

## Possíveis implicações das células-tronco no carcinoma mamário e suas perspectivas futuras

### Possible implications of cancer stem cells in breast cancer and their future perspectives

*Larissa Yumi Saito<sup>1</sup>, Bruna Karina Banin Hirata<sup>1</sup>, Maria Angelica Ehara Watanabe<sup>1</sup>, Roberta Losi Guembarovski<sup>1</sup>*

#### Endereço para correspondência

Larissa Yumi Saito

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Universidade Estadual de Londrina.

Laboratório de Polimorfismos de DNA e Imunologia, Londrina, Paraná, Brasil.

E-mail: saito.lyt@gmail.com

#### Resumo

A neoplasia mamária é uma das mais incidentes na população feminina sendo considerada um problema de saúde pública. Pela técnica de *microarray* ela foi classificada em diferentes subtipos: luminal A, luminal B, HER2-superexpresso, triplo-negativo (TN) não basalóide e basalóide. Apesar de alguns já se beneficiarem de tratamentos alvo específicos, como a hormonioterapia e os anticorpos monoclonais, subtipos agressivos, como o TN, não possuem um tratamento eficaz. Além disso, muitos tumores têm recorrência e metástase. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura enfocando o câncer de mama e discorrer sobre o tema das células-tronco do câncer (CTC), bem como sua correlação com a neoplasia mamária. As células-tronco (CT) são naturais do corpo humano e são responsáveis pela renovação e diferenciação teciduais. O conceito das CTC é relativamente novo e não se encontra totalmente definido, mas estas podem ser responsáveis pelo crescimento tumoral, recidiva da doença, bem como por sua disseminação à distância. Isto pode ser devido ao fato das CTC se encontrarem em estado quiescente, tendo a habilidade de evadir ao tratamento. Desde sua caracterização, muitos estudos têm sido dedicados ao seu entendimento e aplicação prática. Com base nesta revisão, foi concluído que o câncer de mama é uma doença que, apesar de extensivamente pesquisada, ainda apresenta aspectos a serem elucidados. Também que no câncer de mama as CTC se mostram como importantes mecanismos de manutenção da doença, mas seu uso ainda se encontra restrito às pesquisas, já que sua caracterização necessita de maior entendimento.

**Palavras-chave:** câncer de mama, células-tronco, células-tronco do câncer, subtipos tumorais.

#### Abstract

Breast cancer (BC) is one of the most prevalent among women, and it is considered a public health issue. Using the microarray technique, it's been classified into different subtypes: luminal A, luminal B, HER2-enriched, basal-like and non-basal like triple-negative. Although some of these can benefit from target-specific treatments, such as hormone therapy and monoclonal antibodies, the aggressive subtypes, like triple-negative (TN), are still without efficient treatments. Moreover, most tumors suffer recurrence and metastasis. In this context, the objective of the present study was to accomplish a literature review focusing on BC and cancer stem cell (CSC), as well as its correlation with mammary neoplasia. Stem cells (SC) are natural occurrences in the human body and are responsible for tissue renovation and differentiation. The concept of CSC is relatively new and its definition is yet to be clarified; however, they are thought to be reliable for tumor growth, recurrence and metastasis. One explanation for this fact

is that CSCs are in a quiescent state, having the ability to evade chemotherapy treatment. Ever since its first characterization, many studies have been conducted to understand its concepts and apply their potential into research. Based in this review, it could be concluded that BC is a disease that, although extensively researched, still presents some aspects that need to be elucidated. Additionally, in these malignant tumors, CSCs were found to be important mechanisms for disease maintenance, but its applications are until restricted to research, since the characterization needs more understanding.

**Key words:** breast cancer, stem cells, cancer stem cells, tumoral subtypes.

## INTRODUÇÃO

Câncer é o nome utilizado para descrever uma centena de doenças distintas que podem afetar qualquer parte do corpo e que tem em comum o crescimento celular desordenado <sup>(1)</sup>. São doenças multifatoriais e sempre apresentam componentes genéticos, já que para o seu surgimento, são necessárias mutações em genes regulatórios das células, podendo ser em proto-oncogenes, supressores tumorais ou genes de reparo do DNA <sup>(2)</sup>.

