

# Isolamento, cultivo e caracterização de células-tronco CD133<sup>+</sup> de glioblastoma humano

Isolation, cultivation and characterization of CD133<sup>+</sup> stem cells from human glioblastoma

Lorena Favaro Pavon<sup>1</sup>, Luciana Cavalheiro Marti<sup>2</sup>, Tátiana Tais Sibov<sup>1</sup>, Liza Aya Mabuchi Miyaki<sup>3</sup>, Suzana Maria Fleury Malheiros<sup>4</sup>, Javier Bustamante Mamani<sup>1</sup>, Reynaldo Andre Brandt<sup>5</sup>, Guilherme Carvalhal Ribas<sup>5</sup>, Jorge Roberto Pagura<sup>5</sup>, Marcos Augusto Stavale Joaquim<sup>5</sup>, Hallin Feres Junior<sup>5</sup>, Lionel Fernel Gamarra<sup>1</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Estabelecer o método de isolamento e cultivo das neuroesferas de glioblastoma humano, bem como purificação de suas células-tronco, seguido do processo de obtenção de subesferas tumorais, caracterizando imunofenotipicamente esse conjunto clonogênico. **Métodos:** Por meio do processamento de amostras de glioblastomas (n=3), cumpriu-se a seguinte estratégia de ação: (i) estabelecimento da cultura primária de glioblastoma; (ii) isolamento e cultura de neuroesferas tumorais; (iii) purificação das células que iniciam os tumores (CD133<sup>+</sup>) por sistema de separação magnética (MACS); (iv) obtenção subesferas tumorais; (v) estudo da expressão de marcadores GFAP, CD133 e nestina. **Resultados:** Este estudo descreveu com sucesso o processo de isolamento e cultivo de subesferas de glioblastoma, as quais são constituídas por um conjunto clonogênico de células caracterizadas imunofenotipicamente como neurais, capazes de iniciar a formação tumoral. **Conclusão:** Estes achados poderão contribuir para a compreensão do processo de gliomagenese.

**Descritores:** Glioblastoma; Cultura celular; Células-tronco neoplásicas; Antígenos

## ABSTRACT

**Objective:** To establish the method of isolation and culture of human glioblastoma neurospheres, and the purification of their stem cells, followed by the process of obtaining tumor subspheres, immunophenotypically characterizing this clonogenic set. **Methods:**

Through the processing of glioblastoma samples (n=3), the following strategy of action was adopted: (i) establish primary culture of glioblastoma; (ii) isolation and culture of tumor neurospheres; (iii) purify cells that initiate tumors (CD133<sup>+</sup>) by magnetic separation system (MACS); (iv) obtain tumor subspheres; (v) study the expression of the markers nestin, CD133, and GFAP. **Results:** The study successfully described the process of isolation and culture of glioblastoma subspheres, which consist of a number of clonogenic cells immunophenotypically characterized as neural, which are able to initiate tumor formation. **Conclusion:** These findings may contribute to a better understanding of the process of gliomagenesis.

**Keywords:** Glioblastoma; Cell culture; Neoplastic stem cells; Antigens

## INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>(1)</sup>, os tumores do Sistema Nervoso Central (SNC) são classificados em sete grandes grupos que incluem os tumores primários (neuroepiteliais, meninges, nervos cranianos e paraespinhais, germinativos, região selar e hematopoiéticos) e os tumores secundários ou metastáticos.

Gliomas são tumores que se originam das células da glia e incluem os astrocitomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas (também chamados de gliomas mistos) eependimomas. Os gliomas fazem parte do grupo

Trabalho realizado no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa Experimental, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Instituto do Cérebro – InCe, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil; Faculdade de Enfermagem, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo (SP), Brasil; Centro de Neuro-Oncologia, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

<sup>5</sup> Neurocirurgia, Hospital Israelita Albert Einstein – HIAE, São Paulo (SP), Brasil.

