12430.
- Weiss, W.A., Burns, M.J., Hackett, C., Aldape, K., Hill, J.R., Kuriyama, H., Kuriyama, N., Milshteyn, N., Roberts, T., Wendland, M.F., DePinho, R. & Israel, M.A. 2003, "Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma", *Cancer research*, vol. 63, no. 7, pp. 1589-1595.
- Wen, P.Y. & Kesari, S. 2008, "Malignant gliomas in adults", *The New England journal of medicine*, vol. 359, no. 5, pp. 492-507.
- Wenger, D.A., Rafi, M.A. & Luzi, P. 1997, "Molecular genetics of Krabbe disease (globoid cell leukodystrophy): diagnostic and clinical implications", *Human mutation*, vol. 10, no. 4, pp. 268-279.
- Westermarck, B., Heldin, C.H. & Nister, M. 1995, "Platelet-derived growth factor in human glioma", *Glia*, vol. 15, no. 3, pp. 257-263.
- Wick, W., Platten, M. & Weller, M. 2009, "New (alternative) temozolomide regimens for the treatment of glioma", *Neuro-oncology*, vol. 11, no. 1, pp. 69-79.
- Wienholds, E., Koudijs, M.J., van Eeden, F.J., Cuppen, E. & Plasterk, R.H. 2003, "The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development", *Nature genetics*, vol. 35, no. 3, pp. 217-218.
- Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. 1993, "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*", *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 855-862.
- Wong, A.J., Ruppert, J.M., Bigner, S.H., Grzeschik, C.H., Humphrey, P.A., Bigner, D.S. & Vogelstein, B. 1992, "Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 89, no. 7, pp. 2965-2969.

- Wrensch, M., Jenkins, R.B., Chang, J.S., Yeh, R.F., Xiao, Y., Decker, P.A., Ballman, K.V., Berger, M., Buckner, J.C., Chang, S., Giannini, C., Halder, C., Kollmeyer, T.M., Kosel, M.L., LaChance, D.H., McCoy, L., O'Neill, B.P., Patoka, J., Pico, A.R., Prados, M., Quesenberry, C., Rice, T., Rynearson, A.L., Smirnov, I., Tihan, T., Wiemels, J., Yang, P. & Wiencke, J.K. 2009, "Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility", *Nature genetics*, vol. 41, no. 8, pp. 905-908.
- Wrensch, M., Minn, Y., Chew, T., Bondy, M. & Berger, M.S. 2002, "Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature", *Neuro-oncology*, vol. 4, no. 4, pp. 278-299.
- Xia, H.F., He, T.Z., Liu, C.M., Cui, Y., Song, P.P., Jin, X.H. & Ma, X. 2009, "MiR-125b expression affects the proliferation and apoptosis of human glioma cells by targeting Bmf", *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, vol. 23, no. 4-6, pp. 347-358.
- Xiao, A., Wu, H., Pandolfi, P.P., Louis, D.N. & Van Dyke, T. 2002, "Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation", *Cancer cell*, vol. 1, no. 2, pp. 157-168.
- Xiao, A., Yin, C., Yang, C., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P. & Van Dyke, T. 2005, "Somatic induction of Pten loss in a preclinical astrocytoma model reveals major roles in disease progression and avenues for target discovery and validation", *Cancer research*, vol. 65, no. 12, pp. 5172-5180.
- Yamashita, Y., Krauze, M.T., Kawaguchi, T., Noble, C.O., Drummond, D.C., Park, J.W. & Bankiewicz, K.S. 2007, "Convection-enhanced delivery of a topoisomerase I inhibitor (nanoliposomal topotecan) and a topoisomerase II inhibitor (pegylated liposomal doxorubicin) in intracranial brain tumor xenografts", *Neuro-oncology*, vol. 9, no. 1, pp. 20-28.
- Yang, Z.J. & Wechsler-Reya, R.J. 2007, "Hit 'em where they live: targeting the cancer stem cell niche", *Cancer cell*, vol. 11, no. 1, pp. 3-5.
- Yekta, S., Shih, I.H. & Bartel, D.P. 2004, "MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 304, no. 5670, pp. 594-596.
- Yin, A.H., Miraglia, S., Zanjani, E.D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A.G., Olweus, J., Kearney, J. & Buck, D.W. 1997, "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells", *Blood*, vol. 90, no. 12, pp. 5002-5012.
- Yip, K.W. & Reed, J.C. 2008, "Bcl-2 family proteins and cancer", *Oncogene*, vol. 27, no. 50, pp. 6398-6406.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L. & Yu, J.S. 2004, "Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme", *Oncogene*, vol. 23, no. 58, pp. 9392-9400.

- Zechner, D., Fujita, Y., Hulsken, J., Muller, T., Walther, I., Taketo, M.M., Crenshaw, E.B., 3rd, Birchmeier, W. & Birchmeier, C. 2003, "beta-Catenin signals regulate cell growth and the balance between progenitor cell expansion and differentiation in the nervous system", *Developmental biology*, vol. 258, no. 2, pp. 406-418.
- Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B.M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. & Herold-Mende, C.C. 2008, "Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients", *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 14, no. 1, pp. 123-129.
- Zhang, B., Gojo, I. & Fenton, R.G. 2002, "Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma", *Blood*, vol. 99, no. 6, pp. 1885-1893.
- Zhang, C., Kang, C., You, Y., Pu, P., Yang, W., Zhao, P., Wang, G., Zhang, A., Jia, Z., Han, L. & Jiang, H. 2009, "Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo", *International journal of oncology*, vol. 34, no. 6, pp. 1653-1660.
- Zhang, J., Han, L., Ge, Y., Zhou, X., Zhang, A., Zhang, C., Zhong, Y., You, Y., Pu, P. & Kang, C. 2010, "miR-221/222 promote malignant progression of glioma through activation of the Akt pathway", *International journal of oncology*, vol. 36, no. 4, pp. 913-920.
- Zhao, J.J., Lin, J., Lwin, T., Yang, H., Guo, J., Kong, W., Dessureault, S., Moscinski, L.C., Reznia, D., Dalton, W.S., Sotomayor, E., Tao, J. & Cheng, J.Q. 2010, "microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma", *Blood*, vol. 115, no. 13, pp. 2630-2639.
- Zheng, H., Ying, H., Yan, H., Kimmelman, A.C., Hiller, D.J., Chen, A.J., Perry, S.R., Tonon, G., Chu, G.C., Ding, Z., Stommel, J.M., Dunn, K.L., Wiedemeyer, R., You, M.J., Brennan, C., Wang, Y.A., Ligon, K.L., Wong, W.H., Chin, L. & DePinho, R.A. 2008, "p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation", *Nature*, vol. 455, no. 7216, pp. 1129-1133.
- Zhi, F., Chen, X., Wang, S., Xia, X., Shi, Y., Guan, W., Shao, N., Qu, H., Yang, C., Zhang, Y., Wang, Q., Wang, R., Zen, K., Zhang, C.Y., Zhang, J. & Yang, Y. 2010, "The use of hsa-miR-21, hsa-miR-181b and hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma", *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 46, no. 9, pp. 1640-1649.
- Zhou, X., Zhang, J., Jia, Q., Ren, Y., Wang, Y., Shi, L., Liu, N., Wang, G., Pu, P., You, Y. & Kang, C. 2010, "Reduction of miR-21 induces glioma cell apoptosis via activating caspase 9 and 3", *Oncology reports*, vol. 24, no. 1, pp. 195-201.

- Zhu, H., Acquaviva, J., Ramachandran, P., Boskovitz, A., Woolfenden, S., Pfannl, R., Bronson, R.T., Chen, J.W., Weissleder, R., Housman, D.E. & Charest, A. 2009, "Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 8, pp. 2712-2716.
- Zhu, Y., Guignard, F., Zhao, D., Liu, L., Burns, D.K., Mason, R.P., Messing, A. & Parada, L.F. 2005, "Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma", *Cancer cell*, vol. 8, no. 2, pp. 119-130.
- Zülch, K.J. 1979, "Histologic typing of tumours of the central nervous system" in World Health Organization, Switzerland.

ANEXO: PUBLICACIÓN

ORIGINAL ARTICLE

Blockade of the NFκB pathway drives differentiating glioblastoma-initiating cells into senescence both *in vitro* and *in vivo*

L Nogueira¹, P Ruiz-Ontañón¹, A Vazquez-Barquero², M Lafarga³, MT Berciano³, B Aldaz⁴, L Grande¹, I Casafont³, V Segura⁵, EF Robles⁴, D Suarez², LF Garcia⁶, JA Martinez-Climent⁴ and JL Fernandez-Luna¹

¹Molecular Genetics Unit, Hospital Valdecilla, and Instituto de Formacion e Investigacion Marques de Valdecilla (IFIMAV), Av Cardenal Herrera Oria s/n, Santander, Spain; ²Service of Neurosurgery, Hospital Valdecilla, Av Valdecilla s/n, Santander, Spain; ³Department of Anatomy and Cell Biology, and Centro de Investigacion Biomedica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas, University of Cantabria-IFIMAV, Santander, Spain; ⁴Division of Oncology, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain; ⁵Bioinformatics Unit, Center for Applied Medical Research (CIMA), University of Navarra, Pamplona, Spain and ⁶PharmaMar, Madrid, Spain

