

# Gliometako zelula nestina-positiboen banaketa

Ane Iriondo\*<sup>1</sup>, Susana Bulnes<sup>2</sup>, Alvaro García-Blanco<sup>1</sup>,  
Harkaitz Bengoetxea<sup>1</sup>, Jose Vicente Lafuente<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea  
(UPV/EHU)

<sup>2</sup> Leioako Erizaintzako Unibertsitate Eskola  
(UPV/EHU)

\* ane\_iriondo\_juaristi@hotmail.com

Jasoa: 2014-06-18

Onartua: 2014-10-15

**Laburpena:** Zelula ama tumoralak (ZAT), zelula amen ezaugarriak dituzten eta tumore bat birsortzeko gaitasuna duten tumore-zelulak dira. Bai animalietan eta bai gizakietan ere, multzoka agertzen dira eremu peribaskularrean, askotan egitura berezietan multzokatuta. Azken urteotan, ZATak kimio-erradio terapiekiko erresistenteak direla ikusi da, baita berreritzearen eragileak direla ere.

Nerbio Sistema Zentraleko glioma tumoreetan, ehuna infiltratzeko eta angiogenesisia pizteko gai dira zelula hauek. Lan honen helburua, gliomaren garapenaren zeharrekko tumore-ama zelulen agerpena eta banaketa aztertzea da, batez ere multzoka agertzen diren kasuan.

Horretarako, etilnitrosourearen (ENU) bitartez arratoiei glioma tumoreak induitzen zaizkie eta nestinaren markaketaren bidez bertako zelula amak izan daitezkeen zelulak identifikatzen ditugu.

Datuen arabera, nestina-positibo diren zelula multzoen tamaina eta kantitatea gliomaren garapenarekin batera handitzen doa. Taldekatze hauek, eremu peribaskularrean eta baita tumore barruan ere agertzen dira eta *in vitro* agertzen diren neurosferen antzeko morfologia erakutsi dute. Multzoek eta neurosferek *in vitro* azaltzen dituzten parekotasun hauek, *in vivo* agertzen dituztenen seinale izan daitezke. Egitura berezi hauek, kontra duten mikroingurune batetik ihes egiteko ZATek sortzen duten gordailua izatea proposatu da.

**Hitz-gakoak:** Zelula ama tumoralak (ZAT), glioma, etilnitrosourea (ENU), nestina.

**Abstract:** Cancer stem cells have been described as tumoral cells with characteristics of the stem cells and the capacity of recreating a tumor. They have been described *in vivo* to appear in perivascular clusters both in human and animal models. These stem cells are resistant to the quimio-radiotherapy and are the reason of the recurrences.

In the gliomas of the nervous central system, they are capable of infiltrating tissues and creating the angiogenesis. The aim of this work is to identify the distribution of tumor stem cells in various degrees of malignancy in experimental gliomas. For it, we induce gliomas by ethylnitrosourea (ENU) to the rat and with nestin we identify the possible stem cells of the tumors.

The quantity and size of the groups of nestin positive cells increase as the gliomas develop. The cells inside these arrangements have morphological and phenotypical similarities to *in vitro* neurospheres and could be an *in vivo* analogy of them. These arrangements could be a reservoir of tumor stem cells in order to escape an adverse microenvironment.

**Keywords:** cancer stem cells, glioma, ethylnitrosourea (ENU), nestin.

## 1. SARRERA

Glioblastoma multiforme (GBM) da helduetan agertzen den tumore guzto primario ohikoena eta arriskutsuena. Garuneko neoplasia guztien %12-15a eta tumore astrozitario guztien %50-60a da hau. Azken urteotan, hainbat ikerketari esker, ikusi da tumoreak heterogeneoa den zelula populazio hierarkizatu batean antolatutako daudela eta hazkuntzaren hasiera eta mantenua zelula populazio txiki baten esku dagoela. Zelula hauek, zelula ama tumoralak (ZAT) bezala izendatu dira, ehunen homeostasia sortu eta mantentzen duten zelula amekin duten parekotasuna dela eta. Ikerlariek uste dute parekotasun hauek tumorearen mikroingurunarekin hobeto egokitzeko lortu dituztela [1].