Autor correspondente: Lorena Favaro Pavon – Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – Avenida Albert Einstein, 627/701, 2º subsolo, Piso Chinuch – Morumbi – CEP: 05651-901 – São Paulo (SP), Brasil – Tel: (11) 2151-3727 – E-mail: lorenep@einstein.br

Data de submissão: 30/3/2012 – Data de aceite: 14/6/2012

Conflito de interesse: não há.

dos tumores neuroepiteliais e correspondem a 31% dos tumores primários e a 80% dos tumores malignos do SNC. O grupo dos astrocitomas corresponde a 76% de todos os gliomas, e o glioblastoma representa 53,7% dos casos<sup>(2)</sup>. O glioblastoma é o mais frequente e maligno dos astrocitomas e, apesar de inúmeros avanços no diagnóstico e tratamento desses tumores, seu prognóstico permanece ainda bastante limitado<sup>(3,4)</sup>.

Descreve-se ainda que o glioma é a neoplasia mais comum do SNC humano<sup>(2)</sup>, sendo de difícil abordagem terapêutica, devido a alguns fatores: (i) apresentar caráter infiltrativo; (ii) possuir massa tumoral composta por células com características morfofuncionais diversas que expressam uma variedade de marcadores neurais; (iii) ser altamente resistente a processos radio e quimioterápicos<sup>(5)</sup>. Essas características podem provavelmente se justificar pela competência das células tumorais aos moldes de células-tronco, sendo responsáveis pela alta taxa de recorrência da doença ou pela resistência primária ao tratamento. Dessa forma, é de extrema relevância a procura por novas abordagens pertinentes à gênese, à progressão e ao comportamento clínico dos tumores cerebrais.

Entre as teorias que procuram determinar a gênese molecular dos tumores do SNC, uma das que vem ganhando adeptos nos últimos anos é a hipótese das células-tronco tumorais<sup>(6,7)</sup>. Estudos recentes têm demonstrado que o surgimento e a progressão de alguns tumores malignos podem ser determinados por uma subpopulação de células tumorigênicas com grande capacidade de autorrenovação, denominadas células-tronco tumorais<sup>(5,8)</sup>.

A primeira perspectiva de identificação e caracterização das células-tronco tumorais de diferentes fenótipos foi relatada em neoplasias cerebrais humanas com expressão aumentada do antígeno CD133<sup>(5)</sup>.

Anticorpos monoclonais anti-CD133 foram utilizados previamente para identificar célula-tronco neural humana normal<sup>(9)</sup>. A célula-tronco tumoral cerebral foi isolada exclusivamente por meio da expressão desse antígeno (CD133). Três indícios sugeriram que essas células CD133<sup>+</sup> fossem as células-tronco tumorais cerebrais: (1) geraram conjuntos clonogênicos de células (neuroesferas); (2) submeteram-se ao processo de autorrenovação e proliferação; e (3) diferenciaram-se e voltando a expressar o fenótipo do tumor que lhe deu origem quando implantadas em animais imunodeficientes.

Estudo conduzido por Uchida et al.<sup>(10)</sup> descreve que células CD133<sup>+</sup> purificadas geraram neuroesferas em cultura, bem como se diferenciaram em células gliais e neurônios em condições de diferenciação celular. Outros grupos também confirmaram que, em contraste com as células CD133<sup>-</sup>, as células CD133<sup>+</sup> foram capazes de in-

duzir tumores cerebrais em modelos *in vivo*<sup>(11,12)</sup>. Assim, esses estudos sugerem fortemente que a subpopulação de células que iniciam os tumores cerebrais estariam contidas em uma pequena fração de células CD133<sup>+</sup>.

## OBJETIVO

O presente estudo visou estabelecer o método de isolamento e cultivo das neuroesferas de glioblastoma humano, bem como purificação de suas células-tronco, seguido do processo de obtenção de subesferas tumorais, caracterizando imunofenotipicamente esse conjunto clonogênico.

Estes objetivos cumpriram a seguinte estratégia de ação: (i) estabelecimento da cultura primária de glioblastoma; (ii) isolamento e cultura de neuroesferas tumorais; (iii) purificação das células que iniciam os tumores por seleção com *microbeads* magnéticas CD133; (iv) citometria de fluxo das células tumorais CD133<sup>+</sup>; (v) obtenção de subesferas tumorais; (vi) estudo da expressão de marcadores GFAP (proteína glial fibrilar ácida e filamento intermediário específico para astrócitos no SN), CD133 (glicoproteína de membrana celular altamente expresso em células-tronco gliais e neuronais) e nestina (classe proteica de filamento intermediário encontrada na fase desenvolvimento embrionário em cérebro humano).