Glioblastoma multiforme is one of the most devastating cancers and presents unique challenges to therapy because of its aggressive behavior. Cancer-initiating or progenitor cells have been described to be the only cell population with tumorigenic capacity in glioblastoma. Therefore, effective therapeutic strategies targeting these cells or the early precursors may be beneficial. We have established different cultures of glioblastoma-initiating cells (GICs) derived from surgical specimens and found that, after induction of differentiation, the NFκB transcriptional pathway was activated, as determined by analyzing key proteins such as p65 and IκB and the upregulation of a number of target genes. We also showed that blockade of nuclear factor (NF)κB signaling in differentiating GICs by different genetic strategies or treatment with small-molecule inhibitors, promoted replication arrest and senescence. This effect was partly mediated by reduced levels of the NFκB target gene cyclin D1, because its downregulation by RNA interference reproduced a similar phenotype. Furthermore, these results were confirmed in a xenograft model. Intravenous treatment of immunodeficient mice bearing human GIC-derived tumors with a novel small-molecule inhibitor of the NFκB pathway induced senescence of tumor cells but no ultrastructural alterations of the brain parenchyma were detected. These findings reveal that activation of NFκB may keep differentiating GICs from acquiring a mature postmitotic phenotype, thus allowing cell proliferation, and support the rationale for therapeutic strategies aimed to promote premature senescence of differentiating GICs by blocking key factors within the NFκB pathway. *Oncogene* advance online publication, 21 March 2011; doi:10.1038/onc.2011.74

Keywords: NFκB; glioblastoma-initiating cells; senescence; differentiation

Introduction

Glioblastoma multiforme is the most common and malignant primary tumor of the central nervous system. Work in glioblastoma and breast cancers supports the idea that cancer-initiating cells may possess innate resistance mechanisms against radiation- and chemotherapy-induced cell death, allowing them to survive and initiate tumor recurrence (Eyler and Rich, 2008). Many anticancer treatments promote DNA damage (cytotoxic agents), or inhibit proliferation and angiogenesis, mainly using small molecules or antibodies to block the activity of different kinases. An alternative strategy against cancer is the differentiation therapy. Although clinical development of differentiation-inducing agents to treat solid tumors has been limited, some of these agents have been shown to potentiate the effect of conventional chemotherapy or radiation therapy (Kawamata *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2010). The process of carcinogenesis involves dysregulated, unlimited proliferation and an ability to bypass the senescence program. Treatment of tumor cells with many conventional cancer therapies activates DNA damage signaling pathways, which induce apoptosis in some cells and senescence in others (Shay and Roninson, 2004). Thus, a deep understanding of the molecular mechanisms of differentiation and therapy-induced senescence of cancer-initiating cells might provide selective and targeted molecules for novel antitumor strategies.

Nuclear factor (NF)κB is one of the major transcription factors associated with cancer and it has been implicated in many hallmarks of cancer development, including growth factor-independent proliferation, inhibition of apoptosis, limitless replicative potential and tissue invasion and metastasis (Naugler and Karin, 2008). NFκB also seems to have relevant activities in initiating cells. To this end, it has been shown that inhibition of this transcription factor maintains pluripotency of mouse embryonic-initiating cells (Torres and Watt, 2008), promotes condrogenesis by human mesenchymal-initiating cells (Wehling *et al.*, 2009) and controls the number of neural progenitor cells (Widera *et al.*, 2006; Young *et al.*, 2006).

Correspondence: Dr JL Fernandez-Luna, Molecular Genetics Unit, Hospital Valdecilla, Edificio IFIMAV, Av Cardenal Herrera Oria s/n, Santander 39011, Spain.

E-mail: fluna@humv.es

Received 16 August 2010; revised and accepted 11 February 2011

In this study, we used both *in vitro* assays and mouse models to examine the effects of NFκB blockade on the differentiation of glioblastoma-initiating cells (GICs). We demonstrated that inhibition of the NFκB pathway promoted growth arrest, differentiation to mature phenotypes and senescence of GICs in culture, which can be partially reproduced by inhibition of cyclin D1 (CND1). We also showed that administration of a small-molecule inhibitor of NFκB signaling drove tumor cells into senescence in xenografted mice. These results highlight that activation of NFκB is a common feature of differentiating GICs that may be beneficial for tumor cells to retain their proliferative capacity and avoid premature cellular senescence.

Results

NFκB is activated in GICs undergoing differentiation

We have studied several GIC cultures generated from surgical specimens. GICs form characteristic renewable neurospheres, express the neural progenitor cell marker Nestin (Figure 1a) and are able to proliferate indefinitely without differentiation. Flow cytometry analyses revealed that all neurosphere cultures contained between 3 and 8% of CD133-positive cells (data not shown), which is consistent with previous data (Beier *et al.*, 2007). As expected, all GIC cultures retained the tumor formation ability as determined by bioluminescence imaging after injecting dissociated cells, stably expressing luciferase, into the brain of immunodeficient mice (Figure 1b). When we promote differentiation of GICs by adding fetal calf serum, a method widely used in this cell system (Singh *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006), cells acquire astrocytic (between 48 and 66%) and neuronal (between 22 and 45%) phenotypes as revealed by the presence of lineage markers such as GFAP (an astrocyte-specific intermediate filament protein) and Tuj1 (a neuron-specific class III β-tubulin) (Figure 1c). Withdrawal of growth factors also induced differentiation, but cells exhibited less pronounced morphologic changes (data not shown). Immunostaining of O4 sulfatides, a marker of immature and differentiated oligodendrocytes, was scarce or absent, which is consistent with previous data (Hemmati *et al.*, 2003). As expected, the mRNA expression levels of progenitor cell markers, CD133, Sox2, Nanog and Nestin decrease, and those of lineage-specific markers, GFAP and Tuj1, increase during differentiation of GICs, as determined by quantitative reverse transcriptase-PCR (Figure 1d).

In order to find genes involved in the control of differentiation of GICs, we searched for variations in the mRNA levels of target genes of different signaling pathways by using microarray gene expression analyses of GICs before and after differentiation for 4 days. This study revealed the upregulation of cytokines and chemokines, including interleukin (IL)-8, IL-11, IL-6, IL-1β, IL-15 and CCL2 and genes with diverse biological functions, including cell cycle regulation (CND1), cell adhesion (CD44) and proteolysis (TFPI2,

PLAU), which are known targets of the NFκB pathway (Figure 1e). Moreover, these data were confirmed by multiplex reverse transcriptase-PCR, showing increased levels of IL-1β, IL-8, IL-15 and CCL2 in differentiated cells (Figure 1f), and by an immunoassay that detected a ninefold increase in IL-1β concentration in the culture medium of cells undergoing differentiation (Figure 1g). Next, we studied the activation status of NFκB in progenitor and differentiated cell populations. Confocal microscopy demonstrated the nuclear localization of the p65 subunit of NFκB (active state) in a high proportion of differentiated cells ($67.3 \pm 11.2\%$, mean \pm s.d., $P < 0.001$) as compared with the progenitor cell population where $> 90\%$ of the cells contained p65 within the cytoplasm (inactive state) (Figure 2a). We further confirmed this result by assessing a reduction in p65 protein levels in the cytoplasm accompanied by increased expression of nuclear p65 (Figure 2b), an increase in binding of NFκB to a consensus DNA sequence (Figure 2c) and a higher level of phosphorylated IκB, which is a marker of NFκB activation (Figures 2d and e), in differentiated cells. Even after 27 days of differentiation, NFκB was active by electrophoretic mobility shift assay (Figure 2c) and cells remained proliferating (data not shown). Other signaling pathways that are also regulated by kinases did not show significant and reproducible variations in activity as determined by the phosphorylation status of key proteins such as Akt, ERK and Stat3 (Figure 2d) when comparing neurosphere cultures and differentiated cells.

Downmodulation of NFκB activity accelerates maturation of differentiating GICs

To determine the contribution of NFκB in the differentiation process of GICs, we studied the *in vitro* behavior of these cells after blockade of the NFκB pathway. For this purpose, GICs were transfected with either IKK2-K44M, a dominant-negative mutant of IKK2 (Mercurio *et al.*, 1997), or srIκB, a 'super-repressor' of NFκB function (Brown *et al.*, 1995). Overexpression of both proteins (Figure 3a) efficiently reduced the activity of a luciferase reporter gene driven by six tandem repeats of the NFκB consensus site (Figure 3b). To facilitate the follow-up of genetically modified cells in culture, GICs were co-transfected with the mutant genes and with the enhanced green fluorescence protein (EGFP)-containing vector. Even 6 days after transfection with either mutant, no significant differences ($P > 0.1$) in size (neurosphere diameters between 126 and 144 μm) or morphology of the neurospheres could be detected (Figure 3c). Similar transfection efficiencies were obtained as determined by quantifying the median fluorescence intensity (Figure 3d). This result is consistent with the low or even no activation of NFκB in the progenitor tumor cells (Figure 2). On the contrary, we showed that GICs undergoing differentiation were clearly affected by blockade of NFκB signaling. Progenitor cells were transfected with either empty pcDNA3 and red fluorescence protein or IKK2-K44M plus EGFP. Both