No entanto, o ambiente também interfere no surgimento da doença: ar, água, estilo de vida (dieta, hábitos reprodutivos e uso de tabaco). Desconsiderando os tumores familiares, o ambiente é o maior responsável pelos tumores esporádicos <sup>(3)</sup>. Segundo a OMS, desconsiderando os tumores de pele não-melanoma, os cânceres mais frequentes em homens são próstata, pulmão, colorretal, estômago e esôfago. Já nas mulheres, o câncer de mama é o mais frequente, seguido pelo câncer de colo de útero, colorretal, pulmão e tireoide <sup>(4)</sup>.

Dentro deste contexto, o presente artigo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura tendo como foco o câncer de mama, sua caracterização e atual tratamento. Adicionalmente, introduzir o conceito de células-tronco do câncer e seus desdobramentos no tratamento atual das neoplasias, com foco no câncer de mama, além de discorrer sobre novas pesquisas envolvendo estas células, bem como suas possíveis implicações futuras.

## METODOLOGIA

A presente revisão de literatura foi realizada utilizando artigos científicos disponíveis no PubMed do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). As palavras-chave usadas para a pesquisa foram “câncer de mama”, “células-tronco” e “células-tronco do câncer” e suas traduções para o inglês “breast cancer”, “stem cells” e “cancer stem cells” e foram selecionados artigos publicados entre os anos de 2003 e 2017.

Além disso, foi realizada uma busca manual na lista de referências dos artigos de interesse para selecionar estudos adicionais relevantes. Na análise das publicações selecionadas, foram avaliados os resultados encontrados e as conclusões do estudo.

### *Câncer de mama*

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea que afeta mulheres e homens, sendo mais rara nestes (apenas 1% dos casos). Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva <sup>(5)</sup>, esta doença é um dos tipos de neoplasia mais comuns no Brasil e no mundo, sendo o mais frequente entre as mulheres no país,

excluindo o câncer de pele não-melanoma, exceto na região Norte, onde perde para o câncer de colo de útero.

De acordo com a OMS <sup>(4)</sup>, para o ano de 2012, foram estimados 1.671.000 casos de câncer de mama, e 522.000 mortes no mundo. Já para o Brasil, 57.960 novos casos são estimados, tendo uma ocorrência de 56 casos a cada 100.000 mulheres, e 14.388 mortes para o biênio 2016-2017<sup>(5)</sup>. Comparando o perfil brasileiro com o americano, para 2016, o National Cancer Institute prevê 246.660 novos casos, com um número de mortes de 40.450<sup>(6)</sup>. Pode-se perceber que apesar de os Estados Unidos apresentarem cerca de quatro vezes mais casos que o Brasil, a mortalidade é apenas duas vezes maior. Esse resultado pode ser explicado pela detecção precoce dos casos aliada ao avanço dos tratamentos <sup>(7; 8; 9)</sup>.

As causas do câncer de mama ainda não são conhecidas, mas existem fatores de risco associados à doença, tais como: menarca precoce, gravidez e menopausa tardias, nuliparidade, consumo de álcool e tabaco, obesidade, além de uso prolongado de medicamentos de reposição hormonal ou de anticoncepcionais. A idade e o histórico familiar também são fatores associados a esta neoplasia <sup>(10)</sup>.

A incidência do câncer de mama tende a aumentar com a idade, assim como a mortalidade, a partir dos quarenta anos. Comparando-se as taxas de mortalidade de mulheres abaixo de 40 anos (1.048 mortes) e acima de 60 anos (7.694) para a doença, consegue-se ver que o risco é sete vezes maior na segunda categoria <sup>(11)</sup>. As complicações da doença metastática e recorrência são a causa principal de morte para esta neoplasia, e, segundo O'Shaughnessy <sup>(12)</sup>, cerca de 30% das mulheres diagnosticadas com tumores em estágios precoces da doença estão sujeitas a elas. Esta neoplasia possui órgãos metastáticos preferenciais: linfonodos regionais, medula óssea, pulmão e fígado <sup>(13)</sup>.

Assim como em outros tipos de câncer, o de mama também apresenta um padrão familiar. Os fatores hereditários estão principalmente relacionados com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (genes de predisposição ao câncer de mama hereditário 1 e 2), que, em seu estado normal, são genes de reparo de quebra de fita dupla de DNA. Quando mutados são responsáveis por 10 a 20% dos casos <sup>(14)</sup>. Esses genes estão associados às formas mais agressivas da doença, manifestações em idade mais jovem e casos de câncer masculino. Pessoas diagnosticadas com a mutação em um dos dois genes correm um risco muito mais elevado de desenvolverem a doença <sup>(15)</sup>.

