

Detección y aislamiento de células inmaduras neuronales a partir de líneas celulares de tumores del sistema nervioso

Detection and isolation of immature neural cells from tumoral cell lines of the nervous system

Lázcoz P^{1,2}, Balbuena J¹, Enguita M¹, Castresana JS¹

¹ Unidad de Biología de Tumores Cerebrales, Universidad de Navarra, Pamplona. ² Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Pública de Navarra, Pamplona

Beca de Investigación de Fundación MAPFRE, 2006.

Resumen

Introducción: Hoy se sugiere que la teoría de carcinogénesis establecida en las últimas décadas, según la cual el cáncer se produce por el acúmulo de mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores podría cuestionarse, a favor de una teoría más completa que incluya la participación de las denominadas células stem tumorales. Estas células poseerían la capacidad de iniciar y mantener el tumor, además de su propia capacidad de diferenciación y autorrenovación.

Objetivo: Determinar el fenotipo de marcadores de diferenciación y la posible existencia de células inmaduras (tal vez células stem) en las líneas celulares de tumores del sistema nervioso.

Material y métodos: Se estudió el nivel de expresión de los genes CD133, nestina, Musashi-1, FAS, NCAM1 y GFAP en 27 líneas celulares de tumores del sistema nervioso mediante RT-PCR semicuantitativa y citometría. La línea de neuroblastoma IMR-32 fue sometida a separación celular mediante SdFFF.

Resultados: Hemos podido separar diferentes subclones o células en diferentes estadios de diferenciación en la línea de neuroblastoma IMR-32. La correcta tipificación de estas líneas celulares podría ser relevante para establecer tratamientos quimioterápicos o de terapia génica, específicamente dirigidos contra los subclones celulares más inmaduros, que podrían corresponder (o no) a células stem tumorales.

Palabras clave:

Células madre tumorales, tumores cerebrales, neuroblastoma, CD133, SdFFF.

Abstract

Introduction: Nowadays it is suggested that the theory of carcinogenesis established along the last decades, according to which cancer is produced by the accumulation of mutations in proto-oncogenes and tumor suppressor genes might be questioned in favor of a more complete theory that includes the participation of the so called tumor stem cells. These cells would represent those in charge of initiating and maintaining the tumor; with their own capacity of differentiation and autorenewal.

Objective: To determine the phenotype of differentiation markers and the possible existence of immature cells (maybe stem cells) in cell lines of tumors of the nervous system.

Material and methods: The level of expression of CD133, nestine, Musashi-1, FAS, NCAM1 and GFAP genes was studied in 27 cell lines of tumors of the nervous system by semiquantitative RT-PCR and cytometry. The neuroblastoma cell line IMR-32 was subjected to cell separation by SdFFF.

Results: We could separate different subclones or cells in different stages of differentiation in the neuroblastoma cell line IMR-32. The correct description of these cells might be relevant to set up chemotherapeutic or gene therapy treatments specifically targeted against the most immature subclones, that might correspond (or not) to tumor stem cells.

Key words:

Tumor stem cells, brain tumors, neuroblastoma, CD133, SdFFF.

Correspondencia

J. Sáez Castresana
Unidad de Biología de Tumores Cerebrales
Universidad de Navarra
Irunlarrea 1. 31008 Pamplona
jscastresana@unav.es



Introducción

Los tumores del sistema nervioso debido a su rápido crecimiento y tendencia a metastatizar son tumores difícilmente tratables, y frecuentemente conducen a la muerte del paciente. Por ejemplo, el tiempo medio de supervivencia de un paciente con glioblastoma multiforme, tumor cerebral maligno más frecuente en adultos, es de tan sólo 10 a 12 meses. En el caso del meduloblastoma, tumor cerebral maligno más frecuente en niños, el pronóstico es más favorable. Tratamientos combinados de quimioterapia y radioterapia junto con la cirugía consiguen salvar a más de la mitad de los enfermos [1]. Asimismo, el neuroblastoma, tumor sólido maligno extracraneal más frecuente durante la infancia, produce el 15 % de las muertes debidas al cáncer en niños [2].