Ikerketa askoren arabera, ZAT hauek tumore-eragileak dira: tumorearen gaiztotze prozesuan hartzen dute parte, eta besteak beste ehun periferikoan infiltrazioa egiten dute, angiogenesisia eragiten dute eta kimio-erradio terapiekiko jasankorrak dira [2, 3]. Fan eta laguntzaileek (2007) argitaratu zutenaren arabera, ZAT hauek tumorea berpizteko gaitasuna ere izango lukete [4] eta tumore honen aurka tratamendu berriak sortzeko, beharrezkoa da ZAT hauen ezaugarriak ezagutzea [5].

Bestalde, glioma barruan kokatuta dauden zelula populazioak heterogeneoak direnez, ZAT hauen identifikazioa oso zaila da. Hala eta guztiz ere, nestina eta CD133 bezalako markatzaileak erabiltzen dira identifikaziorako [6]. Nestina, filamentu proteina bat da eta bereziki garunaren garapenean adierazten da, jaiotza gertatu ondoren soilik garuneko bentrikuluen azpiko eremuetan eta zelula endotelialean egonik. Baina neoplasia bezalako baldintza patologikoetan berradierazi egiten da.

*In vitro* ikerketen bidez, ZATek neurosferak eratzen dituztela ikusi da. Esfera egitura hauen bitartez hobeto egokitzen dira zelulak tumorearen mikroingurunearekin. Hala ere, ez dago datu zehatzik zelula hauek *in vivo* hartzen duten kokapenaren inguruan. Hipotesi batzuen arabera, zelula ama

tumoralen egoera desdiferentziatua mantentzeko eta bizirauteko taldekatzen dira [7]. ZAT hauen markatzaileetako bat den nestinaren eta zelula endotelialen markatzaileetako bat den CD34aren kolokalizazioaren bitartez, ikusi da talde hauek eremu peribaskularrean kokatzen direla [8], baina bertako faktore endotelialen bitartez, VEGF adibidez, hedapen eta hazkuntza gaitasun handiagoa lortzen dute.

Gliomei dagokienez, gaur egun ez dago aukerarik tumorearen garapenaren hasieratik ZATak aztertzeko. Orokorrean gaixoak gliomarekin hurremana duten zeinu klinikoak agertu ondoren hurbiltzen dira ospitalera, hau da gliomako azken garapen fasean, jada ZATak hedatuta eta garatuta daudenean eta une horretan ezin da ezer egin gliomari aurre egiteko. Hori dela eta, ezinbestekoa da animalia eredu erabiltzea. Lehenik eta behin, ZAT hauen ikerketarako, animaliei tumorea induzitu behar izaten zaie eta besteak beste etilnitrosoare (ENU) agente mutagenikoa erabiltzen da horretarako. Honek DNA alkilatzen du eta ondorioz Nerbio Sistema Zentraleko tumoreak garatzen dira [9]. Tumorea jada garaturik, ZATen identifikaziorako, besteak beste zelula amek *in vitro* egoeran kondizio jakin batzuetan neurosferak garatzeko duten gaitasunean oinarritzen dira.

Lan honetan nestina markatzailearen bitartez identifikatu nahi ditugu zelula ama tumoralak izan daitezkeen zelulak.

## 2. MATERIAL ETA METODOAK

*Tumorea induzitzea:* etilnitrosoarearen plazentan zeharreko administrazioaren bitartez induzitu zitzaizen tumorea Sprague Dawley arratoiei. 8 arratoi eme helduri, 80 mg/kg gorputz pisuan eta haurdunaldiko 15. egunean N-nitroso-N-ethylurea (10 mg/ml; Erref.: E2129, Sigma-Aldrich), intraperitonealki sartu zitzaizen. ENUaren arriskua jasan zuten kumeak laborategiko ohiko baldintzetan hazi ziren. Ikerketa 6 hilabetetik urtebeterainoko 55 arratoiekin egin zen. Animaliekin egindako esperimendu guztiak Europar Komunitateko Zuzendaritza Kontseiluaren arauen arabera egin ziren (2010/63/EU).

*Ehunaren prestaketa:* lan honetan 55 arratoitan sortutako 86 tumore glial erabili ziren. 55 arratoiak perfunditu egin ziren, lehenbizi %0,9ko gatz-serumarekin eta ondoren %4ko paraformaldehido-PBS-arekin (PBS 0,1 M, pH 7.4). Garunak atera eta gau osoa soluzio berean utzi ziren 4°C-tan. Hurrengo egunean, parafinan fixatzeko, prozesatu egin behar ziren tumoreen ebaketa koronalak egin ziren. Parafina-blokeak mikrotomoan moztu ziren 4µm-ko sekzioetan eta APES-arekin (3-aminopropyltriethoxylane) tratatutako portetan jarri ziren.