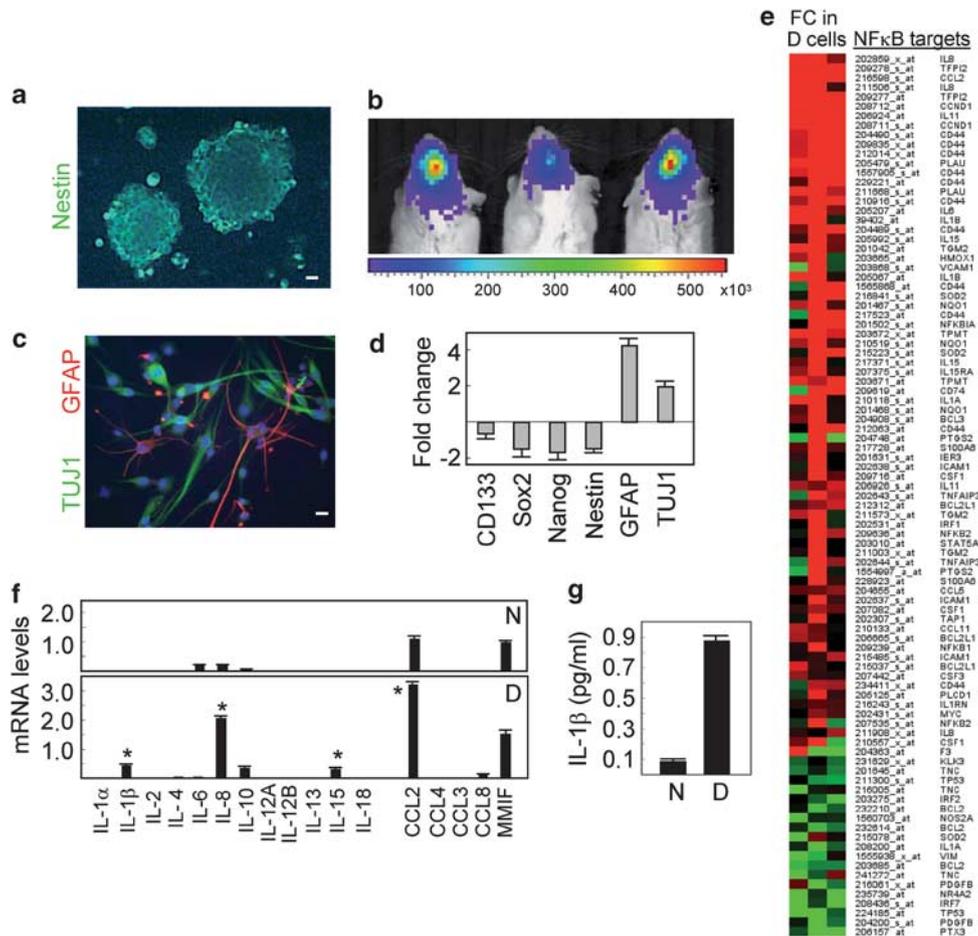


Figure 1 Expression pattern of differentiating GICs. (a) GICs form neurospheres that stain positive for Nestin by immunofluorescence. (b) Three neurosphere cultures stably expressing luciferase were inoculated into immunodeficient mice via intracranial injection and tumor growth was monitored by bioluminescence imaging (the scale bar displays relative light units). (c) GICs were cultured in the presence of fetal calf serum (FCS), and after 5 days, differentiating cells were stained with anti-GFAP (red) and anti-Tuj1 (green). (d) Total RNA was extracted from GICs before and after differentiation, and the expression of progenitor (Nestin, CD133, Sox2, Nanog) and lineage (Tuj1, GFAP) markers was analyzed by quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR. The expression levels were represented as fold changes of differentiated compared with progenitor cells. All markers showed significant differences ($P < 0.01$). (e) Fold-change (FC) in the expression of NFκB target genes in differentiated cells relative to progenitor cells in three different cultures. Upregulation is shown in red and downregulation in green. Affymetrix probe identification numbers are shown. (f) The mRNA expression of different NFκB target genes was analyzed by multiplex RT-PCR. Asterisks represent significant differences ($P < 0.01$) compared with GICs. (g) The culture media of progenitor and differentiating cells were tested for IL-1β levels after 7 days of incubation. N, neurosphere cultures (GICs); D, differentiated cells. Histograms represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. Scale bars: 10 μ m.

transfected cell populations were mixed and cultured in differentiation medium. After 5 days, significant differences ($P < 0.0001$) in morphology were detected by measuring the length of the long axis of the cells. Control cells (red label) were round shaped with short and thin cytoplasmic processes (long-axis length, $68.4 \pm 21.1 \mu\text{m}$, mean \pm s.d.) whereas IKK2 mutant-transfected cells (green label) developed neuron-like bipolar extensions (long-axis length, $120.6 \pm 45 \mu\text{m}$, mean \pm s.d.) (Figure 3e). Similar results were obtained when GICs were transfected with srIkB (a representative image is shown in Figure 4a). Before assess the lineage pattern, we confirmed that the NFκB pathway was downregulated by showing a reduction in the nuclear levels of p65 (Figure 4b). Then, srIkB-transfected GICs undergoing differentiation, were labeled with anti-Tuj1

or anti-GFAP antibodies. The results, represented in Figure 4c, show a significant increase in the fluorescence intensity of Tuj1-positive cells and a reduced fluorescence of GFAP-positive cells with respect to cells transfected with the empty vector.

Persistent blockade of the NFκB pathway by a small-molecule inhibitor induces a senescence phenotype in GICs undergoing differentiation

In order to translate our findings into a more pharmacologically relevant setting, we used a recently described glycosylated indolocarbazol, 70124 (compound 8), with a potent ($< 30 \mu\text{M}$) IKK2 inhibition activity (Sanchez *et al.*, 2009), in our differentiation model. We showed that treatment of differentiated GICs

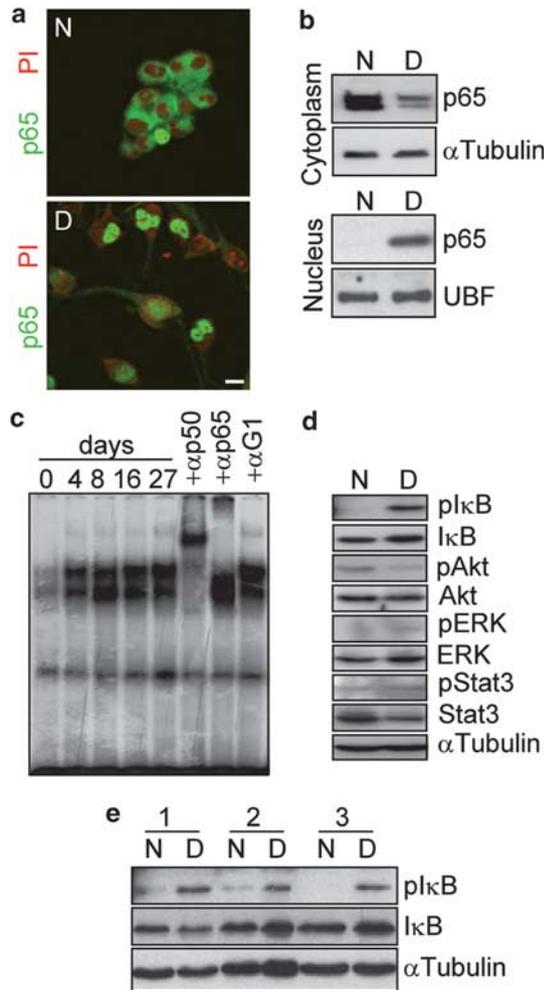


Figure 2 Differentiation of GICs activates the NFκB pathway. (a) Progenitor and differentiated cells were stained with anti-p65 antibodies (green), counterstained with propidium iodide (red) and analyzed by confocal microscopy. Scale bars: 10 μm. (b) The expression levels of p65 in cytoplasmic and nuclear fractions were determined by western blot analysis. N, neurospheres; D, differentiating cells. To normalize protein loading, the levels of α-tubulin and the transcription factor UBF were also analyzed. (c) Nuclear extracts from GICs differentiated for increasing periods of time, were analyzed for the formation of protein-DNA complexes by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a radiolabelled NFκB consensus probe. Supershift analysis was performed using anti-p50, anti-p65 and irrelevant anti-GATA1 (α-G1) antibodies. (d) NFκB activation monitored with anti-pIκB antibodies and activation of other signaling pathways monitored with antibodies against the phosphorylated (active) forms of Akt, ERK and Stat3 was determined by western blot of neurospheres and differentiating cells. (e) Western blot of progenitor and differentiating cells from three independent cultures to determine the levels of pIκB and total IκB. The levels of α-tubulin were also analyzed to assure equal loading.

with 1 μM 70124 reduced the NFκB activity, as determined by the levels of pIκB, even more efficiently than 2 μM Bay-117083, a widely used inhibitor of the NFκB pathway (Figure 5a). Further evidence came from electrophoretic mobility shift assay experiments, showing reduced formation of NFκB-DNA binding complexes following exposure to 70124 (Figure 5b).

Consistent with our previous data using the genetic strategies, treatment of differentiating GICs with 70124 resulted in upregulated mRNA expression of neuronal markers Tuj1 and MAP2 and downregulation of GFAP and, to a lesser extent, S100B (Figure 5c). To further confirm this differentiation pattern, GICs were transfected with the GFAP promoter or the MAP2 promoter cloned into a luciferase reporter vector. Following differentiation, only the MAP2 promoter was activated in response to 70124 (Figure 5d). Using these methodologies, the neuronal pattern was confirmed in three more GIC cultures treated with the IKK2 inhibitor.

Downregulation of NFκB activity by 70124 correlated with reduced proliferation of differentiating cells, as the proportion of cells stained for Ki-67 proliferation marker decreased from $56.3 \pm 18.7\%$ in control cells to $15.2 \pm 4.5\%$ (mean \pm s.d.) in treated cells ($P < 0.0001$) (Figure 5e), and $62.1 \pm 7.6\%$ (mean \pm s.d.) of treated cells ($P < 0.001$, compared with control cells) translocated β-catenin from the nucleus, where it has been associated with proliferation, to the cytoplasm (Figure 5f). In addition, treatment with the inhibitor resulted in loss of phosphorylation of the Rb protein, which is associated with growth inhibition (Figure 5g).