Desde hace algunos años se viene desarrollando la hipótesis de las «células madre tumorales», según la cual no todas las células presentes en un tumor tienen la misma capacidad de proliferar y mantener el crecimiento del mismo. Tan sólo una pequeña fracción de células del tumor, denominadas «células madre tumorales», poseerían una elevada capacidad de proliferación y autorrenovación. El resto de células perderían dicha capacidad, diferenciándose hacia células tumorales cuyo fenotipo sería el característico del tumor [3]. Se ha determinado la presencia de estas células en cáncer de mama, leucemia y tumores cerebrales, entre otros [4-6]. Se cree que estas células madre tumorales al igual que las células madre son resistentes al tratamiento quimioterápico, de ahí la importancia de su estudio para poder diseñar tratamientos más eficaces que erradiquen completamente el tumor y eviten las recidivas [7-10].

En lo que respecta a los tumores del sistema nervioso existen evidencias que indican que las células madre tumorales se originarían a partir de células madre neurales o de precursores neurales [1, 11]. De hecho, existen estudios que describen la presencia en tumores cerebrales de un pequeño número de células con propiedades similares a las de las células madre neurales [12-16]. Estas células tienen capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación «*in vitro*». La identificación y caracterización «*in vitro*» de células madre tumorales en tumores cerebrales humanos se llevó a cabo por primera vez en función de la expresión de CD133 [13], glicoproteína de membrana cuya expresión fue descrita previamente en células madre neurales [17]. Estas células, denominadas *brain tumor stem cells* o BTSC, están presentes en tumores cerebrales tanto en niños como en adultos [18]. Las BTSC expresan además otros marcadores característicos de las células

madre neurales, como nestina, musashi-1, bmi-1 y sox-2 [1,13,14,19-21].

La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se basan en el aislamiento y caracterización de células madre tumorales a partir de tumores primarios. Sin embargo, recientemente se ha observado la presencia de estas células en líneas celulares tumorales de neuroblastoma, glioblastoma, tumor de próstata y mama, entre otros, llegándose en muchos de los casos a su aislamiento [7, 13-25]. Se han descrito diferentes técnicas que permiten el aislamiento de células madre tumorales, como son: MACS, SdFFF y FACS [13,26,27]. La SdFFF (*sedimentation field flow fractionation*) es un método de separación similar a la cromatografía. Basándose en las propiedades físicas de las células (tamaño, densidad y forma) esta técnica permite separar los distintos tipos celulares manteniendo íntegras sus cualidades y su viabilidad. El principio fundamental de esta técnica consiste en una elución diferencial de las células en un líquido (fase móvil) que transcurre por un canal. Los distintos tipos celulares, dependiendo de sus características físicas, responden de distinta manera a la aplicación de una fuerza de gravedad mayor que la de la Tierra, aplicada ésta perpendicularmente a la dirección del flujo de la fase móvil. En función de esta respuesta las células migran a distintas velocidades a lo largo del canal y son recogidas a distintos tiempos. De este modo las células más pequeñas y de mayor densidad se recogen en primer lugar, mientras que las células de mayor tamaño y menor densidad son retenidas durante más tiempo y son recogidas al final [28-32].

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes: 1) determinar el grado de diferenciación celular presente en líneas celulares de neuroblastoma, glioblastoma y meduloblastoma; 2) determinar la presencia de células madre tumorales en las líneas celulares tumorales en función de la expresión de CD133; 3) Aislar las diferentes subpoblaciones celulares presentes en la línea celular de neuroblastoma IMR-32 mediante SdFFF.