## Histologia

Tumorea gaiztotze mailetan sailkatzeko, ENUren bidez induzitutako gliomek azaltzen dituzten ezaugarri histopatologikoetan oinarritzen gara: besteak beste anaplasia, mitosi atipikoa, odol-hodien hazkuntza, hemorragia, nekrosia edota kisteak; endotelioaren ugaltzea eta tumore tamaina ere kontuan hartzen ditugu. Zook eta laguntzaileen [10] lanaren arabera, Otik 3ra sailkatzen dira tumoreak: 0, zelula-dentsitatearen areagotzea; 1, endotelioaren ugaltzea; 2, hemorragia; 3, nekrosia edo kisteak.

Hematoxilina-eosina (HE) tindaketa, mikrotomoan moztutako 4 $\mu$ m-ko parafinazko zatiei egin zitzaion. Mikroskopia optikoen bidez, tumore tamaina 62.500  $\mu$ m<sup>2</sup>-ko erretikularekin (40ko handipenarekin) neurtu zen.

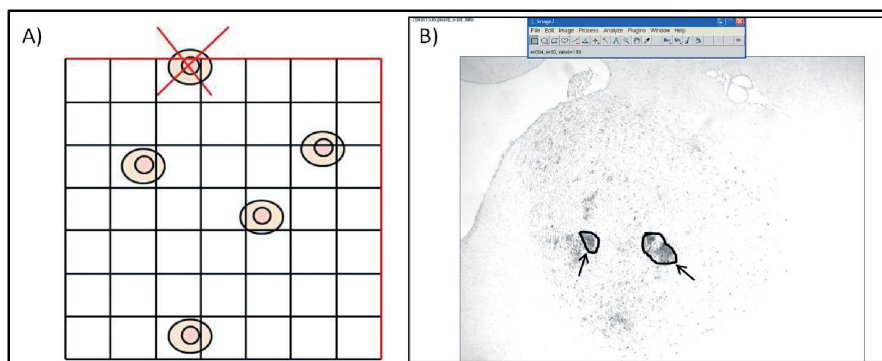
## Inmunohistokimika

Gliometako zelula amak izan daitezkeen zelulak aztertzeko nestinaren aurkako immunohistokimika egin genuen. Prozesua hasi baino lehen, parafina ehunetik ezabatzeko, porta xiloletan sartu zen eta ondoren ehuna berri-draturatu egin zen alkoholetan. Peroxidasa endogenoaren aktibitatea blokeatu egin zen, portak %4 H<sub>2</sub>O/metanoletan 20 minutuz sartuz. Antigenoa desestaltzeko, laginak 0,1 M zitrato bufferra (pH 6) duen lapikora sartu ziren 5 minutuz. Ehunak %0,5 BSA-Tris bufferrean (pH 7,4) garbitu ziren. Nestinaren aurkako antigorputz primarioa (Erref.: sc-33677; Santa Cruz Biotechnology) gehitu eta laginak gau osoan 4°C-tan gorde ziren. Hurrengo egunean, 30 minutuz, lehenik biotinilatutako antigorputz sekundarioekin (Vector Laboratories) inkubatu ziren eta ondoren abidina-biotina konplexuarekin (ABC Kit Elite, Vector Laboratories). Azkeneko erreakzioa portak diamenobenzidina (0,25 mg/ml) eta H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%0,01) soluzioan sartuz egin zen. Azkenik, portak hematoxilinan sartu ziren kontrastea lortzeko. Deshidratatu eta estaldu egin ziren. Kontrol negatiboek, antigorputz primarioaren atala izan ezik, prozesu guztia jasan zuten.

## Nestina-positibo diren zelula multzoen kuantifikazioa

86 tumore glialetan, nestina-positibo diren esfera itxurako multzoen kopurua, gainazala eta dentsitatea neurtu ziren. Kuantifikazioa egiteko 62.500  $\mu$ m<sup>2</sup>-ko erretikulua erabili zen (40ko handipenarekin). Multzoak gutxienez nestina-positibo diren 6 zelulaz osatuak egon behar ziren multzo bezala definitzeko. Taldekatze horien eremua *Image J* softwarea erabiliz (irudia 1) neurtu zen.