CND1 has been suggested to maintain an undifferentiated phenotype of neuroblasts (Molenaar *et al.*, 2008). As this gene was consistently upregulated in differentiated cells (Figure 1e), we evaluated its contribution to the NFκB-mediated control of differentiating GICs. Quantitative reverse transcriptase-PCR analyses confirmed that the expression levels of CND1 increased following differentiation of GICs and this upregulation was blocked in the presence of 70124 (Figure 6a). NFκB inhibition by srIκB also promoted significant reduction of CND1 mRNA levels, although the difference was less pronounced than that obtained with the small-molecule inhibitor (Figure 6b). Then, we used an RNA interference strategy to efficiently downregulate CND1 (Figure 6c). The majority of cells transfected with the specific interference RNA showed a more mature phenotype with longer cytoplasmic extensions, a higher proportion of Tuj1-positive neuronal precursors ($61 \pm 9.4\%$, mean \pm s.d.), and reduction of the proliferation marker Ki-67 ($72.3 \pm 8.1\%$, mean \pm s.d.), as compared with control short hairpin RNA-transfected cells ($P < 0.01$) (Figures 6d and e).

Polyploidy is considered to indicate terminal differentiation and senescence (Gandarillas *et al.*, 2000; Gupta, 2000). Interestingly, treatment of differentiating GICs with 70124 increased more than five times ($P < 0.001$) the tetraploid cell fraction and generated $> 30\%$ of octaploid cells (Figure 7a). Moreover, the advancement in cell ploidy was verified to be associated with the appearance of megalonuclei by 4,6-diamidino-2-phenylindole staining (detected in $75.2 \pm 12\%$, mean \pm s.d., of the cells, $P < 0.001$), and increased proportion of senescent cells ($57.3 \pm 9.8\%$, mean \pm s.d., of the cells, $P < 0.001$) as detected by senescence-associated β-galactosidase staining (Figure 7b). Senescence is also associated with focal accumulation of phospho-histone H2AX at the sites of DNA double-strand breaks (Gire *et al.*, 2004). Consistently, untreated cells showed

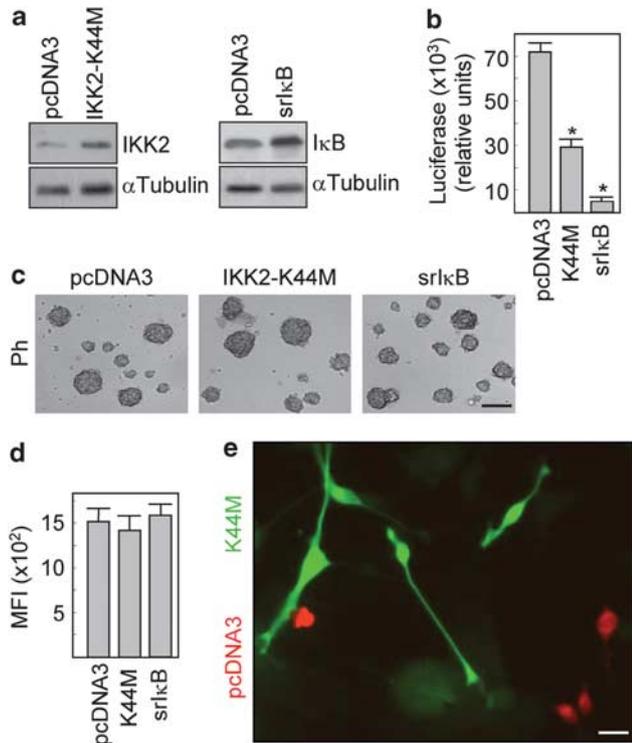


Figure 3 Blockade of NFκB signaling in differentiating GICs accelerates differentiation. (a) GICs were transfected with the indicated vectors and overexpression of IKK2 and IκB proteins was assessed by western blotting. (b) GICs were transfected with the indicated vectors and a luciferase reporter plasmid-containing NFκB consensus sites. Cell extracts were analyzed for the relative luciferase activity. Histograms represent the mean ± s.d. of three independent experiments. Asterisks represent significant differences compared with control pcDNA3-transfected cells ($P < 0.001$). (c) GICs were transfected with the indicated expression vectors, together with EGFP. Six days after transfection, neurospheres were visualized by phase contrast (Ph). Scale bar: 150 μm. (d) Median fluorescence intensity (MFI) of GICs based on flow cytometric analysis was determined to assure equal transfection efficiencies. (e) GICs were transfected with pcDNA3 and red fluorescence protein or with the IKK2 dominant-negative mutant and EGFP. Both cell populations were mixed and after 5 days of differentiation, transfected cells were monitored by fluorescent microscopy. Scale bar: 50 μm.

a dot-like or weak staining pattern of the phosphorylated histone, whereas after treatment with the inhibitor we detected focal accumulation of this protein in $28.6 \pm 6.4\%$ (mean ± s.d) of cells ($P < 0.001$) (Figure 7c). Consistent with the acquisition of a senescent phenotype, treatment with 70124 reduced the proliferation capacity of differentiating GICs over time (Figure 7d). Genetic strategies used to downregulate the NFκB activation increased the number of β-gal-positive cells (Figure 7e), induced large multilobulated nuclei and reduced the proportion of proliferating Ki-67-positive cells (Figures 7f and g), further strengthening the specificity of the observed effects with the small-molecule inhibitor.

Treatment with 70124 induces tumor cell senescence in mice xenografted with GICs

We next tried to confirm our *in vitro* data on the senescence of differentiating GICs in response to the

NFκB inhibitor, using an *in vivo* xenograft model. Cells stably transfected with a plasmid containing both EGFP and luciferase (Ponomarev *et al.*, 2004) were injected intracranially into six immunodeficient mice, and tumor growth was monitored by noninvasive bioluminescent and microPET imaging (Figure 8a and data not shown). Figure 8 shows a representative experiment with two mice. Eight weeks after injection, mice with engrafted tumors were treated intravenously with 70124 or saline buffer. As shown in Figure 8a, treatment with the NFκB inhibitor eliminated the ¹¹C-Met uptake as determined by the maximum standardized uptake value (SUVmax) on microPET, indicating a decreased metabolic activity of tumor cells. Subsequent histological analysis revealed the presence of xenograft tumors that occupied areas of up to 1 mm² per coronal brain section (Figure 8b), which was verified by detecting the EGFP-dependent fluorescence of tumor cells (Figure 8c). Electron microscopy of ultrathin sections that included both tumor tissue and brain parenchyma from mice treated with 70124 showed that tumor cells displayed enlarged lobulated nuclei, as previously detected in the *in vitro* experiments. Of note, the brain parenchyma of treated mice did not show any apparent ultrastructural modification (Figure 8d). Labeling of squash preparations of the tumor tissue with anti-pIκB confirmed that treatment with the IKK2 inhibitor virtually eliminated the phosphorylation of IκB and thus inhibited NFκB activation in tumor cells (Figure 8e). 4,6-Diamidino-2-phenylindole staining of squash preparations detected the presence of cells ($57.4 \pm 8.7\%$, mean ± s.d., $P < 0.001$ compared with control mice) with aberrant nuclei in tumor tissue from 70124-treated mice (Figure 8f). Furthermore, tumor cells from mice treated with the inhibitor showed a threefold reduction ($P < 0.0001$) in telomeric signal intensity for individual nuclei compared with untreated mice, indicating a decrease in telomere length (Figure 8g), which is known to trigger cell cycle arrest and replicative senescence in human cells (Baird *et al.*, 2003). Additionally, $46.1 \pm 11.4\%$ (mean ± s.d.) of tumor cells from treated mice were positive for senescence-associated β-galactosidase staining as compared with $6.4 \pm 3.5\%$ in control mice ($P < 0.0001$) (Figure 8h). The presence of the lineage marker Tuj1 showed a tendency to increase in treated mice, but this increase was not statistically significant ($P > 0.1$).

Discussion

Accumulating evidence suggests that GICs may drive tumor development and represent a useful therapeutic target (Cheng *et al.*, 2010). We have shown that activation of NFκB is upregulated during differentiation of GICs. In agreement with this, it has been described that expression and activity of NFκB is comparatively low in undifferentiated embryonic-initiating cells, but increases following induction of differentiation (Kang *et al.*, 2007; Torres and Watt, 2008). The low activation of NFκB detected in GICs suggests that NFκB may be dispensable for survival and proliferation of these tumor

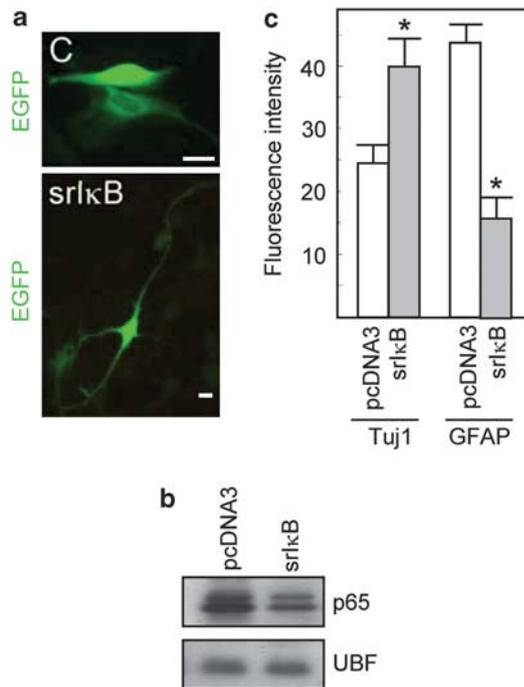


Figure 4 Inhibition of NF κ B activity modifies the differentiation pattern of GICs. (a) GICs were co-transfected with empty vector, (C), or I κ B super-repressor and EGFP and cultured in differentiation medium. Green fluorescence of transfected cells was monitored. Scale bars: 15 μ m. (b) The expression levels of p65 in the nuclear fraction of transfected cells were determined by western blot. To normalize protein loading, the levels of UBF were also analyzed. (c) GICs were co-transfected with empty vector (pcDNA3) or srlkB, and EGFP to identify transfected cells. After 3 days of differentiation, cells were stained with Texas red-conjugated anti-Tuj1 or anti-GFAP antibodies and the fluorescence intensity was measured using ImageJ software. Asterisks represent significant differences ($P < 0.01$) compared with pcDNA3-transfected cells.

progenitor cells, which correlates with data showing that p65 immunoreactivity is abundant in the cytoplasm of the majority of cells within neurospheres derived from embryonic mouse brain, but only occasional weak nuclear localization (active state) is detected (Young *et al.*, 2006).