## MÉTODOS

Este estudo contou com o processamento de amostras de glioblastoma (n=3) obtidas em processos cirúrgicos do Centro de Neuro-Oncologia do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE). As amostras foram doadas mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes (CEP 687).

O diagnóstico desse tumor é realizado considerando-se os achados em imagens de ressonância magnética previamente discutidos pelo Programa Integrado de Neuro-Oncologia e pelo Laboratório de Anatomia Patológica do HIAE.

Para controle do estudo, foram realizadas reações de imunohistoquímica para GFAP, biomarcador utilizado no diagnóstico de glioblastoma<sup>(13)</sup>.

Dessa forma, o presente estudo cumpriu a estratégia de ação descrita a seguir.

### Estabelecimento da cultura primária das amostras de glioblastoma

As amostras tumorais de glioblastoma frescas foram lavadas, fracionadas em PBS (1X) e submetidas à dissociação enzimática utilizando colagenase 0,3%. As células

foram ressuspensas em meio de cultura DMEM-LG: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose* a 10% *Fetal Bovine Serum* e 1% *Antibiotic-Antimycotic* (100X) e *L-Glutamine* 200mm (100x) e plaqueadas em uma densidade de  $5 \times 10^6$  células vivas por  $25 \text{cm}^2$ , que foram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific Inc. 3110, Waltham, MA) provida de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  por, no mínimo, 24 horas. Após aquisição de confluência de 80%, as células de glioblastoma foram analisadas por ensaios de imunocitoquímica utilizando o anticorpo CD133 (1:100 Abcam, Cambridge, MA), conforme a indicação do fabricante (DAKO, Biogen).

### Cultura de neuroesferas tumorais

As células obtidas da cultura primária dos tumores foram ressuspensas em meio de cultura, definido como meio para cultivo de célula-tronco tumoral cerebral (CTTC), composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12* (Gibco®), suplemento com *N2* (Gibco®), EGF (20ng/mL; Invitrogen), bFGF (20ng/mL; Gibco®), fator inibidor de leucemia (LIF; Chemicon) e B27 (1:50; Life Technologies Corporation) e plaqueados numa densidade de  $2 \times 10^4$  células viáveis em placas de 24 wells. As células foram mantidas em estufa (Thermo Fisher Scientific Inc. 3110, Waltham, MA) provida de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , sendo o meio de cultivo trocado a cada 3 dias<sup>(14)</sup>.

### Purificação das células que iniciam os tumores por meio do processo de separação magnética pelo marcador antigênico CD133

As colônias de neuroesferas tumorais foram dissociadas utilizando o reagente StemPro® Accutase® (Invitrogen). Para a marcação magnética foi utilizado *microbeads* magnéticas CD133 (MACS®, Miltenyi Biotec). As células foram marcadas com CD133/2-PE (Miltenyi Biotec clone AC133), sendo que a eficiência da separação das frações celulares positivas foi avaliada pelo citômetro de fluxo FACSARIA (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisadas utilizando FACSDIVA *software* (BD Biosciences, San Jose, CA). Este ensaio permitiu a separação das frações celulares CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup>(13), sendo que a fração CD133<sup>+</sup> foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão, cumprindo protocolo de rotina<sup>(15)</sup>.

### Formação de subesferas tumorais

As células CD133<sup>+</sup> e CD133<sup>-</sup> isoladas pelo processo de separação magnética foram suspensas em meio de cultura denominado “meio de células-tronco tumoral cerebral” e plaqueadas numa densidade de  $2 \times 10^4$  célu-

las vivas em placas de 96 wells. Esse método permitiu a formação de subesferas tumorais que constituem subpopulações purificadas somente de células CD133<sup>+</sup>.

### Caracterização imunofenotípica das subesferas tumorais

Para a caracterização imunofenotípica das subesferas tumorais, foi utilizado citometria digital multiparâmetro (FACSARIA; Becton Dickinson, San Jose, CA) e os experimentos foram realizados utilizando anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente: GFAP (clone:51-10C9; BD Pharmingen, San Diego, CA), nestina (clone:AD2; BD Pharmingen, San Diego, CA) e CD133 APC (clone:/2 293-C3; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha), anticorpo secundário de ovelha anticamundongo PE (Chemicon; Temecula, CA) e isotipos específicos para cada monoclonal. As técnicas de coloração, aquisição e análise foram realizadas de acordo com as indicações do fabricante.