*Analisi estatistikoa:* Datu denak SPSS estatistika-programarekin (19,0 SPSS, IBM) aztertu ziren. Parametro morfometrikoen arteko ezberdintasunak aztertzeko ANOVA analisisia egin zen. Post hoc testean DMS eta Bonferroni zuzenketak erabili ziren datu berdinetarako eta Tamhane



**Irudia 1.** A) Nestina+ taldekatzeak neurtzeko era erakusten duen eskema.  $62.500 \mu\text{m}^2$ -ko erretikulua erabiliz. Lerro gorrietan kokatzen diren taldekatzeak ez dira kontatzen. B) Taldekatzeen eremua neurtzeko *Imaje J* software adibidea. Boro-bilen barruan daude neurtzen diren taldekatzeak.

T2 desberdinetarako. T testa erabili zen tumore-bolumenen, basoen dentsitatearen, sare baskularren arearen eta basoen areen arteko desberdintasunak aztertzeko. Datuak batez besteko  $\pm$  DE bezala azaltzen dira. P balorea 0,05 baino txikiagoa denean, estatistikoki esangarriztat hartzen da.

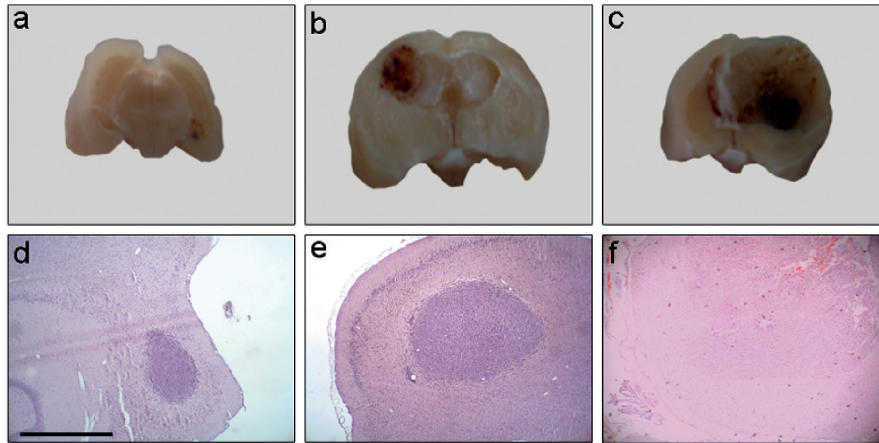
### 3. EMAITZAK

#### 3.1. Gliomen sailkapena

ENU injekzioa jasandako arratoien %95,65ak garatzen du neoplasia. Neoplasia guztietatik %65,96ren gliomak hautatu, hematoxilina-eosina tindaketa egin eta gaiztotze maila desberdinetan sailkatu genituen. Hauek giza gliomen ezaugarri gaizto denak azaltzen zituzten: eremu periferiko lausoa, gainazal nekrotikoak, hemorragiak, kisteak, anaplasia zelularra, nukleo atipikoak, mitosi altua eta ugaltze baskularra besteak beste.

Ezaugarri hauen eta gure laborategiko beste lan batzuen arabera [11] ENUren bidez induzitutako gliomak hiru egoera desberdinetan sailkatu genituen, beraien ezaugarri kaltegarrien arabera:

- *I Graduko gliomak* ( $n = 30$ ): Makroskopikoki, gai zurian zelula txikien ugaritzea ikusten da (2a irudia). Talde honetan ugaritze zelular txiki-ertaina duten eta ongi definiturik agertzen diren tumoreak sailkatzen dira. (2d irudia).
- *II Graduko gliomak* ( $n = 25$ ): Makroskopikoki, tumore hauek ehun masa bigunak dirudite eta odoljario-gune txikiak dituzte (2b irudia).