Material y métodos

Líneas celulares

El estudio se llevó a cabo sobre un total de 12 líneas celulares de neuroblastoma (SK-N-DZ, SK-N-SH, SK-N-Be(2), SK-N-FI, BE(2)C, MC-IXC, IMR-32, Kelly, SIMA, SH-SY5Y, SK-N-MC, y MHH-NB-11), 9 de glioblastoma (A-172, U87MG, T98G MOG-G-CCM, CCF-STTG1, SW-1088, SW-1783, LN-405 y GOS3) y 6 de meduloblastoma (PFSK-1, Daoy, TE671, TE671 sub2, SK-PN-DW y

D283Med). Estas líneas celulares se obtuvieron desde la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA), el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) y la European Collection of Cell Cultures (ECACC, London, UK). Fueron cultivadas en condiciones standard utilizando DMEM o RPMI como medio de cultivo dependiendo de la línea celular.

Extracción de RNA

El RNA de las líneas celulares se extrajo utilizando el QuickPrep™ Total RNA Extraction Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) siguiendo las instrucciones del mismo.

RT-PCR

La retrotranscripción se realizó partiendo de 1 µg de RNA total al que se le añadió 1 µl (250 ng) de hexámeros aleatorios, 1 µl de 10 mM dNTPs y agua estéril hasta un volumen final de 12 µl. Se incubó la mezcla a 65°C durante 5 min. Posteriormente, se añadieron 4µ de tampón 5X y 2 µl de 0,1M DTT y se incubó durante 2 min a 42°C, tras lo cual se añadió 1 µl (200 unidades) de la enzima Retrotranscriptasa Superscript™ RT (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA). Finalmente se inhibió la actividad enzimática de la retrotranscriptasa a 70°C durante 15 min.

Se estudió el nivel de expresión de los genes CD133, nestina, Musashi-1, FAS, NCAM1 y GFAP mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada gen con el programa Beacon Designer (Premier Biosoft Internacional, Palo Alto, CA, USA), según se describen en la Tabla 1. Las PCRs se realizaron partiendo de 75 ng de cDNA que se amplificaron en un volumen final de 25 µl junto con 1,5-2,5 mM MgCl₂, tampón 1X, 0,2 mM de cada dNTP, 5 pmoles de cada oligonucleótido y una unidad de Amplitaq Gold™ (Ap-

plied Biosystems, Foster City, CA, USA). La temperatura de anillamiento varió entre 51 y 60°C dependiendo del gen estudiado.

Citometría de flujo

Se estudió la expresión a nivel proteico de los genes CD133, nestina, Musashi-1, FAS, NCAM1, GFAP y β-tubulin III mediante citometría de flujo.

En el caso de los marcadores de membrana CD133/1 (Miltenyi Biotec, 1:11), FAS (Serotec, 1:100) y NCAM1 (Chemicon, 1:100), se incubaron un millón de células en presencia del anticuerpo primario diluido en PBS con un 0,5% de BSA y 2 mM de EDTA a 4°C durante 10-30 min. Posteriormente, se centrifugó y lavó el precipitado celular con la solución de marcaje. En el caso de FAS y NCAM1 se incubó con los anticuerpos secundarios Cy2-Donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch) y FITC-Donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch) diluidos 1:100 en solución de marcaje durante 30 min a 4°C. Finalmente, se centrifugó, se lavó el precipitado celular y se resuspendió en PBS. La expresión de los marcadores intracelulares nestina (Chemicon, 1:100), Musashi-1 (Chemicon, 1:50), GFAP (Chemicon, 1:1000) y β-tubulina III (Chemicon 1:100) se analizó siguiendo las instrucciones del Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences). Las células se analizaron en un citómetro COULTER EPIS XL de Beckman Coulter.

SdFFF

La línea celular de neuroblastoma IMR-32 se cultivó a 1/3 de confluencia durante 72 h para posteriormente ser sometida a SdFFF. Las condiciones de separación fueron: 10g; 1,2 ml/min; 4.106 células. Se recogieron tres fracciones celulares a distintos tiempos de elución dejando un espacio de 15 segundos entre cada fracción y la siguiente, para así obtener una mayor pureza de separación (Figura 1).

Tabla 1. Cebadores y condiciones empleados en las RT-PCRs.