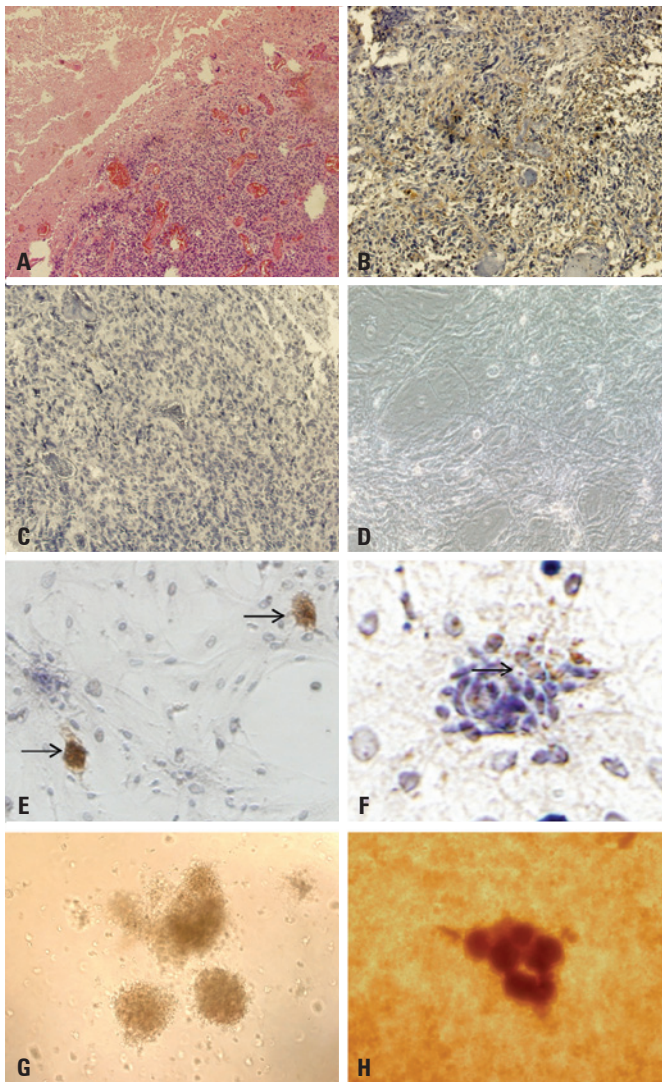
### RESULTADOS

As análises morfo-histológicas apontaram a presença de tecido cerebral tumoral altamente infiltrativo, observando-se aumento gradual da celularidade (Figura 1A). As células neoplásicas apresentaram-se predominantemente fusiformes e derivadas de astrócitos maduros (Figura 1A). As células endoteliais dos capilares mostraram-se numerosas e tumefeitas (Figura 1A), efeito relacionado à alta proliferação vascular. A presença da GFAP define o tumor como de linhagem glial (Figura 1B). As análises de imunohistoquímica (Figura 1B) apresentaram forte positividade para GFAP, sendo que as células mostraram-se neoplásicas, de aspecto imaturo, alongadas e fusiformes.

Amostras de tecido de glioblastoma foram utilizadas para o estabelecimento da cultura primária desses tumores, na qual a mesma se mostrou homogênea com células fusiformes e dispostas em feixes multidirecionados (Figura 1D). Ensaio imunocitoquímico revelaram a expressão do marcador antigênico CD133 nas neuroesferas tumorais da cultura primária de glioblastoma (Figuras 1E e F).