**2. irudia.** Gliomaren ikuspegi makroskopiko (a-c) eta mikroskopikoa hematoxilina-eosinaren tindaketaren bidez (d-f). Arratoi-garunen ebaketa koronalek, erakusten dute tumoreen garapen subkortikala substantzia zuriarekin lotuta dagoela. a) I graduko ENU-gliomaren argazkiak, tumore txiki bat agertzen du, eremu subkortikalean substantzia zuriarekin elkartuta eta hemorragiarik gabe. b) II graduko ENU-glioma, tamaina handiagoa duenez, ehun kortikalera mugitzen hasten da. Hemorragia-eremua ikusten da. c) III graduko ENU-gliomaren argazki makroskopikoak, erakusten du tumore-masak garun hemisferio bat estaltzen duela. (d-f) Histologia-azterketen analisisen arabera tumore glial goiztiarrak oligodendroglioma klasikoaren antza duten zelulen agregazio txikiak dira d) I graduko gliomak borobil itxura eta zelulen banaketa homogenea erakusten du; e) II graduko gliomak, I baino handiago da baina borobiltasunari eusten dio. f) III graduko gliomak berriz, desoreka erakusten du eredurik ez duelako eta zelulen anaplasia eta ehunen infiltrazioa ere erakusten ditu. (Eskala 2,5 mm).

Maila honetako gliomak, aberrazio zelular esporadikoa duten zelula txiki borobilez osatutako tumoreak dira (2e irudia).

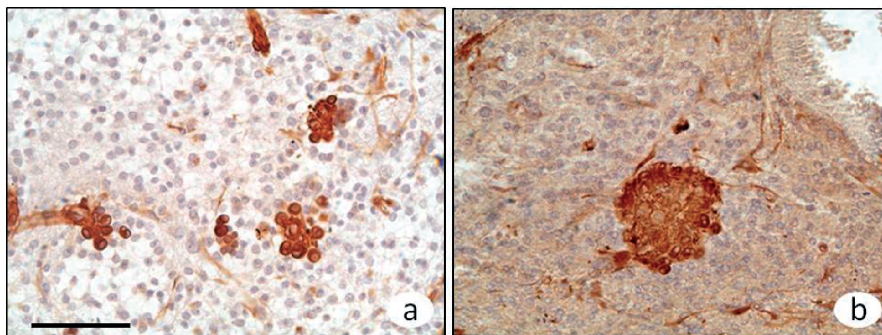
— *III Graduko gliomak (n = 31):* Makroskopikoki hemorragiako eremu gorri asko ikus daitezke eta normalean marroi-hori koloreko zati nekrotikoak bereiz daitezke (2c irudia). Aberrazio zelular, hemorragia eta nekrosi ugari izateagatik bereizten dira glioma hauek eta ezohiko odol-hodi eraketak ere aurki daitezke (2f irudia).

### 3.2. Gliometako Nestina<sup>+</sup> zelulen banaketa

Azterketa mikroskopikoa egin ondoren, esfera itxurako taldekatzeak gutxienez sei zelula nestina-positiboek osatuta egotearen bereizten dira. Taldekatze hauetako zelulek, zitoplasma borobil eta txikia dute, eta bestetik luzapen zitoplasmatico gutxikoak dira, edo luzapen zitoplasmaticorik gabeak.



Taldekatzeak gliomaren garapeneko estadio guztietan agertzen dira. Emaitzen arabera, glioma gaiztotu ahala, taldekatzeen tamaina eta kopurua ere areagotzen doaz (3 irudia).



**3. irudia.** Nestina<sup>+</sup> positibo diren taldekatzeen immunohistokimika. Bertan, zelula gutxi batzuez edota handi batzuez osatutako nestina-agregazioak ikus daitezke. a) I graduko glioma hiru taldekatze txikiek. 6 edo 7 zelulez osatutako hiru taldekatze txikiez osatuta ageri da; b) III graduko glioman hamaika zelulaz osatutako taldekatze handi bat azaltzen da. (Eskala 75  $\mu$ m).

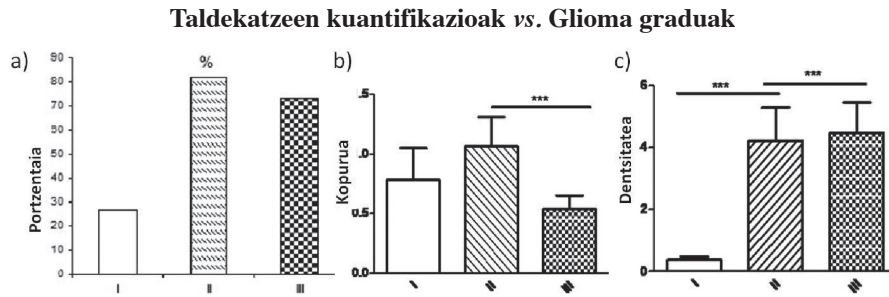
### 3.3. Taldekatzeen kuantifikazioa

Nestina-positibo taldekatzeak jadanik lehenengo etapan agertzen dira (I motako tumoreen %27an,  $n = 28$ ). Hala ere bigarren etapan azaltzen dira taldekatze gehienak (%81,  $n = 22$ ). Hirugarren etapan, %78an azaltzen dira taldekatzeak ( $n = 28$ ) (4a irudia)