Segundo o departamento de Oncogenética do Hospital do Câncer A.C. Camargo, o risco de desenvolver a doença para pessoas que possuem o alelo mutado de *BRCA1* ou *BRCA2* aumenta em até 80%. Quando detectados na família, os parentes próximos (de até 3 graus) são considerados de risco elevado e devem fazer acompanhamento de rotina a partir dos 25 anos <sup>(16)</sup>. A mastectomia bilateral profilática em mulheres com mutações nestes genes de alta penetrância pode ser uma alternativa profilática, e diminui o risco de se desenvolver a doença em pelo menos 95% <sup>(6)</sup>.

### ***Classificação histológica e molecular***

O câncer de mama pode ser classificado pelo tipo histológico, estágio de progressão da doença ou tipo de receptores que as células expressam <sup>(17)</sup>.

O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de

metástases. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estágios 0 ao IV <sup>(18)</sup>.

Assim, existem cinco estágios de proliferação da doença. O estágio 0 é quando a doença está restrita ao local inicial: são os carcinomas *in situ* (normalmente classificados como pré-cânceres); no estágio I, os tumores já invadiram o tecido local e possuem, no máximo, dois centímetros de tamanho, nessa fase, já são considerados carcinomas invasivos. No estágio II, os tumores possuem entre dois e cinco centímetros e já se pode detectar poucos gânglios linfáticos axilares comprometidos; no estágio III, os tumores têm mais de cinco centímetros e os linfonodos estão mais comprometidos. O estágio IV é marcado pela metástase à distância e apresenta um pior prognóstico <sup>(18)</sup>.

Os tumores mamários são também classificados histologicamente, de acordo com o sítio de origem, em: carcinoma lobular *in situ*, carcinoma ductal *in situ* (pré-cânceres), carcinoma lobular invasivo e carcinoma ductal invasivo. É dado o nome de lobular ao tumor que se inicia nas glândulas produtoras de leite e ductal, quando se origina no ducto. O tipo mais comum é o carcinoma ductal invasivo, que detém cerca de 80% dos casos seguido pelo carcinoma lobular invasivo, englobando cerca de 10% dos casos <sup>(19)</sup>.

Existem também outros tipos mais raros de tumores, como o câncer de mama inflamatório, responsável por até 3% dos casos, o qual se apresenta com inchaço da mama, frequentemente sem massa ou nódulo palpáveis, podendo ser confundido com inflamação, possui uma maior chance de metástase, e, portanto, um prognóstico muito ruim. A doença de Paget é outro tumor raro, corresponde a cerca de 1% dos casos, e é caracterizada por células cancerosas no mamilo, podendo estar associada à presença de outro carcinoma mamário; já o tumor filóide é um tipo muito raro que se desenvolve no tecido conjuntivo da mama, e é normalmente benigno <sup>(20)</sup>.

O grau histológico, isto é, a diferenciação celular presente no tumor é de extrema importância a ser avaliado, pois consiste em um importante fator prognóstico da doença <sup>(21; 22)</sup>. Esse parâmetro varia de 1 a 3, sendo o 1 marcado por tecido bem diferenciado e o 3, por tecido indiferenciado <sup>(18)</sup>.

Os tumores, independentemente do local, podem apresentar receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), além de superexpressão do oncogene *HER2* (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano). Perou *et al.* <sup>(23)</sup> em um trabalho com *microarrays*, classificou os tumores em vários subtipos. Os tumores que apresentam positividade para RE e/ou RP são classificados como luminais. O subtipo luminal A é o mais incidente, com cerca de 60% dos casos, e possui o melhor prognóstico. São caracterizados por não possuírem superexpressão da proteína *HER2* e terem baixo grau histológico, e se diferem do luminal B ou pelo índice de Ki-67 (marcador de proliferação celular), que é superior a 14% no segundo tipo, ou pela superexpressão do *HER2*, fazendo com que o luminal B apresente um prognóstico pior que o luminal A.

O subtipo caracterizado pela superexpressão de *HER2* (*HER2+*) possui elevada expressão da proteína *HER2*, mas diferentemente do luminal B, não apresenta receptores hormonais expressos. Essa forma da doença tem o segundo pior prognóstico. Já os tumores triplo-negativos (TN) são tumores que não apresentam a expressão dos receptores hormonais e nem a superexpressão do oncogene *HER2*. Podem ser do tipo basalóide ou não basalóide. O subtipo basalóide detém o pior prognóstico da doença e está associado a mutações no gene *BRC1*. Morfologicamente, ele é caracterizado por alto grau histológico e por elevado índice mitótico. Diferem dos não basalóides pela expressão das citoqueratinas 5 e 6 (filamentos proteicos que formam o citoesqueleto) e

do EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) <sup>(24)</sup>. A Tabela 1 apresenta os subtipos tumorais da mama classificados segundo o perfil de imunohistoquímica.