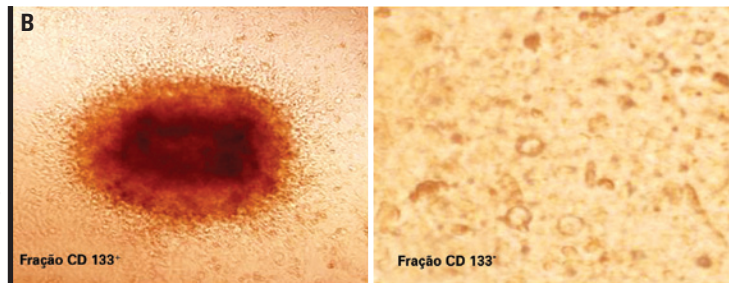
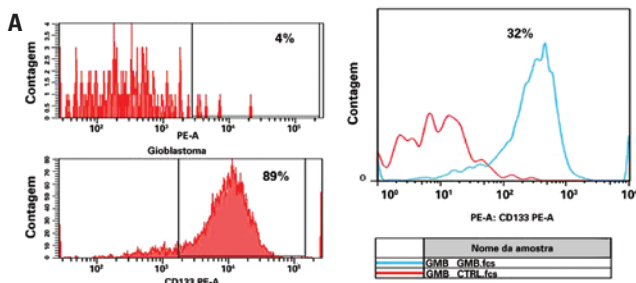
As células obtidas a partir da cultura primária desses tumores foram ressuspensas em meio de cultivo CTTC, no qual se constituiu os processos de isolamento e cultura de neuroesferas derivadas de glioblastoma (Figuras 1G e H).

Na sequência do estudo, realizou-se a caracterização imunofenotípica por ensaios de citometria de fluxo, avaliando a eficiência da separação magnética das frações celulares positivas para o marcador antigênico CD133 em amostras de neuroesferas tumorais (89% de células CD133<sup>+</sup>), padronizando o processo de *sorting* para célu-

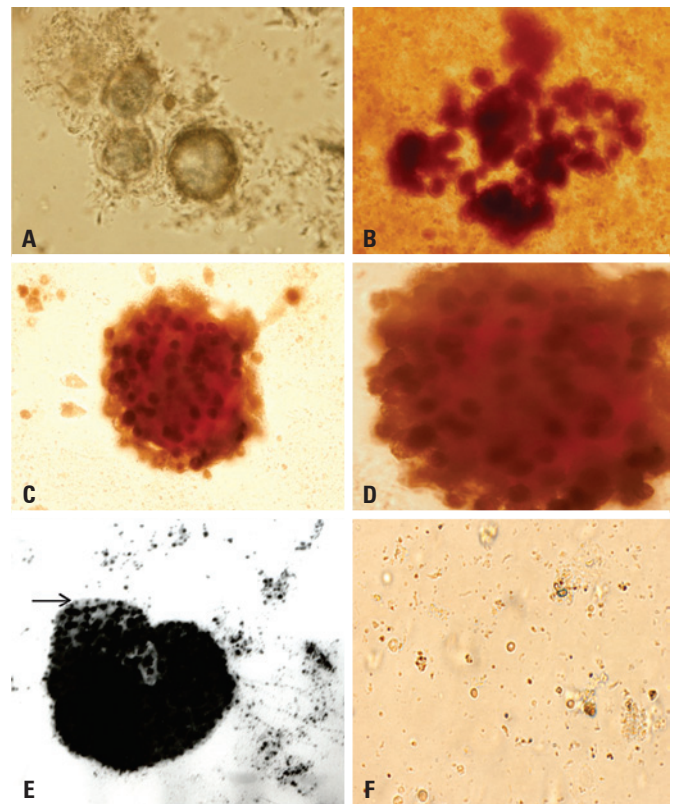


**Figura 1.** Testes histológicos e imunohistoquímicos em amostras de glioblastoma obtidas em cortes histotécnicos de parafina. (A) Hematoxilina e Eosina (H/E). (B) GFAP. (C) Controle negativo PH+ (GFAP). (A, B e C) Aumento: 200X. (D) Cultura primária de glioblastoma. (E e F) Ensaio de imunocitoquímica para CD133 em cultura primária (seta: expressão do marcador antigênico CD133). (G e H) Isolamento e cultura de neuroesferas tumorais de glioblastoma. (D, E, G e H) Aumento: 400X. (F) Aumento: 600X

las CD133<sup>+</sup> (Figura 2A). Somente essas células CD133<sup>+</sup> foram capazes de gerar, em cultura, as subesferas tu-