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')	Tamaño (pb)	T (°C)	Ciclos
CD133	GCTGATGTTGAAACTGCTTGAG	TGGTGCCGTTGCCTTGG	152	55	30
nestin	GTGGCTCCAAGACTTCC	GCACAGGTGTCTCAAGG	153	55	30
Musashi-1	CCCTGGCTACACCTACC	AGGCAGTGAGAGGAATGG	101	53	32
Fas	GCCAATTCTGCCATAAGC	TTGTCTGTGTACTCCTTCC	115	51	35
NCAM1	GAATGCCACCGCCAACC	CAGCCTCGTCTTATTATCC	188	55	32
GFAP	ACGCAGTATGAGGCAATGG	CGGTAGTCGTTGGCTTCG	140	56	30
TFR	GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGA	ATTTCCGGGAATGCTGAGAAAACAGACAGA	298	60	30

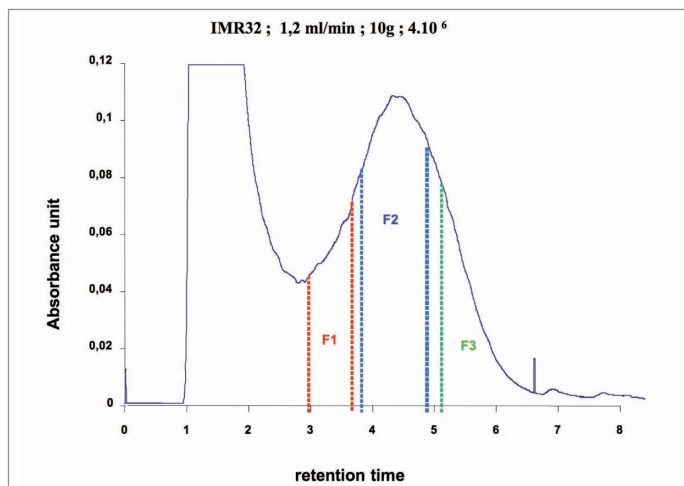


Fig. 1. Condiciones empleadas en la SdFFE.

Resultados

RT-PCR

Mediante RT-PCR se observó expresión de CD133 en todas las líneas celulares de neuroblastoma, a excepción de SK-N-FI y MHH-NB-11. Asimismo, estas líneas celulares expresaron nestina, NCAM1, Fas y Musashi 1, mientras que tan solo Kelly y Be(2)C mostraron expresión, aunque débil, de GFAP (Tabla 2, Figura 2). Todas las líneas celulares de meduloblastoma mostraron expresión de CD133, nestina, NCAM1, Fas y Musashi-1. Sin embargo, sólo se observó expresión de GFAP en Daoy y TE671 (Tabla 2). En lo que respecta a las líneas celulares de glioblastoma sólo SW1088 mostró expresión de CD133. Todas ellas expresaron nestina y Musashi-1. No se observó expresión de

Tabla 2. Expresión de CD133, nestina, NCAM1, Fas, Musashi-1 y GFAP mediante RT-PCR, en líneas celulares de neuroblastoma, meduloblastoma y glioblastoma.

Línea celular	CD133	nestin	NCAM1	Fas	Musashi-1	GFAP
Kelly	+	+	+	+	+	-/+
SIMA	+	+	+	+	+	-
MC-IXC	-/+	-/+	-/+	+	+	-
SK-N-FI	-	+	+	+	+	-
SH-SY5Y	+	+	+	-/+	+	-
SK-N-SH	-/+	+	+	+	+	-
SK-N-MC	+	-/+	-/+	+	+	-
IMR-32	-/+	+	+	+	+	-
MHH-NB-11	-	+	+	+	+	-
SK-N-Be(2)	-/+	+	+	+	+	-
SK-N-DZ	+	+	+	+	+	-
BE(2)-C	+	+	+	+	+	-/+
PFSK-1	+	+	+	-/+	-/+	-
Daoy	-/+	-/+	+	+	+	-/+
TE671	+	+	+	-/+	+	+
TE671 Sub2	+	+	+	-/+	+	-
SK-PN-DW	-/+	-/+	+	+	+	-
D283Med	+	+	+	+	+	-
A-172	-	+	+	+	+	-
GOS 3	-	+	-	+	+	+
T98G	-	+	-	+	+	-
LN405	-	+	+	+	+	-
SW1088	+	+	+	-	+	-
SW1783	-	+	+	+	+	-
MOG-G-CCM	-	+	+	+	+	+
CCF-STTG1	-	+	+	+	+	+
U87MG	-	+	+	+	+	+