Graduen arteko konparaketa egin ondoren, ikusten da glioma mailaren gaiztotasunarekin batera nestina<sup>+</sup> diren multzoen kopurua ere gehitzen dela. Batez besteko gliomako taldekatze kopurua (BK) ikusita, desberdintasun esanguratsuak daude gradu guztien artean, hau da, lehenengo (BK =  $0,55 \pm 0,14$ ) bigarren (BK =  $4,46 \pm 0,85$ ) eta hirugarren (BK =  $4,75 \pm 1,02$ ) ( $p < 0,0001$ ) graduen artean (3b irudia).

Gliomen barruko taldekatzeen batez besteko dentsitatea (BD) ere neurtu genuen eta dentsitate balio handiena II mailakoetan aurkitu genuen (BD =  $1,102 \pm 0,224$ ). I graduan gutxi gorabehera dentsitate maila bera ikusi genuen (BD =  $0,999 \pm 0,335$ ), baina III graduan dentsitateak nabarmen egin zuen behera (BD =  $0,541 \pm 0,120$ ). Desberdintasun esanguratsua soilik II eta III mailakoen artean gertatu zen ( $p = 0,0222$ ) (4d irudia).

Azkenik, tumorearen garapenarekin batera, estatistikoki esanguratsua ez zen taldekatzeen batez besteko eremuaren handitzea atzeman zen. I maila-



**4. irudia.** a) Nestina-agregazioak agertzen diren kasuen ehunekoak. b) Glioma-ren hazkuntzako gradu desberdinetako esfera-nitxozen zenbatekoa; c) Nitxozen dentsitatea tumoreko  $\text{mm}^2$ -ko. Batez besteko balioak irudikatzen dituzte grafikoek. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

koen 8 taldekatzeen batez besteko area  $17,39 \pm 4,73 \mu\text{m}^2$ -koa zen, II mailakoetan 67 taldekatzeen artean  $29,08 \pm 6,99 \mu\text{m}^2$ -koa da eta III mailakoetan 134 taldekatzeen batez besteko eremua  $29,94 \pm 7,59 \mu\text{m}^2$ -koa .

#### 4. ONDORIOAK

Lan honen bidez, gliometako nestina+ zelulen banaketa aztertu dugu. Ikusten da zelula hauek multzokatzeko joera daukatela bai glioma goiztiarretan bai gaiztoenetan ere. Tumorea gaiztotu ahala, nestina+ zelulek osatzen dituzten taldekatzeak, tamaina eta dentsitatea handitzen doaz. Aurkikuntza hauen arabera, harreman estua nabaritzen da zelula ama tumoralak izan daitezkeen nestina+ zelulez osatutako taldekatzeen banaketaren eta gliomaren hazkuntza prozeduraren artean.

Orain arte, ezinezkoa izan da gradu baxuko tumoreetako zelula amei buruzko ikerketak egitea, ezin izan baita gizakien ehunik lortu. Duela gutxi, ikerketa hauetarako animalia ereduak erabiltzen hasi dira, hauek aukera eman baitute garapenean zeharreko ikerketa egiteko. Modu berean, markatzaileak erabiltzen hasi dira, nestina desdiferentziazio-markatzailea, CD133 eta SOX2 besteak beste.

Arratoinen haurdunaldian ENUren plazentan zeharreko administrazioaren bidezko glioma endogenoen sorkuntza teknika ezaguna eta oso baliagarria da gliomen aldi desberdinak aztertzeko [12]. Aurreko lan batzuetan, ama zelulen markatzaileak [13] eta angiogenesisia aztertzeko erabili izan da [14, 15, 16], baina ez da inoiz erabili ama zelulen morfologia, kokapena eta immunoadierazpena aztertzeko. Lan hau tumore barneko nestina-positibo diren agregazioen banaketan oinarritu da.