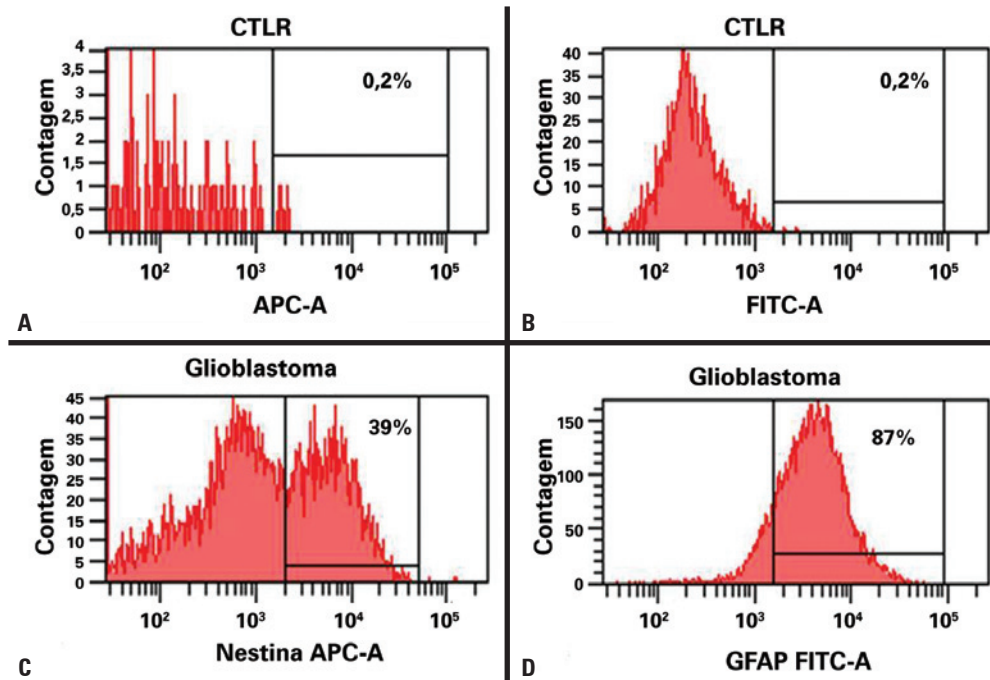
**Figura 2.** (A) Caracterização imunofenotípica por ensaios de citometria de fluxo avaliando a eficiência da separação magnética das frações celulares positivas para o marcador antigênico CD133 em amostras de neuroesferas tumorais (89% de células CD133<sup>+</sup>). (B) Cultura de subesferas tumorais de glioblastoma obtidas após o processo de seleção das células CD133<sup>+</sup>, comparadamente com a ausência de subesferas obtidas a partir das frações CD133<sup>-</sup> (controle negativo). (B) Aumento: 400X



**Figura 3.** Cultura de subesferas tumorais de glioblastoma obtidas após o processo de seleção das células CD133<sup>+</sup> por MACS. (A e B) Aumento: 200X. (C e F) Aumento: 400X. (D) Aumento: 600X. (E) Análise de microscopia eletrônica de transmissão das subesferas tumorais; seta: pontos eletrondensos evidenciando as *microbeads* magnéticas conjugadas ao anti-CD133; barra: 1µm. (F) Controle negativo para o processo de formação de subesferas tumorais obtido a partir das células CD133<sup>-</sup>

morais de glioblastoma (Figura 2B, Figuras 3A a 3E), o que não ocorreu em comparação às frações de células CD133<sup>-</sup> (Figura 3F).

As subesferas derivadas de glioblastoma foram descritas como agregados celulares ou conjunto clonogênico de células (Figura 3), as quais foram caracterizadas imunofenotipicamente evidenciando o padrão de expressão dos marcadores GFAP (87%) e nestina (39%) (Figura 4).



**Figura 4.** Caracterização imunofenotípica por ensaios de citometria de fluxo evidenciando o padrão de expressão dos marcadores GFAP e nestina em amostras de subesferas tumorais de glioblastoma

A figura 3E, evidenciada por análises ultraestruturais de microscopia eletrônica de transmissão, descreveu a presença de grumos eletrondensos sobre as subesfera tumorais de glioblastoma, apontando as *beads* magnéticas conjugadas a anticorpos anti-CD133.