(-: no se expresa; +: se expresa; -/+: expresión débil)



Tabla 3. Expresión de CD133, nestina, NCAM1, Fas, Musashi-1, GFAP y β tubulin III mediante citometría de flujo en líneas celulares de neuroblastoma, meduloblastoma y glioblastoma.

Línea celular	CD133	nestin	NCAM1	Fas	Musashi-1	GFAP	β Tubulin III
Kelly	0	31,7	21,5	0	1,4	0	82,3
SIMA	33	62,8	57,3	4,2	84	0	81,6
MC-IXC	0	2,3	0,9	0	16,6	0	21
SK-N-FI	0	39,4	20,9	0	3	0	47,1
SH-SY5Y	2,7	63,2	7,9	5	11	0	24
SK-N-SH	8,2	92,3	3,7	4,7	0	0	83
SK-N-MC	6,4	9,3	3,9	0	0	0	25,8
IMR-32	0	27	29	0	3	0	27
MHH-NB-11	0	49,4	29,4	0	1	0	53,8
SK-N-Be(2)	0	88	9,3	0	5,1	0	90
SK-N-DZ	28,3	53,4	53,5	0	87,8	0	75,5
BE(2)-C	0	17,5	13,9	0	7,3	0	46,1
PFSK-1	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Daoy	1,2	n.a.	5,4	3,8	0	0	n.a.
TE671	65,8	87,7	n.a.	n.a.	1,5	6,4	48,6
TE671 Sub2	38,4	48,5	3,3	n.a.	0	0	40,6
SK-PN-DW	0	9,9	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	23,6
D283Med	82,9	76,3	1,6	0	64,6	3,1	68,1
A-172	n.a.	n.a.	n.a.	3,9	n.a.	n.a.	n.a.
GOS 3	0	n.a.	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
T98G	0	n.a.	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
LN405	0	n.a.	n.a.	+	n.a.	n.a.	n.a.
SW1088	0	n.a.	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SW1783	n.a.	n.a.	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
MOG-G-CCM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
CCF-STTG1	n.a.	n.a.	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
U87MG	0	n.a.	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Datos expresados como porcentaje de células que expresan los diferentes marcadores.
n.a.: no analizada

NCAM1 en GOS 3 y T98G. La línea celular SW1088 no mostró expresión de Fas. Por último, cuatro de las nueve líneas celulares de glioblastoma expresaron GFAP (Tabla 2).

Citometría de flujo

La expresión a nivel proteico de los diferentes marcadores se estudió por citometría de flujo. Los resultados variaron dependiendo de las líneas celulares estudiadas y de los marcadores (Figura 3). Los resultados se resumen en la Tabla 3.

SdFFF

Se sometió a la línea celular de neuroblastoma IMR-32 a SdFFF obteniéndose 3 fracciones celulares con características morfológicas diferentes. La fracción 1 poseía células pequeñas y redondas con morfología de neuroblasto. La fracción 2 con-

tenía los dos tipos celulares característicos de la línea celular, es decir tanto células con aspecto de neuroblasto como células fibroblastoideas. Por último, en la fracción 3 predominaban las células fibroblastoideas de mayor tamaño (Figura 4).