**Tabela 1.** Classificação molecular por Imunohistoquímica dos tumores de mama.

Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 < 14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥ 14%
Superexpressão de HER2	RE+, RP+ e HER2+
Triplo-negativo basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basalóide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; Ki-67: marcador de proliferação celular; CK5: citoqueratina 5; EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico. Fonte: adaptado de Cirqueira *et al.* (21).

Dependendo do subtipo do tumor, o tratamento da paciente será diferenciado, já que para aqueles tumores que apresentam um alvo molecular, existe tratamento com drogas específicas, como a hormonioterapia, para os tumores que expressam os receptores hormonais, ou o anticorpo monoclonal anti-HER2, para os tumores que superexpressam este oncogene <sup>(25)</sup>.

### 1.1 Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento

O câncer de mama é normalmente assintomático nas fases iniciais, podendo ser identificado apenas por exames de rastreamento (mamografia e exame de toque das mamas). A mamografia deve ser feita anualmente a partir dos quarenta anos, segundo recomendações da Sociedade Brasileira de Mastologia, exceto em pacientes de alto risco, as quais devem se submeter ao exame a partir dos vinte e cinco anos <sup>(26)</sup>. Tecidos mamários muito densos podem dificultar a realização da mamografia, ou dar resultados não precisos. Para esses casos, podem ser necessários exames complementares, como a ultrassonografia, a ressonância magnética e as punções percutâneas <sup>(27)</sup>.

Quando o câncer é percebido pela própria mulher, o principal sinal é a presença de um nódulo fixo na mama, geralmente indolor. Além disso, sintomas como pele avermelhada, retraída ou com aspecto de casca de laranja, alterações no mamilo, nódulos nas axilas ou no pescoço e saída de líquido anormal das mamas são sinais de uma possível doença da mama <sup>(28)</sup>.

Ao se detectar uma anormalidade na mamografia, faz-se a biópsia do tecido, que pode ser feita via punção aspirativa de agulha fina, biópsia de agulha grossa, mamotomia ou biópsia cirúrgica. A punção aspirativa de agulha fina é principalmente utilizada para aspiração de cistos mamários; a de agulha grossa é para nódulos maiores que cinco milímetros; a mamotomia, em casos de microcalcificações; e a biópsia cirúrgica quando os outros exames são inconclusivos ou quando se tem uma área de microcalcificação muito grande, fazendo-se a ressecção por meio de cirurgia <sup>(20)</sup>.

O tratamento irá depender do tipo histológico do tumor encontrado na biópsia, dos marcadores que o mesmo expressa, de seu tamanho e das condições da paciente. De forma geral, o tratamento é subdividido entre local e sistêmico. O tratamento local inclui cirurgia (podendo ser seguida pela reconstrução mamária) e radioterapia. O tratamento sistêmico abrange a quimioterapia, bem como a administração de drogas-alvo (hormonioterapia ou anticorpo monoclonal). A cirurgia é recomendada em todos os casos de câncer, a partir do estágio TNMI, porém, para tumores muito grandes, opta-se por um tratamento quimioterápico prévio para a diminuição do tumor, chamado

neoadjuvância. Além da mastectomia, pode ser necessária a linfadenectomia axilar, que consiste na retirada de linfonodos axilares, se constatado seu comprometimento <sup>(25)</sup>.

A hormonioterapia é utilizada apenas em casos de tumores com receptores hormonais positivos e consiste na administração diária de medicamentos que inibem a atividade dos hormônios. Existem duas classes de drogas principais: os moduladores seletivos de receptores de estrogênio e os inibidores de aromatase. O tamoxifeno é a principal droga utilizada e é uma representante da primeira classe. No câncer de mama, o tamoxifeno atua como um antagonista do estrogênio, ligando-se ao seu receptor e bloqueando sua ação <sup>(29)</sup>. Os inibidores de aromatase, por sua vez, bloqueiam a enzima responsável pela conversão de precursores em estrogênio. Contudo, isso não funciona para o estrogênio produzido pelo ovário, portanto seu uso deve ser restrito às mulheres em pós-menopausa <sup>(27)</sup>.