NF κ B has been described to function as an inducer and an inhibitor of differentiation, which reflects its heterogeneity in activities depending on the cell system studied (Zhang *et al.*, 1998; Li and Makarov, 2006; Pevsner-Fischer *et al.*, 2007; Vaira *et al.*, 2008). We showed that blockade of NF κ B by using genetic strategies or small-molecule inhibitors accelerate maturation of differentiating GICs. In the majority of our cultures, GICs containing a downregulated NF κ B pathway tend to differentiate toward a neuronal phenotype, which might reflect the need of NF κ B-dependent survival factors by astrocytes. In line with this, Bcl-x_L, an antiapoptotic NF κ B target gene, contributes to the survival of primary astrocytes in culture (Lee *et al.*, 2009), and it has been suggested that inhibition of the NF κ B pathway blocks astroglial differentiation from mesencephalic neural precursors (Sabolek *et al.*, 2006). However, tumor cells obtained from xenografted mice

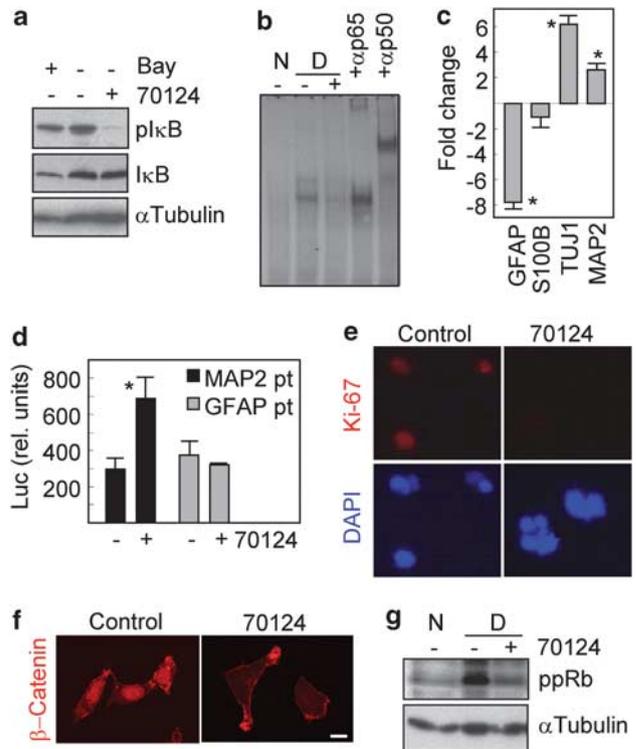


Figure 5 A small-molecule inhibitor of IKK2, 70124, promotes growth arrest and modifies the differentiation pattern of GICs. (a) Differentiating GICs were treated with 1 μ M 70124 or 2 μ M Bay-117083 for 24 h and then protein expression was analyzed by western blot. The levels of α -tubulin were also analyzed to assure equal loading. (b) Nuclear extracts from GICs (N) and cells differentiated for 3 days (D) treated (+) or not treated (-) with 70124, were analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a NF κ B probe. Supershift analyses were performed with the indicated antibodies. (c) Differentiating GICs were incubated with 70124 and then the mRNA expression of lineage-specific genes was determined by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR. The expression levels were represented as fold changes of treated compared with untreated cells. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$). (d) GICs were transfected with pGL2-MAP2 or pGL2-GFAP promoter constructs and cultured in differentiation medium. Cell extracts were analyzed for luciferase activity. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$) compared with untreated cells. (e) Expression of Ki-67 in GICs differentiated during 9 days. Cells were counterstained with 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Scale bar: 15 μ m. (f) Cells were incubated with the NF κ B inhibitors as described above and the intracellular localization of β -catenin was visualized by confocal microscopy. Scale bar: 15 μ m. (g) Neurospheres (N) and differentiating cells (D) were analyzed for the phosphorylation status of pRb. Histograms represent the mean \pm s.d. of three independent experiments.

only showed a tendential, but not significant, pattern of neuronal differentiation after treatment with the NF κ B activation inhibitor. This difference may be due to the low number of mice included in this study. Alternatively, the *in vitro* conditions used may facilitate a particular differentiation pathway, which is in line with recent data showing that increasing extracellular matrix rigidity enhances neurogenesis of neuroblastoma cell lines (Lam *et al.*, 2010).

There are evidences in other cell systems that suggest the role of NF κ B in terminal differentiation. For instance,

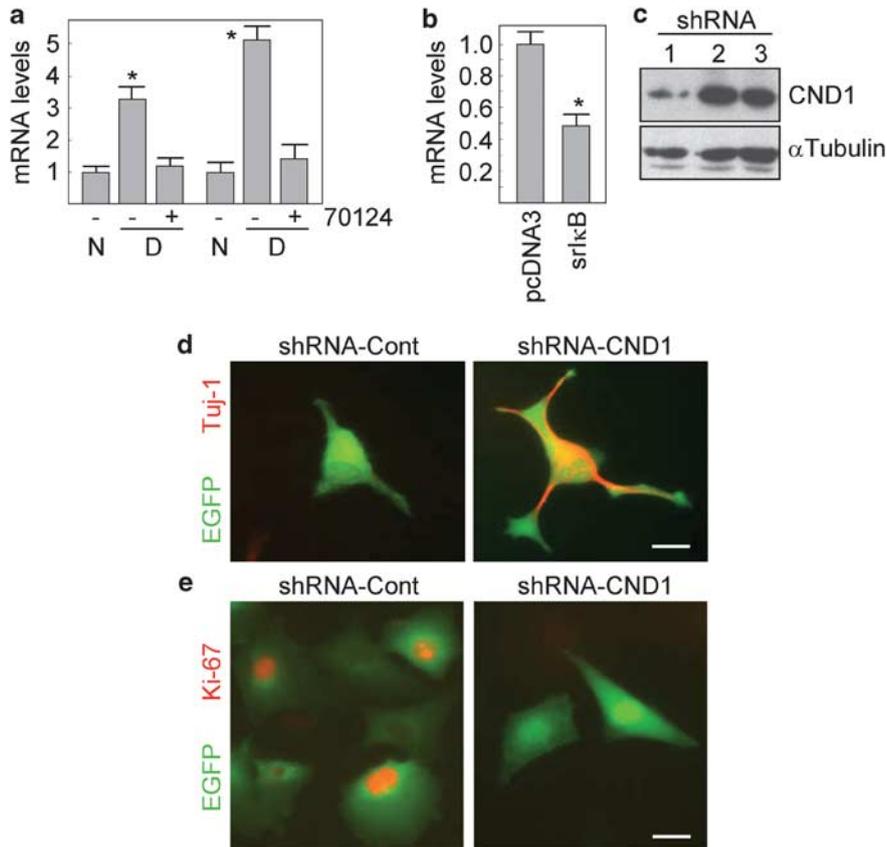


Figure 6 RNA interference of CND1 reproduces the phenotypic changes induced by NFκB blockade. (a) Neurospheres (N), and differentiating cells (D), from two different GIC cultures were incubated with 70124 and analyzed for the expression of CND1 mRNA by quantitative reverse transcriptase (RT)-PCR. Asterisks represent significant differences ($P < 0.001$) compared with untreated neurospheres. (b) CND1 mRNA levels in differentiating cells transfected with srIkB. Asterisk indicates significant difference relative to the pcDNA3-transfected cells ($P < 0.001$). (c) GICs were transfected with two plasmids containing short hairpin RNAs (shRNAs) to CND1 (lanes 1 and 2), and a scrambled shRNA-negative control (lane 3), along with an EGFP-containing vector. The knockdown efficiency of the plasmids was determined by western blot analysis. The levels of α-tubulin were also analyzed to assure equal loading. (d) CND1 knockdown GICs (EGFP-positive) were differentiated for 6 days and stained with anti-Tuj1 antibodies (red). (e) The expression of Ki-67 (red) in co-transfected GICs differentiated during 3 days was determined by immunofluorescence. Scale bars: 15 μm.

signaling through the NFκB activator receptor activator of NFκB (RANK) not only promotes proliferation but also inhibits the terminal differentiation of mammary epithelial cells (Gonzalez-Suarez *et al.*, 2007). Our data show that maintained NFκB blockade in GICs undergoing differentiation, promotes proliferation arrest, morphological changes (enlarged and flattened shape), polyploidy, increase in phospho-H2AX-containing nuclear foci and induction of β-gal, which are features of cellular senescence. Consistently, it has been described that exposure of human tumor cells to different stimuli, including chemotherapeutic drugs, ionizing radiation and differentiation agents, can induce morphological, enzymatic and ploidy changes resembling replicative senescence of normal cells (Chang *et al.*, 1999). The senescence pathway in embryonic stem cells can be characterized by the activity of p53 and Rb, absence of telomerase, and inactivity of Akt signaling (Miura *et al.*, 2004). Akt mediates NFκB activation through phosphorylation of IKKα (Ozes *et al.*, 1999). Therefore, an inactive Akt kinase may lead to a downregulated NFκB

pathway, which could contribute to the senescence phenotype in embryonic stem cells.

Tumor-suppressor p53 has a major role in the regulation of senescence. Recent data show that CXCR2 (IL-8 receptor) promotes premature senescence of primary human fibroblasts via a p53-dependent mechanism, and suggest that senescent cells activate a self-amplifying secretory program in which CXCR2 ligands reinforce growth arrest (Acosta *et al.*, 2008). Interestingly, the main CXCR2 ligand, IL-8, is a NFκB target that we find consistently upregulated during differentiation of GICs (Figure 1e). As the GIC cultures studied here express wild-type p53, it is likely that IL-8 and other chemokines transcriptionally activated by NFκB contribute to promote p53-dependent senescence. We also showed that knockdown of CND1 reproduces part of the phenotype observed by inhibition of the NFκB signaling. In good agreement with our findings, CND1 knockdown in neuroblasts promoted a reduction in cell proliferation and an extensive neuronal differentiation (Molenaar *et al.*, 2008).