Discusión

Funcionalmente, las células madre se definen como células multipotenciales capaces de autorrenovarse y dar lugar por diferenciación a los más de 200 tipos de tejidos diferentes que forman un organismo [33-35]. La existencia de células madre neurales en el cerebro adulto se puso definitivamente en evidencia en la pasada década [36-38], aunque los primeros descubrimientos se remontan a los años 60 cuando se sugería la posibilidad de que existiera neurogénesis en el cerebro adulto [39]. El sistema de cultivo de neuroesferas

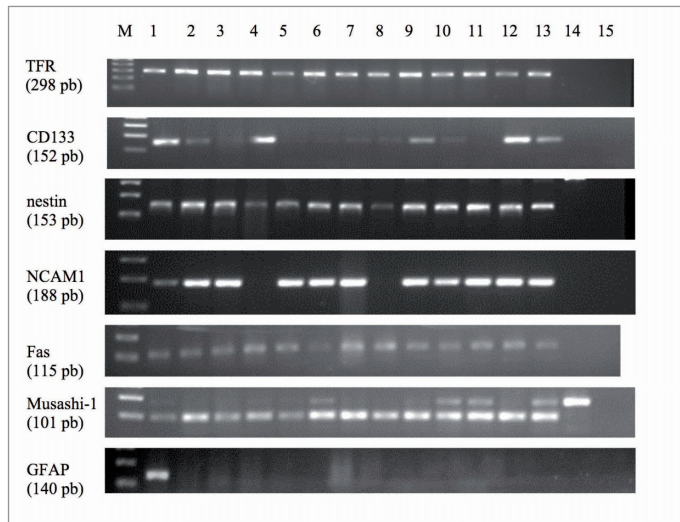


Fig. 2. Expresión de CD133, nestin, NCAM1, Fas, Musashi1 y GFAP en líneas celulares de neuroblastoma. Geles de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio (0,1 µg/ml). M: marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). 1: cDNA de tejido pulmonar normal o de cerebro normal (control positivo de expresión normal). 2: Kelly. 3: BE(2)-C. 4: SK-N-MC. 5: SK-N-FI. 6: SK-N-Be(2). 7: IMR-32. 8: MC-IXC. 9: SH-SY5Y. 10: SK-N-SH. 11: MHH-NB-11. 12: SIMA. 13: SK-N-DZ. 14: DNA genómico. 15: agua.

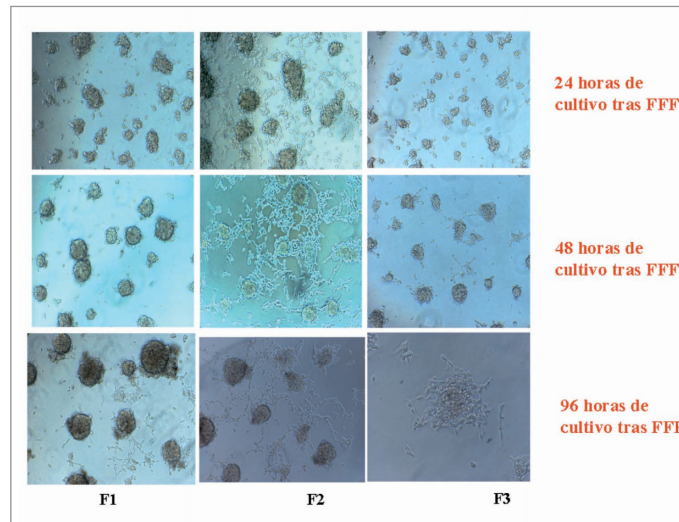


Fig. 4. Morfología de las diferentes fracciones obtenidas de la línea celular IMR-32 mediante SdFFF tras 96 horas de cultivo.