## DISCUSSÃO

Apesar dos recentes avanços no tratamento do câncer cerebral humano, os mecanismos celulares e moleculares pelos quais os gliomas se iniciam e se estabelecem ainda não foram elucidados. Estudos recentes têm demonstrado que o surgimento e a progressão dos tumores cerebrais malignos podem ser determinados por uma subpopulação de células tumorigênicas com grande capacidade de autorrenovação denominadas células-tronco<sup>(16,17)</sup>.

A hipótese da célula-tronco tumoral descreve que os tumores cerebrais, apesar de uma massa heterogênea de células, são compostos por uma população celular rara (CD133<sup>+</sup>), a qual é capaz de iniciar a formação de um novo tumor ou de metástase, sendo sua natureza definida pela formação de neuroesferas<sup>(6)</sup>.

O processo de investigação das células-tronco tumorais cerebrais permanece inconclusivo, sendo que sua função ainda não pode ser objetivamente estabelecida. Para compreender plenamente a biologia das células-tronco tumorais cerebrais, é altamente desejável estabelecer linhas de pesquisa permanentes no processo de isolamento, cultivo e purificação das suas células-tronco.

Dessa forma, o presente estudo objetivou estabelecer o método de isolamento e cultivo de células-tronco de tumores, devidamente classificados como glioblastoma. O processo de cultura primária desses tumores, descrito de forma homogênea com células fusiformes dispostas em feixes multidirecionados, fundamentou inicialmente o estudo. Ensaio imunocitoquímico, realizados nessas culturas primárias de glioblastoma, revelaram a expressão do marcador antigênico CD133 em agregados celulares iniciais à constituição de possíveis neuroesferas, ressaltando que o processo de isolamento e cultura de neuroesferas tumorais de glioblastoma ocorreu somente após a utilização de meio de cultivo devidamente suplementado (meio CTTC).

O processo de purificação das células que iniciam os tumores, realizado pelo método de seleção magnética por MACS, atribuiu às células CD133<sup>+</sup> a capacidade de gerar, em cultura, as subesferas tumorais de glioblastoma.

Essas subesferas tumorais de glioblastoma foram descritas como agregados celulares ou conjunto clonogênico de células caracterizadas imunofenotipicamente pela expressão de marcadores como GFAP, evidenciando a origem glial das células tumorais, bem como nestina, filamento intermediário próprio de células imaturas, estando presente em níveis elevados em células-tronco comprometidas com linhagens de células do SNC<sup>(8)</sup>.

Essas subesferas tumorais também expressaram, obviamente, o marcador antigênico CD133, presente em célula-tronco tumoral neural, na qual foi revelada,

pela descrição ultraestrutural, a presença de *beads* magnéticas conjugadas as anticorpos anti-CD133 sobre as subesfera tumorais de glioblastoma.

Este estudo pôde evidenciar, com seus resultados iniciais, que realmente o processo de isolamento e cultivo das subesferas de glioblastoma conferiu características imunofenóticas de células-tronco tumorais neurais às células que as constituem.

Os resultados descritos neste trabalho estão fundamentados em achados recentes da literatura, os quais caracterizaram o perfil imunofenotípico das células-tronco de glioblastoma, descrevendo um conjunto de marcadores celulares (CD133, nestina e GFAP) com propriedades tumorigênicas<sup>(18,19)</sup>.

Estudos paralelos definem outro conjunto de marcadores antigênicos nesse processo de caracterização das células-tronco tumorais cerebrais, tais como *CXCR4*, *Sox2*, *Musashi-1* e *Nanog*<sup>(20)</sup>.

O presente trabalho utilizou o marcador CD133 como preditor molecular na fundamentação do processo de seleção de células-tronco. Essa conduta segue padrões prévios da literatura, na qual se identificou uma assinatura molecular, para as células CD133<sup>+</sup> de glioblastoma, semelhante às células-tronco embrionárias humanas<sup>(21)</sup>. Esses autores, além de determinarem que essas células CD133<sup>+</sup> seriam as células-tronco de glioblastoma, identificaram um subtipo mais agressivo da doença<sup>(21)</sup>, visto que essas células são altamente resistentes a processos radio e quimioterápicos<sup>(16)</sup>.