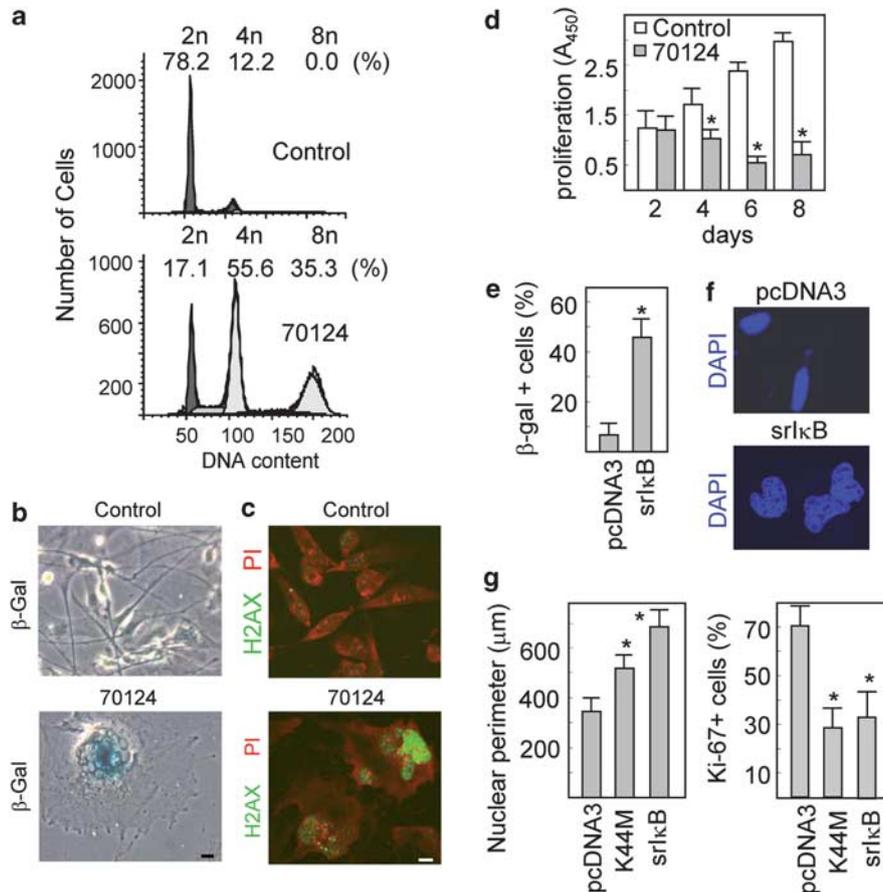


Figure 7 Treatment with 70124 induces polyploidy and senescence of differentiating GICs. **(a)** GICs were differentiated for 14 days in the absence or in the presence of 70124. Then, nuclei were stained with propidium iodide and DNA content was analyzed by flow cytometry. **(b)** The same culture conditions were used to determine the senescent phenotype as assessed by analyzing β -gal activity. Scale bar: 10 μ m. **(c)** Detection of histone H2AX phosphorylation. Cells were counterstained with propidium iodide in the absence of nuclease treatment. Scale bar: 10 μ m. **(d)** GICs were incubated in differentiation medium with or without 70124 for the indicated time intervals, and then cell proliferation was determined by a colorimetric assay. Histograms represent the mean \pm s.d. of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.001$) compared with untreated cells. **(e–g)** GICs were transfected with the indicated plasmids and stable transfectants were selected. These cells were differentiated during 20 days and then **(e)** β -gal staining, **(f)** nuclear morphology after 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, and **(g)** nuclear size (measured as nuclear perimeter) and the percentage of Ki-67-positive cells were determined. Asterisk indicates significant differences relative to the pcDNA3-transfected cells ($P < 0.01$).

Importantly, treatment of xenografted mice bearing GIC-derived tumors with 70124, a potent IKK2 inhibitor, induced a senescence phenotype in tumor cells, confirming our *in vitro* data. Therefore, both *in vitro* and *in vivo* models demonstrate that differentiating GICs undergo growth arrest and senescence in response to NF κ B signaling inhibition.

As summarized in Figure 9, our data suggest that direct activation of the NF κ B pathway may be an efficient strategy for differentiating GICs to maintain their proliferative potential, and blockade of this transcriptional pathway drives tumor cells into senescence. In support of this, c-Neu/ErbB2-transformed mouse mammary gland cells, cultured as sphere-forming progenitors, assume typical epithelial appearance following a differentiation stimulus, and grow to some extent, but inhibition of NF κ B signaling promotes cellular senescence (Cao *et al.*, 2007).

Overall, these findings provide the rationale for therapeutic strategies aimed to promote senescence of GICs by blocking key factors within the NF κ B pathway.

Materials and methods

Primary tumor neurosphere cultures

Tumor samples were obtained from patients after informed written consent had been given, as approved by the Research Ethics Board at the Valdecilla Hospital. Tissue was subjected to enzymatic digestion, and then tumor cells were resuspended in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing human recombinant EGF (20 ng/ml; Sigma, St Louis, MO, USA), bFGF (20 ng/ml; Sigma), B-27 (20 μ l/ml of medium; Invitrogen) and heparin (2 μ g/ml), and plated at a density of 3×10^6 live cells/60-mm plate. Primary neurospheres were detected

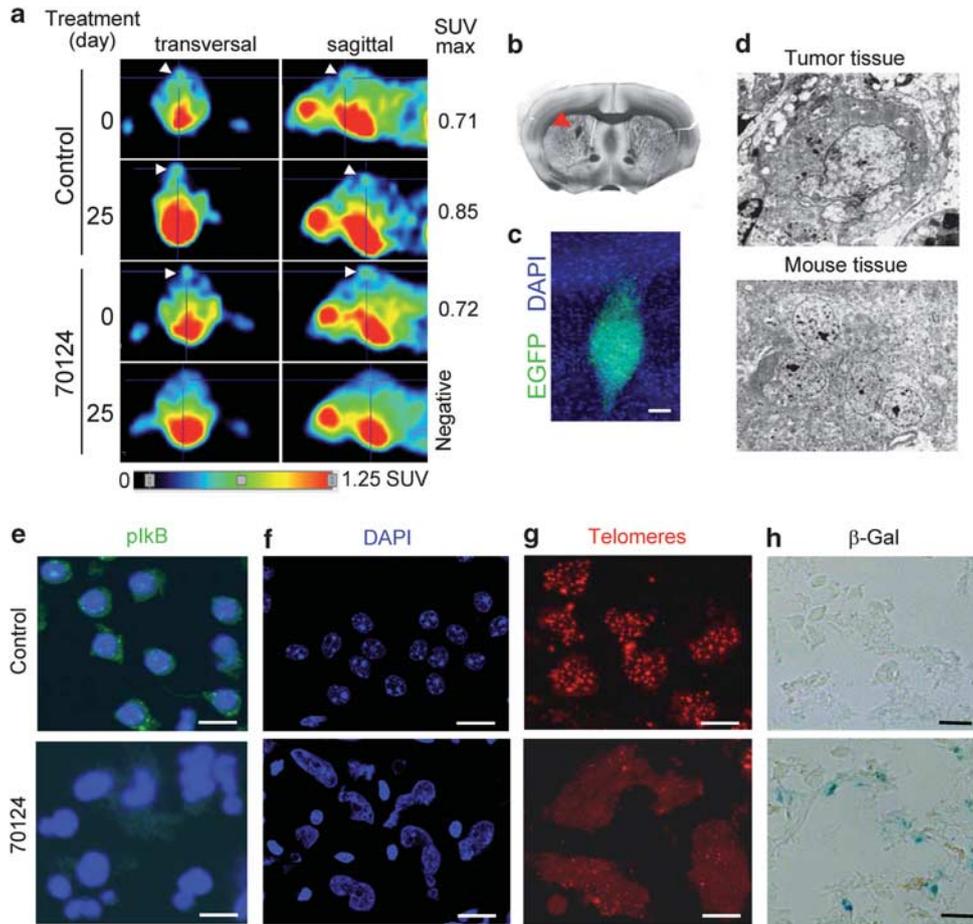


Figure 8 Treatment with 70124 promotes cellular senescence in xenograft tumors. **(a)** GICs transfected with EGFP and luciferase genes were inoculated into immunodeficient mice via intracranial injection, and after 8 weeks mice were treated with intravenous saline solution or 10 mg/kg 70124 twice weekly for 25 days. Tumor response was monitored using microPET imaging. SUV max, maximum standardized uptake value of ^{11}C -Met. **(b)** and **(c)** Histological analysis and EGFP-derived fluorescence of brain sections confirmed the presence of brain tumors. Scale bar: 250 μm . **(d)** Electron microscopy of tumor tissue and normal brain parenchyma. **(e–h)** Squash preparations with dissociated tumor cells were labeled with anti-pI κB **(e)**, stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) **(f)**, processed for *in situ* hybridization of telomeric DNA **(g)**, and analyzed for β -gal activity at neutral pH **(h)**. Scale bars: 20 μm .