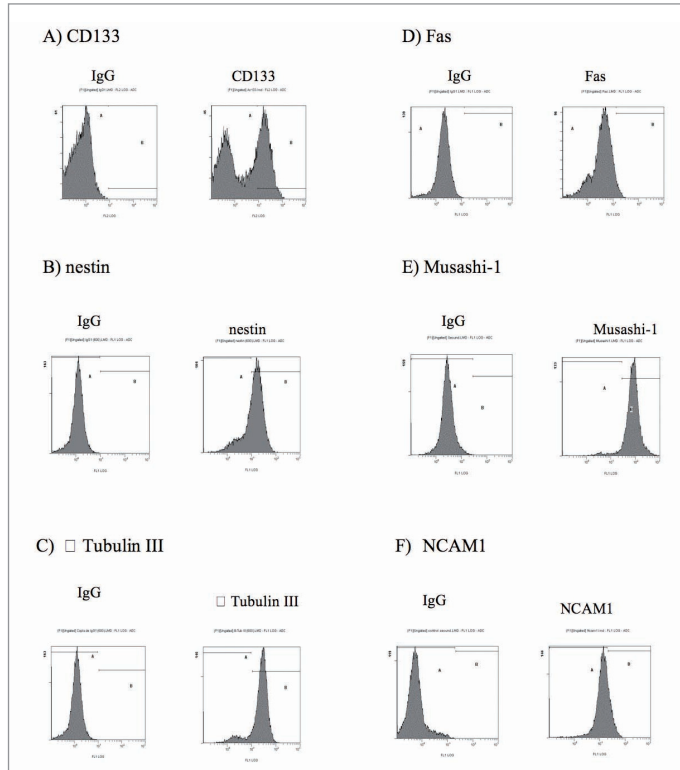


Fig. 3. Estudio por citometría de flujo de la expresión de CD133, nestina, βTubulin III, NCAM1, Fas y Musashi-1 en la línea celular de neuroblastoma IMR-32.

[40] ha permitido la identificación y caracterización de las células madre neurales «*in vitro*». Asimismo, en los últimos años se están aislando estas células en función de la expresión de marcadores presentes en la membrana celular [17].

El concepto de célula madre tumoral surge tras la observación de una elevada similitud entre los mecanismos de autorrenovación de las células madre y de las células tumorales [34,41]. En tumores hematológicos como la leucemia y el mieloma múltiple [42,43], al igual que en tumores sólidos como el cáncer de mama [4], se han aislado un pequeño número de células dentro de la masa tumoral con un elevado potencial de autorrenovación, siendo estas células las únicas capaces de originar y mantener el tumor. Debido a que las células madre somáticas pueden autorrenovarse y mantener un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación, el cáncer podría definirse como una patología causada por una disregulación del proceso de autorrenovación [34].

En el caso de los tumores del sistema nervioso se habla de las *brain tumor stem cells* o BTSC. Estas células estarían presentes tanto en tumores infantiles como en tumores de adultos, presentando capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación «*in vitro*». Además expresan marcadores típicos de células madre neurales como la nestina y CD133. La existencia de estas células podría explicar la resistencia de estos tumores al tratamiento con algunos fármacos y la aparición de recidivas. Por ello, el aislamiento y caracterización de estas BTSC es necesaria para crear nuevas drogas más eficaces y encontrar nuevas dianas terapéuticas [44-46] más eficaces contra estos tumores.

Nuestros resultados sugieren la existencia de diferentes subpoblaciones celulares con distintos grados de diferenciación, en líneas celulares de glioblastoma, meduloblastoma y neuroblastoma. En el caso de las líneas de neuroblastoma y meduloblastoma casi todas mostraron expresión de CD133 e incluso algunas de ellas revelaron por citometría de flujo la existencia de dos subpoblaciones diferentes. Estos datos parecen indicar la presencia de células madre tumorales o al menos de células tumorales inmaduras en líneas celulares de tumores del sistema nervioso, lo que concuerda con diversos estudios que afirman la presencia de este tipo de células en líneas celulares [7, 22, 24, 25]. ■