Para os tumores HER2+, existem as terapias biológicas anti-HER2, que bloqueiam a proliferação desses tumores. O HER2 é uma proteína transmembrana que está envolvida em processos de sinalização intracelular que regulam crescimento e desenvolvimento celulares. Em células normais, seu gene possui apenas duas cópias por núcleo celular interfásico, porém em alguns tumores HER2+, este número está muito aumentado por amplificação gênica, fazendo com que a proteína seja superexpressa. O anticorpo humanizado monoclonal anti-HER2 se liga ao receptor transmembrana e bloqueia a cascata de reações intracelulares, diminuindo, assim, a proliferação celular <sup>(30)</sup>, e melhorando muito o prognóstico das pacientes que apresentam os subtipos tumorais associados a esta alteração genética.

No entanto, apesar de inicialmente responsivos à quimioterapia e à radiação, alguns tumores têm recorrência, apresentando a mesma diversidade de células que estavam presentes no tumor inicial. Isso sugere que existam células dentro do tumor inicial resistentes ao tratamento quimioterápico e à radiação. Essas células teriam propriedades de células-tronco (CT), já que são capazes de conferir ao tumor recorrente a diversidade original <sup>(31)</sup>.

## 1.2 Células-Tronco (CT)

As CT são células indiferenciadas que ocorrem naturalmente em vários tecidos, cuja função é autorrenovação e diferenciação em células do próprio tecido no qual estão presentes, para suprir sua demanda <sup>(32)</sup>.

Diferentemente de outras células, elas têm a capacidade de realizar uma divisão assimétrica: uma das células-filha dará origem a uma célula que se diferenciará enquanto que a outra continuará indiferenciada, ocupando seu lugar como CT <sup>(33)</sup>. Para manter o DNA intacto e sem erros, durante essa divisão assimétrica, é preservada a fita dupla de DNA parental (“imortal”) na célula-filha que continuará com a capacidade proliferativa, enquanto que a outra recebe a dupla fita recém-sintetizada <sup>(34)</sup>. Apesar de não ser uma regra, já foram obtidas evidências de que essa teoria proposta realmente ocorre em tecidos como o epitelial <sup>(35)</sup> e o nervoso <sup>(36)</sup>.

As CT diferem umas das outras de acordo com o tipo de tecido que podem formar: as totipotentes são capazes de dar origem a qualquer tecido do corpo humano, incluindo os anexos embrionários, e estão limitadas ao zigoto e suas primeiras divisões celulares; as pluripotentes, embora não consigam dar origem aos anexos embrionários, têm a capacidade de se diferenciar em qualquer um dos três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme). São encontradas até o período de blastocisto, mas podem ser originadas artificialmente, através de reconfiguração nuclear. As CT adultas, por sua vez, podem ser multi, bi ou unipotentes, dependendo de quantos tipos

celulares elas dão origem: vários, dois ou um tecido e são encontradas em quase todos os tecidos humanos<sup>(33)</sup>.

O microambiente no qual estão inseridas as CT adultas é muito importante: ele proporciona um local adequado para a sua divisão e previne a diferenciação. Também chamado de “nicho”, ele é composto por moléculas sinalizadoras e matriz extracelular, que, juntas, controlam seu destino<sup>(37)</sup>. A mudança do nicho pode alterar o destino das CT, como prova o estudo de Bjornson e colaboradores<sup>(38)</sup>, no qual foram injetadas CT neuronais em camundongos irradiados, as quais conseguiram, com sucesso, se transformar em células hematopoiéticas, evidenciando que o microambiente no qual estas estão presentes influencia seu destino.

As pesquisas com CT têm avançado muito nos últimos anos, devido ao seu potencial terapêutico. Mesmo em tecidos que se supunha ser totalmente diferenciado e que não se encontrava qualquer atividade mitótica, como o nervoso, foi descoberto que existem CT capazes de repopular o tecido, quando reimplantadas experimentalmente. Outra fonte interessante de CT é o tecido adiposo, já que a coleta neste tecido é menos invasiva, devido à sua acessibilidade. Descobriu-se, também, que estas células são capazes de formar condrócitos, hepatócitos, cardiomiócitos e linhagem neurogênica<sup>(39)</sup>.