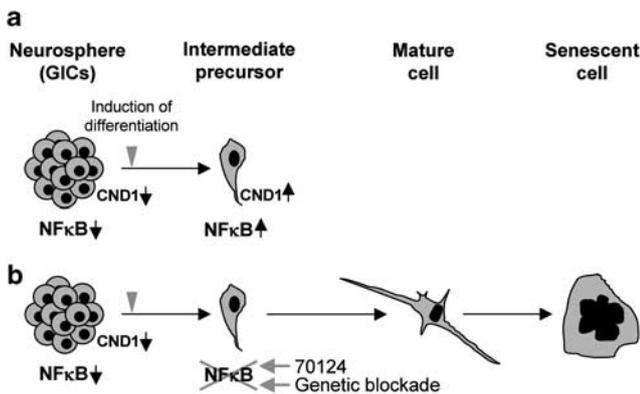


Figure 9 A schematic model representing the role of NFκB in differentiating GICs. **(a)** Neurosphere-forming GICs display a low NFκB activity that is upregulated on induction of differentiation, which maintains proliferation and avoids further differentiation of intermediate precursors. **(b)** NFκB blockade at this stage forces differentiating GICs toward senescence. The NFκB target gene CND1 explains, at least in part, the observed phenotype.

within the first 2 weeks of culture and subsequently dissociated every 3–4 days to facilitate cell growth. To promote differentiation, neurospheres were cultured in the same medium but in the presence of 10% fetal calf serum for the indicated time intervals. The levels of IL-1 β protein in the cell culture medium were determined by using human IL-1 β Quantikine ELISA kits (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) according to the directions of the manufacturer.

Immunofluorescence and electron microscopy

Cells were assayed for the expression and/or subcellular localization of p65, Nestin, GFAP, Tuj1, pI κB , Ki-67 and β -catenin by fluorescence or confocal microscopy with a LSM 510 laser scanning microscope (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany), equipped with an argon (488 nm) and HeNe (543 nm) ion lasers and using 40 \times and 63 \times (1.4 NA) immersion oil objectives. Briefly, neurospheres were harvested on microscope slides by cytospin centrifugation (200 g, 5 min), and differentiated cells were grown on 10 \times 10 mm coverslips. Cells were then fixed in 3.7% formaldehyde and, in some cases, permeabilized with 0.5% Triton X-100. For immunostaining,

cells were incubated overnight with rabbit anti-GFAP (DAKO, Glostrup, Denmark), anti-β-catenin (ab6302, Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-Ki-67 (SP6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) anti-pIκB (14D4, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), and anti-p65 (sc-372, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) antibodies, or mouse anti-Nestin (MAB1259, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-Tuj1 (T-8660, Sigma), anti-phospho histone H2AX (05-636) and anti-O4 (MAB345), (both from Millipore, Billerica, MA, USA) monoclonal antibodies. Then, Texas red-conjugated or FITC-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, Cambridge-shire, UK) were used for fluorescence detection. Whenever indicated, nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole. To quantify immunofluorescence, each marker was evaluated by computer-assisted image analysis using the AxioVision software (Carl Zeiss Inc.). Immunofluorescence staining was scored by counting 200 cells, and evaluated by two experienced observers. The results of immunofluorescence assays for differentiation and senescence markers were expressed as the percentage of positive stained cells per total number of cells. Subcellular distribution of p65 and β-catenin was determined using immunofluorescence confocal microscopy by counting cells with nuclear and/or cytoplasmic staining and was expressed as a percentage of the total cell count. At least three different experiments were performed for each marker. Data are presented as the mean percentage ± s.d.

For immunofluorescence staining of tumor tissue, each tissue fragment was transferred to a drop of phosphate-buffered saline on a siliconized slide and squash preparations were performed as previously described (Pena *et al.*, 2001). For *in situ* hybridization of telomeric DNA, squash preparations were incubated with the Cy3-labeled telomere-specific peptide nucleic acid probe (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) as recommended by the manufacturer. In some experiments, fluorescence intensity was determined using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Mean fluorescence intensity was calculated as indicated elsewhere (Mancuso *et al.*, 2006). For conventional electron microscopy, vibratome sections (200 μm thick) containing tumor tissue were post-fixed first in 3% glutaraldehyde and then in 2% osmium tetroxide, dehydrated in acetone and embedded in Araldite (Durcupan, Fluka, Switzerland). Semithin sections (1 μm) were stained with toluidine blue for light microscopy examination. Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a Philips EM-208 electron microscope (Philips, Cleveland, OH, USA).

Cell proliferation and senescence

Cell proliferation was analyzed by using the WST-1 reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) that is cleaved to formazan dye by mitochondrial dehydrogenases, which directly correlates to the number of metabolically active cells in the culture. Staining for senescence-associated β-galactosidase activity was performed by using a Senescence Detection kit (BioVision, Mountain View, CA, USA) as recommended by the manufacturer. Stained cells were observed under a microscope for color development.

Analyses of mRNA expression

Total RNA from progenitor and differentiated glioblastoma cells was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hamburg, Germany) and microarray gene expression analysis was performed with the Human Genome U133 Plus 2.0 array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Both background correction and normalization were done using Robust Multichip Average algorithm.

The selection of those genes differentially expressed between differentiated and progenitor cells was performed using a criteria based on the fold-change value. Probe sets were selected as significant using a logFC cut-off of 1.5. The raw data have been deposited in a MIAME compliant database (GEO accession number GSE20736). To assess the expression of individual genes, a complementary DNA was generated and amplified by using primers for human CD133 (5'-TACCAAG GACAAGGCGTTCACAGA-3') and (5'-GTGCAAGCTCT TCAAGGTGCTG-3'), Nestin (5'-CGTTGGAACAGAGGT TGGAG-3') and (5'-TAAGAAAGGCTGGCACAGGT-3'), Sox2 (5'-ATGCACAACCTCGGAGATCAG-3') and (5'-TATA ATCCGGGTGCTCCTTC-3'), Nanog (5'-TGTGCACTCAA GGACAGGTTTC-3') and (5'-TCAGGTTTCAGAAATGGAG GAGAGTT-3'), Tuj1 (5'-GTACGAAGACGACGAGGA GG-3') and (5'-GCCTGGAGCTGCAATAAGAC-3'), GFAP (5'-GTCCATGTGGAGCTTGACG-3') and (5'-GCAGGTC AAGGACTGCAACT-3'), S100B (5'-ATTCTGGAAGGGA GGGAGAC-3') and (5'-CGTGGCAGGCTAGTAAC-3'), MAP2 (5'-AGGCTGAAGAGAGAAATGCCA-3'), and (5'-GC ACGTCAATCTTTGAAGGAA-3'), CND1 (5'-CTGGCCAT GAACTACCTGGA-3') and (5'-GGGTACAGTTGATCA CTCTGG-3'), and β-actin (5'-GCGGGAAATCGTGCCTGA CATT-3') and (5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'). Quantitative real-time PCR was performed in a 7000 Sequence Detection System (Applied-Biosystems, Foster City, CA, USA) as described (Gutierrez *et al.*, 2002). The ratio of the abundance of differentiation markers and CND1 mRNAs to that of β-actin mRNA was calculated as 2ⁿ, where n is the Ct value of β-actin minus the Ct value of the corresponding mRNA. For the differentiation markers, data were represented as fold change in relative expression levels as compared with undifferentiated (GIC) cells. For CND1 expression, data were normalized to the value from control cells. Specificity of the desired PCR products was determined by melting curve analysis. At least three independent experiments for each quantitative PCR were performed.

The mRNA levels of several NFκB target genes were quantified by a multiplex PCR-based method (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) that permits relative assessment of multiple genes by using a panel of specific probes.

Western blot analysis

Cell extracts (50 μg of protein) were separated on a 8% polyacrylamide gel, and transferred to nitrocellulose. Blots were blocked with 3% bovine serum albumin and incubated with rabbit antibodies against pIκB, pAkt, Akt, IKK2 (from Cell Signaling Technology), p65, ERK and Stat3 (from Santa Cruz Biotechnology) and mouse antibodies against α-tubulin, UBF (Santa Cruz Biotechnology), IκB, CND1 (both from BD Biosciences), pERK and pStat3 (both from Cell Signaling Technology), followed by incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to alkaline phosphatase (Sigma). Bound antibody was detected by a chemiluminescence system (Applied-Biosystems).

For protein extraction from cytoplasmic and nuclear fractions, cells were disrupted in a buffer containing 10 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1% NP40 and a cocktail of protease inhibitors (Roche). After low-speed centrifugation to separate the cytoplasmic fraction, nuclei were lysed in a buffer containing 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA and 0.4 mM NaCl.

Electrophoretic mobility shift assay

Cells were lysed and nuclear fractions were resuspended in 20 mM HEPES pH 7.9, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM

ethyleneglycol tetraacetic acid and 20% glycerol. Nuclear extracts (10 μg of total protein) were incubated with a ³²p-labeled double-stranded DNA probe corresponding to the consensus NFκB site (5'-GGGAATTTCC-3'). Samples were run on a 5% non-denaturing polyacrylamide gel in 200 mM Tris-borate, 2 mM EDTA. Gels were dried and visualized by autoradiography. Supershifts were performed using rabbit polyclonal antibodies specific for p50 and p65 or irrelevant anti-GATA1 antibodies (all from Santa Cruz Biotechnology).

Transfection experiments and gene reporter assays

To inhibit activation of NFκB, cells were transfected with 2 μg of a vector containing a mutated form of IκBα (mutIκB) (Clontech, Palo Alto, CA, USA) or a kinase inactive form of IKK2 (IKK2-K44M) (Addgene, Cambridge, MA, USA) by nucleofection (Mouse NSC Nucleofector Kit, Lonza, Cologne, Germany). Unless otherwise indicated, analyses were performed 2–3 days after transfection.