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. Getting at the root and stem of brain tumors. *Neuron* 2004; 42: 885-8.
2. Grosfeld JL. Risk-based management of solid tumors in children. *Am J Surg* 2000; 180:322-7.
3. Dirks PB. Brain tumor stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11:12-3.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-8.
5. Liu BB, Qin LX, Liu YK. Adult stem cells and cancer stem cells: tie in or tear apart? *J Cancer Res Clin Oncol* 2005; 131:631-8.
6. Bonnet D. Leukemic stem cells show the way. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43: 183-6.
7. MacKenzie IC. Retention of stem cell patterns in malignant cell lines. *Cell Prolif* 2005; 38:347-55.
8. Blagosklonny MV. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia* 2006; 20:385-91.
9. Behbod F, Rosen JM. Will cancer stem cells provide new therapeutic targets? *Carcinogenesis* 2005; 26:703-11.
10. Dean M. Cancer stem cells: redefining the paradigm of cancer treatment strategies. *Mol Interv* 2006; 6:140-8.
11. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2001; 2:120-9.
12. Hemmati HD, Nakana I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:15178-83.
13. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63:5821-8.
14. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 2002; 39:193-206.
15. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64:7011-21.
16. Uchida K, Mukai M, Okano H, Kawase T. Possible oncogenicity of subventricular zone neural stem cells: case report. *Neurosurgery* 2004; 55:977-8.
17. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:14720-5.
18. Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23:7267-73.
19. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396-401.
20. Leung C, Lingbeek M, Shakhova O, Liu J, Tanager E, Saramaslani P, et al. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature* 2004; 428:337-41.
21. Pilkington GJ. Cancer stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Prolif* 2005; 38:423-33.
22. Locke M, Heywood M, Fawell S, MacKenzie IC. Retention of intrinsic stem cell hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* 2005; 65:8944-50.
23. Welm B, Behbod F, Goodell MA, Rosen JM. Isolation and characterization of functional mammary gland stem cells. *Cell Prolif* 2003; 36(Suppl 1):17-32.
24. Kondo T, Setoguchi T, Taga T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:781-6.
25. Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL, et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia*. 2004; 6: 838-845.
26. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:14228-33.
27. Lautrette C, Cardot PJ, Vermot-desroches C, Wijdenes J, Jauberteau MO, Battu S. Sedimentation field flow fractionation purification of immature neural cells from a human tumor neuroblastoma cell line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003; 791:149-60.
28. Metreau JM, Gallet S, Cardot PJ, Le Maire V, Dumas F, Hervann A, et al. Sedimentation field-flow fractionation of cellular species. *Anal Biochem* 1997; 251:178-86.
29. Assidjo E, Chianea T, Dreyfuss MF, Cardot PJ. Validation

- procedures of sedimentation field-flow fractionation techniques for biological applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 709:197-207.
30. Battu S, Roux A, Delebasee S, Bosgiraud C, Cardot PJ. Sedimentation field-flow fractionation device cleaning, decontamination and sterilization procedures for cellular analysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 751:131-41.
 31. Comte I, Battu S, Mathonnet M, Bessette B, Lalloue F, Cardot P, et al. Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006; 843:175-82.
 32. Begaud-Grimaud G, Battu S, Liagre B, Leger DY, Beneytout JL, Cardot PJ. Pre-apoptotic sub-population cell sorting from diosgenin apoptosis induced 1547 cells by Sedimentation Field-Flow Fractionation The effect of channel thickness on sorting performance. *J Chromatogr A* 2006; 1128:194-202.
 33. Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100:143-55.
 34. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414:105-11.
 35. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100:157-68.
 36. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433-8.
 37. Gage FH. Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci* 2002; 22:612-3.
 38. Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414:112-7.
 39. Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 2000; 1:67-73.
 40. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255:1707-10.
 41. Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:895-902.
 42. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-7.
 43. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 1997; 89:3104-12.
 44. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6:425-36.
 45. Tunici P, Irvin D, Liu G, Yuan X, Zhaohui Z, NG H, et al. Brain tumor stem cells: new targets for clinical treatments? *Neurosurg Focus* 2006; 20: E27.
 46. Lasky JL, Liao LM. Targeting stem cells in brain tumors. *Technol Cancer Res Treat* 2006; 5:251-60.

Conflicto de intereses

Los autores no hemos recibido ayuda económica alguna para la realización de este trabajo. Tampoco hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial. Ninguna entidad comercial ha pagado, ni pagará, a fundaciones, instituciones educativas u otras organizaciones sin ánimo de lucro a las que estamos afiliados.