Taldekatzeak, nestina+ zelulak hazten diren eremuaren limite bezala definitzen dira. Taldekatze hauek ama zelulen propietateak erregulatzen dituzte mikroingurune konplexu eta dinamikoen bitartez [17]. Gure lanean, egiaztatu dugu egitura hauek neuroesferekin parekotasun handiak dituztela, zelulen morfologian eta nestinaren espresioan besteak beste [18]. Ama zelulen identifikaziorako erabiltzen den teknika ohikoena *in vitro* esferen hazkuntza da [19]. Hazkuntza faktore eza da ama zeluletatik neurosferak lortzeko faktore gakoa. ZATek, aurkako baldintzetatik babesteko sortu ditzakete esferak *in vitro* egoeran, elikagai falta dutenean adibidez. Era berean, *in vivo* egoeran, nestina+ zelulek hipoxia, elikagai eza edota kimioterapiatik babesteko sor ditzakete nonbait taldekatze hauek [20].

Nolanahi ere, ENU bidezko gliomen garapenaren lehenengo fasean nestina+ zelulak multzoka agertzen dira. Hala ere, taldekatzeen gehikuntza bigarren fasean ikusten da. Izan ere, aurretik argitaratutako lanaren arabera, gliometako bigarren fasea angiogenesiaren piztearekin lotuta dagoenez, pentsa dezakegu taldekatze horiek parte har lezaketela angiogenesisian [21]. Oraindik argitaratu gabeko lanetan, odol-hodien endotelioaren hazkuntza faktorerako (VEGF) positiboak diren zelulak topatu ditugu taldekatzeak inguratuz.

Agian ZATek zelula hauek kitzikatzen dituzte faktore angiogenikoak ekoizteko eta horrela hazkuntzarako egokia ez den ingurune batetik ihes egiteko. VEGF+ zelula hauek taldekatzeak inguratzen egonda, barneko zelulak isolaturik mantentzen dira eta ingurune lagungarri bat eratzten dute. Aurretiko lan batzuek jada taldekatze hauek ZATen gordailu izan litezkeela proposatu dute [22] eta berrerritze tasa altuen eragileak izan litezkeela uste dute.

Ikerketa hauek guztiek gliometako ZATen ingurukoak dira baina oraindik ere eztabaida handia dago ZAT markatzaileen potentzialaren inguruan. Ikerketa gehiago egin behar dira esfera eta taldekatze hauen funtzioa zehazki aztertzeko eta neurosferekin duten parekotasuna ulertzeko. Hala ere, taldekatze hauen identifikazio ezinbasiboa izan daiteke gakoa geroko minbizi-tratamenduetan.

## 5. ESKERRONAK

Lan honen egileek Eusko Jaurlaritzaren IT/794/13 eta SAIOTEK dirulaguntzak eta Euskal Herriko Unibertsitatearen UFI 11/32 dirulaguntzak jaso dituzte.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] IGNATOVA, T.N.; KUKKEKOV, V.G.; LAYWELL, E.D.; SUSLOV, O.N.; VRIONIS, F.D.; STEINDLER, D.A.. «Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial» *Glia*, **39**, 193-206.
- [2] HADJIPANAYIS, C.G. eta VAN, MEIR E.G. 2009. «Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy». *Journal of Molecular Medicine* (Berl), **87**, 363-374.
- [3] RICH, J.N. 2007. «Cancer stem cells in radiation resistance». *Cancer Research*, **67**, 8980-8984.
- [4] FAN, X.; SALFORD, L.G. eta WIDEGREN, B. 2007. «Glioma stem cells: Evidence and limitation». *Seminars in Cancer Biology*, **17**, 214-218.
- [5] HADJIPANAYIS, C.G. eta VAN MEIR, E.G. 2009. «Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies». *Trends in Molecular Medicine*, **15**, 519-530.
- [6] SINGH, S.K.; CLARKE, I.D.; TERASAKI, M.; BONN, V.E.; HAWKINS, C.; SQUIRE, J. eta DIRKS, P.B. 2003. «Identification of a cancer stem cell in human brain tumors». *Cancer Research*, **63**, 5821-5828.
- [7] DENYSENKO, T.; GENNERO, L.; ROOS, MA.; MELCARNE, A.; JUENEMANN, C.; FACCANI, G.; MORRA, I.; CAVALLO, G.; REGUZZI, S.; PESCARMONA, G. eta PONZETTO, A. 2010. «Glioblastoma cancer stem cells: heterogeneity, microenvironment and related therapeutic strategies». *Cell Biochemical Function*, **28**, 343-351.
- [8] JOHN, M.; HEDDLESTON, MASAHIRO HITOMI, MONICA VENERE, WILLIAM A. FLAVAHAN, KENNETH YAN, YOUNGMI KIM, SANA MINHAS, JEREMY N. RICH, eta ANITA B. HJELMELAND. 2011. «Glioma stem cell maintenance: the role of the microenvironment». *Current Pharmaceutical Design*, **17**, 2386-2401.
- [9] ZOOK, B.C. eta SIMMENS, S.J. 2005. «Neurogenic tumors in rats induced by ethylnitrosourea». *Experimental and Toxicologic Pathology*, **57**, 7-14.
- [10] ZOOK, B.C.; SIMMENS, S.J. eta JONES, R.V. 2000. «Evaluation of ENU-induced gliomas in rats: nomenclature, immunochemistry, and malignancy». *Toxicologic Pathology*, **28**, 193-201.
- [11] BULNES, S.; LAFUENTE, J.V. 2007. «VEGF immunopositivity related to malignancy degree, proliferative activity and angiogenesis in ENU-induced gliomas». *Journal of Molecular Neuroscience*, **33**, 163-172.
- [12] BULNES-SESMA, S., ULLIBARRI-ORTIZ DE ZARATE, N. eta LAFUENTE-SANCHEZ, J.V. 2006. «Tumour induction by ethylnitrosourea in the central nervous system». *Revista de Neurologia*, **43**, 733-738.
- [13] RECHT, L.; JANG, T.; SAVARESE, T. eta LITOFISKY, N.S. 2003 «Neural stem cells and neuro-oncology: quo vadis?». *Journal of Cellular Biochemistry*, **88**, 11-19.