Genomic PCR fragments of 1967 bp from the promoter region of human GFAP, and 1499 bp from the human MAP2 promoter were cloned into *NheI* and *HindIII* sites of the pGL2-basic luciferase reporter vector (Promega Corp., Madison, WI, USA). The authenticity of the cloned inserts was confirmed by sequencing. GBM progenitors were co-transfected with 1 μg of pGL2-GFAP or pGL2-MAP2 promoter constructs and 50 ng of pRSV-β-gal by nucleofection (Amaxa, Cologne, Germany). When indicated, cells were transfected with 1 μg of the reporter plasmid pBVix-Luc, containing six tandem repeats of the NFκB recognition site within the promoter region linked to the luciferase gene. At the indicated times, cell extracts were prepared and analyzed for the relative luciferase activity by a dual-light reporter gene assay system (Applied Biosystems). Results were normalized for transfection efficiency with values obtained with pRSV-β-gal.

Cell cycle analyses

For DNA cell cycle analysis, differentiated cells were fixed in 70% ethanol, washed in phosphate-buffered saline and treated with 100 μg/ml ribonuclease. Then, cells were labeled with 100 μg/ml propidium iodide for 15 min and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences) using the ModFit software (Verity, Topsham, ME, USA).

Gene silencing

GICs were dissociated from neurospheres and cultured at a density of 2 × 10⁴ cells per well in a 96-well plate in the presence of CND1-specific or control scrambled short hairpin RNA-containing lentiviral particles (MISSION short hairpin RNA library, Sigma) for 18 h. As a control of transduction efficiency, GICs were infected with lentivirus-containing short hairpin RNA to EGFP.

In vivo experiments

The mouse model of human glioblastoma was established in the Animal Core Facilities of the Center for Applied Medical Research (University of Navarra) after approval by the

Institutional Animal Ethics Committee. Briefly, 3 × 10⁵ GICs stably transfected with a luciferase-containing plasmid (Ponomarev *et al.*, 2004) were injected into the brain (caudate-putamen region) of anesthetized 6–8-week-old female BALB/cA-RAG2(–/–)-IL2γc(–/–) mice (Traggiai *et al.*, 2004) using a microsyringe held in a stereotactic device (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). To monitor intracranial tumor growth, noninvasive bioluminescence imaging was initiated 10 days after tumor cell implantation and repeated once a week using the IVIS Spectrum system (Xenogen, Alameda, CA, USA). About 8 weeks after injection of GICs, xenografted mice were treated with 70124 (10 mg/kg twice weekly for 25 days) and monitored for tumor metabolic activity by microPET imaging in a small animal tomograph (Philips). Mice were injected with ¹⁴C-methionine (20 Mbq) and then placed prone on the PET scanner bed to perform a static acquisition. Maximum standardized uptake value (SUVmax) was calculated for each tumor. For histologic studies, anesthetized animals were perfused with 3.7% formaldehyde and their brains were removed. Coronal sections (200 μm thick) of the brain at the level of striatum were examined with a stereoscopic microscope for tumor localization. For immunofluorescence, tumor tissue was dissected out from the sections and squash preparations of dissociated cells were performed as previously reported (Berciano *et al.*, 2004).

Statistical analysis

All statistics were calculated with the SPSS statistical package (version 13.0) (IBM, Chicago, IL, USA). Categorical variables were compared using the χ^2 test. The Student's *t*-test was used to compare continuous variables, summarized as means ± s.d., between two groups. The significance level was set at *P* < 0.05. Percentages of cells with defined features following differentiation or blockade of the NFκB pathway were given when differences with respect to the control cell population were statistically significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Science and Innovation) grants RD06/0020/0074 (JLF-L) and RD06/0020/0088 (JAM-C) (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer), PI070196, PI081878, and Accion Transversal del Cancer 2008, and grant API08/01 from Fundacion Marques de Valdecilla (JLF-L). We thank Francisco Moris (EntreChem, Spain) for providing the NFκB inhibitor 70124, and Ainara Sagardoy, Silvia Mora, Maria Collantes and Ivan Peñuelas (University of Navarra, Spain) for support with intracranial injections and microPET studies.

References

Acosta JC, O'Loughlin A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S *et al.* (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**: 1006–1018.
Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. (2003). Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* **33**: 203–207.

Beier D, Hau P, Proescholdt M, Lohmeier A, Wischhusen J, Oefner PJ *et al.* (2007). CD133(+) and CD133(–) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* **67**: 4010–4015.
Berciano MT, Villagra NT, Ojeda JL, Navascues J, Gomes A, Lafarga M *et al.* (2004). Oculopharyngeal muscular dystrophy-like

- nuclear inclusions are present in normal magnocellular neurosecretory neurons of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* **13**: 829–838.
- Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. (1995). Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**: 1485–1488.
- Campos B, Wan F, Farhadi M, Ernst A, Zeppernick F, Tagscherer KE *et al.* (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin Cancer Res* **16**: 2715–2728.
- Cao Y, Luo JL, Karin M. (2007). I kappa B kinase alpha kinase activity is required for self-renewal of ErbB2/Her2-transformed mammary tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 15852–15857.
- Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, Zhu H, Ruth A, Xuan Y *et al.* (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* **59**: 3761–3767.
- Cheng L, Bao S, Rich JN. (2010). Potential therapeutic implications of cancer stem cells in glioblastoma. *Biochem Pharmacol* **80**: 654–665.
- Eyler CE, Rich JN. (2008). Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* **26**: 2839–2845.
- Gandarillas A, Davies D, Blanchard JM. (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* **19**: 3278–3289.
- Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D, Brondello JM, Dulic V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* **23**: 2554–2563.
- Gonzalez-Suarez E, Branstetter D, Armstrong A, Dinh H, Blumberg H, Dougall WC. (2007). RANK overexpression in transgenic mice with mouse mammary tumor virus promoter-controlled RANK increases proliferation and impairs alveolar differentiation in the mammary epithelia and disrupts lumen formation in cultured epithelial acini. *Mol Cell Biol* **27**: 1442–1454.
- Gupta S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* **10**: 161–171.
- Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F *et al.* (2002). Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* **277**: 41701–41705.
- Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M *et al.* (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 15178–15183.
- Kang HB, Kim YE, Kwon HJ, Sok DE, Lee Y. (2007). Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev* **16**: 615–623.
- Kawamata H, Tachibana M, Fujimori T, Imai Y. (2006). Differentiation-inducing therapy for solid tumors. *Curr Pharm Des* **12**: 379–385.
- Lam WA, Cao L, Umesh V, Keung AJ, Sen S, Kumar S. (2010). Extracellular matrix rigidity modulates neuroblastoma cell differentiation and N-myc expression. *Mol Cancer* **9**: 35.
- Lee J, Kannagi M, Ferrante RJ, Kowall NW, Ryu H. (2009). Activation of Ets-2 by oxidative stress induces Bcl-xL expression and accounts for glial survival in amyotrophic lateral sclerosis. *FASEB J* **23**: 1739–1749.
- Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM *et al.* (2006). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* **9**: 391–403.
- Li X, Makarov SS. (2006). An essential role of NF-kappaB in the ‘tumor-like’ phenotype of arthritic synoviocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 17432–17437.
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O’Brien S, Sennino B, Nakahara T *et al.* (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* **116**: 2610–2621.
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J *et al.* (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I kappa B kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**: 860–866.
- Miura T, Mattson MP, Rao MS. (2004). Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell* **3**: 333–343.
- Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R *et al.* (2008). Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* **68**: 2599–2609.
- Naugler WE, Karin M. (2008). NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 19–26.
- Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, Donner DB. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**: 82–85.
- Pena E, Berciano MT, Fernandez R, Ojeda JL, Lafarga M. (2001). Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. *J Comp Neurol* **430**: 250–263.
- Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rousoo-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S *et al.* (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood* **109**: 1422–1432.
- Ponomarev V, Doubrovin M, Serganova I, Vider J, Shavrin A, Beresten T *et al.* (2004). A novel triple-modality reporter gene for whole-body fluorescent, bioluminescent, and nuclear noninvasive imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imag* **31**: 740–751.
- Sabolek M, Herborg A, Schwarz J, Storch A. (2006). Dexamethasone blocks astroglial differentiation from neural precursor cells. *Neuroreport* **17**: 1719–1723.
- Sanchez C, Salas AP, Brana AF, Palomino M, Pineda-Lucena A, Carbajo RJ *et al.* (2009). Generation of potent and selective kinase inhibitors by combinatorial biosynthesis of glycosylated indolocarbazoles. *Chem Commun (Camb)* **21**: 4118–4120.
- Shay JW, Roninson IB. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23**: 2919–2933.
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J *et al.* (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**: 5821–5828.
- Torres J, Watt FM. (2008). Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* **10**: 194–201.
- Traggiai E, Chicha L, Mazzucchelli L, Bronz L, Piffaretti JC, Lanzavecchia A *et al.* (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**: 104–107.
- Vaira S, Alhawagri M, Anwisyte I, Kitaura H, Faccio R, Novack DV. (2008). RelA/p65 promotes osteoclast differentiation by blocking a RANKL-induced apoptotic JNK pathway in mice. *J Clin Invest* **118**: 2088–2097.
- Wehling N, Palmer GD, Pilapil C, Liu F, Wells JW, Muller PE *et al.* (2009). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha inhibit chondrogenesis by human mesenchymal stem cells through NF-kappaB-dependent pathways. *Arthritis Rheum* **60**: 801–812.
- Widera D, Mikenberg I, Elvers M, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B. (2006). Tumor necrosis factor alpha triggers proliferation of adult neural stem cells via IKK/NF-kappaB signaling. *BMC Neurosci* **7**: 1–18.
- Young KM, Bartlett PF, Coulson EJ. (2006). Neural progenitor number is regulated by nuclear factor-kappaB p65 and p50 subunit-dependent proliferation rather than cell survival. *J Neurosci Res* **83**: 39–49.
- Zhang MY, Sun SC, Bell L, Miller BA. (1998). NF-kappaB transcription factors are involved in normal erythropoiesis. *Blood* **91**: 4136–4144.