Outros estudos também sugeriram que a expressão do marcador CD133<sup>+</sup> poderia ser indicador molecular de disseminação de glioblastoma<sup>(16,22)</sup>, justificando seu valor prognóstico<sup>(23)</sup> e a recente procura por drogas que atuem contra essa subpopulação de células (CD133<sup>+</sup>), afim de inibir ou retardar a proliferação de gliomas altamente invasivos<sup>(24)</sup>.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho propôs um processo de isolamento, cultivo e caracterização das células-tronco de glioblastoma, que pode contribuir para o estudo da gênese dos tumores cerebrais, identificando a célula responsável pela origem e disseminação tumoral e, consequentemente, elucidando novos paradigmas terapêuticos da neuro-oncologia.

## Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pelo Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEPAE), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), pela Coordenação de Aperfeiçoamento

de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## REFERÊNCIAS

- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, editors. WHO classification of tumors of the central nervous system. 4th ed. Vol. 1. Lyon: IARC Press; 2007.
- Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). [Internet]. North American Association of Central Cancer Registries. [cited 2012 May 14]. Available from: <http://www.cbtrus.org>.
- Chen R, Nishimura MC, Bumbaca SM, Kharbanda S, Forrest WF, Kasman IM, et al. A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell*. 2010;17(4):362-75.
- Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Reni M, Gatta G, Vecht C. Glioblastoma in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;67(2):139-52.
- Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med*. 2008;359(5):492-507.
- 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*. 2004;63(18):5821-8.
- Sulman E, Aldape K, Colman H. Brain tumor stem cells. *Curr Probl Cancer*. 2008;32(3):124-42.
- Dell'Albani P. Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2407-15.
- Setoguchi T, Taga T, Kondo T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. *Cell Cycle*. 2004;3(4):414-5.
- Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, et al. Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. *J Neurooncol*. 2011;104(3):697-704.
- Facchino S, Abdouh M, Chato W, Bernier G. BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *J Neurosci*. 2010;30(30):10096-111.
- Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64(19):7011-21.
- Morrison CD, Prayson RA. Immunohistochemistry in the diagnosis of neoplasms of the central nervous system. *Semin Diagn Pathol*. 2000;17(3):204-15.
- Lenkiewicz M, Li N, Singh SK. Culture and isolation of brain tumor initiating cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2009; Chapter 3:Unit3.3.
- Pavon LF, Marti LC, Sibov TT, Malheiros SM, Oliveira DM, Guilhen DD, et al. The ultrastructural study of tumorigenic cells using nanobiomarkers. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010; 25(3):289-98.
- Cho DY, Lin SZ, Yang WK, Hsu DM, Lin HL, Lee HC, et al. The role of cancer stem cells (CD133(+)) in malignant gliomas. *Cell Transplant*. 2011;20(1):121-5.
- Natsume A, Kinjo S, Yuki K, Kato T, Ohno M, Motomura K, et al. Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol*. 2011;28(1):1-12.
- Tomuleasa C, Soritau O, Rus-Ciucu D, Ioani H, Susman S, Petrescu M, et al. Functional and molecular characterization of glioblastoma multiforme-derived cancer stem cells. *J BUON*. 2010;15(3):583-91.
- Niu CS, Li DX, Liu YH, Fu XM, Tang SF, Li J. Expression of NANOG in human gliomas and its relationship with undifferentiated glioma cells. *Oncol Rep*. 2011;26(3):593-601. doi: 10.3892/or.2011.1308.
- Ehteshami M, Mapara KY, Stevenson CB, Thompson RC. CXCR4 mediates the proliferation of glioblastoma progenitor cells. *Cancer Lett*. 2009;18;274(2):305-12.
- Yan X, Ma L, Yi D, Yoon JG, Diercks A, Foltz G, et al. A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1591-6.
- Sato A, Sakurada K, Kumabe T, Sasajima T, Beppu T, Asano K, Ohkuma H, Ogawa A, Mizoi K, Tominaga T, Kitanaka C, Kayama T; Tohoku Brain Tumor Study Group. Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas. *Neurosurg Rev*. 2010;33(2):175-83; discussion 183-4.
- Pallini R, Ricci-Vitiani L, Montano N, Mollinari C, Biffoni M, Cenci T, et al. Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer*. 2011;117(1):162-74.
- Nakano I, Chiocci EA. Editorial Finding drugs against CD133(+) glioma subpopulations. *J Neurosurg*. 2011;114(3):648; discussion 648-50. *J Neurosurg*. 2011;114(3):651-62.