- [14] JANG, T.; LITOFISKY, N.S.; SMITH, T.W.; ROSS, A.H. eta RECHT, L.D. 2004. «Aberrant nestin expression during ethylnitrosourea-(ENU)-induced neurocarcinogenesis». *Neurobiology of Disease*, **15**, 544-552.
- [15] BULNES, S.; GARCIA-BLANCO, A.; BENGOTXEA, H.; ORTUZAR, N.; ARGANDONA, E.G. eta LAFUENTE, J.V. 2011. «Glial stem cells and their relationship with tumour angiogenesis process». *Revista de Neurología*, **52**, 743-750.
- [16] JANG, T.; SAVARESE, T.; LOW, H.P.; KIM, S.; VOGEL, H.; LAPOINTE, D.; DUONG, T.; LITOFISKY, N.S.; WEIMANN, J.M.; ROSS, A.H. eta RECHT, L. 2006. «Osteopontin expression in intratumoral astrocytes marks tumor progression in gliomas induced by prenatal exposure to N-ethyl-N-nitrosourea». *American Journal of Pathology*, **168**, 1676-1685.
- [17] SEIDEL, S.; GARVALOV, B.K.; WIRTA, V.; VON STECHOW, L.; SCHÄNZER, A.; MELETIS, K.; WOLTER, M.; SOMMERLAD, D.; HENZE, A.T.; NISTÉR, M.; REIFENBERGER, G.; LUNDEBERG, J.; FRISÉN, J. eta ACKER, T. 2010. «A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha». *Brain; a Journal of Neurology*, **133**, 983-995.
- [18] PAVON, L.F.; MARTI, L.C.; SIBOV, T.T.; MALHEIROS, S.M.; BRANDT, R.A.; CAVALHEIRO, S. eta GAMARRA, L.F. 2014. «In vitro analysis of neurospheres derived from glioblastoma primary culture: a novel methodology paradigm». *Frontiers in Neurology*, **4**, 214.
- [19] PASTRANA, E.; SILVA-VARGAS, V. eta DOETSCH, F. 2011 «Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells». *Cell Stem Cell*, **8**, 486-498.
- [20] BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R.E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A.B.; DEWHIRST, M.W.; BIGNER, D.D. eta RICH, J.N. 2006. «Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response». *Nature*, **444**, 756-760.
- [21] BULNES, S.; BILBAO, J. eta LAFUENTE, J.V. (2009). «Microvascular adaptive changes in experimental endogenous brain gliomas». *Histology and Histopathology*, **24**, 693-706.
- [22] CHRISTENSEN, K.; SCHRØDER, H.D. eta KRISTENSEN, B.W. 2011. «CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes». *Journal of Neuro-oncology*, **104**, 129-143.