O transplante de medula é, ainda, o único tipo de tratamento com CT aceito pelo Conselho Federal de Medicina e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), apesar de as pesquisas estarem em ampla expansão por mais de duas décadas. Esse consiste em transplantar CT obtidas da medula óssea (MO), do íliaco, do sangue periférico ou do cordão umbilical ou placentário para outro indivíduo que esteja sofrendo de doenças hematológicas ou para reconstituição da MO após tratamento de doença oncológica<sup>(40)</sup>.

Uma vez que o seu uso é restrito no Brasil, pessoas que sofrem de doenças para as quais ainda não existe tratamento têm viajado para países que possuem legislação mais branda para conseguir terapias celulares envolvendo CT. As clínicas que oferecem esse tipo de tratamento são facilmente localizáveis por pesquisa na internet e não existe uma lei internacional que regulamente este tipo de tratamento<sup>(41)</sup>.

A ideia de que existam CT presentes nos tumores malignos não é recente: foi proposta há mais de um século e meio<sup>(42)</sup>, mas na época, não existiam métodos que pudessem identificá-las com sucesso. A hipótese foi reconsiderada nas últimas décadas e sua existência vem sendo bem aceita dentro da comunidade científica, corroborada por estudos realizados com tumores sólidos.

### 1.3 Células-Tronco do Câncer (CTC)

Sabe-se que apenas uma pequena parcela das células presentes nos tumores malignos tem a capacidade de se propagar *in vitro*, evidenciando que o tumor apresenta diferentes tipos celulares<sup>(43)</sup>. Em 1994, Lapidot e colaboradores<sup>(44)</sup> identificaram células iniciadoras de leucemia em um estudo com camundongos NOD/SCID (diabéticos não obesos e severamente imunocomprometidos), um marco na área, o qual constituiu o primeiro tipo de célula-tronco do câncer (CTC) descoberto. Em tumores sólidos, devido ao difícil acesso, a primeira caracterização aconteceu apenas em 2003, por Al-Hajj e colaboradores, em tumores de mama<sup>(45)</sup>.

No entanto, o conceito de “célula-tronco do câncer” ainda não se encontra totalmente bem estabelecido. Alguns autores, como Wicha, Liu e Dontu<sup>(46)</sup>, acreditam que estas sejam CT normais que sofreram o processo de malignização, transformando-se nas células originárias do tumor, enquanto que outros autores como Clarke e Fuller<sup>(32)</sup> acreditam que também possam ser originárias de células que conseguiram reverter o processo de diferenciação.

Esse processo de reversão da diferenciação é dado pela transição epitélio-mesenquimal (TEM), que leva células diferenciadas a ganharem a habilidade de se tornarem imortais. A TEM envolve uma série de eventos complexos que culminam na perda do fenótipo de célula epitelial e aquisição do fenótipo mesenquimal em células tumorais. Com esse processo, elas perdem a capacidade de aderência célula-a-célula, constituindo um marcador de mau prognóstico, já que é reconhecida como um processo inicial de metástase<sup>(47)</sup>.

Independentemente da origem, as CTC possuem as mesmas propriedades: capacidade de autorrenovação e diferenciação das células presentes no tumor<sup>(32; 46)</sup>. Assim como as CT normais, aquelas do câncer também são quiescentes, estacionadas na fase G0 do ciclo celular e, portanto, não responsivas à maior parte dos tratamentos quimioterápicos, os quais se baseiam em estágios específicos do ciclo celular, o que pode influenciar em fenômenos de recorrência tumoral e metástase<sup>(46)</sup>.

Apesar de parecer contraditório pensar que as CTC são responsáveis pelo crescimento tumoral, já que estão em estado quiescente, o pensamento parece correto. Na divisão assimétrica, além de dar origem a uma nova CT, ela também dá origem a uma célula amplificadora transitória<sup>(47)</sup>. Esta célula é caracterizada por uma alta capacidade proliferativa. As células amplificadoras transitórias são a forma como um pequeno grupo de CT pode dar origem a um grande número de células diferenciadas<sup>(48)</sup>.

Como esse tipo celular parece ser diretamente responsável pelas características mais agressivas do tumor, sua existência causa uma mudança de paradigma no tratamento das neoplasias. Atualmente, ele é direcionado às células de rápida divisão, que fazem o tumor crescer em tamanho, permitindo que as células quiescentes evadam o tratamento. Porém um alvo muito interessante surge com esse modelo, uma vez que estas CTC têm características que variam dependendo do órgão/tecido que colonizam, fazendo necessária, portanto, uma caracterização mais detalhada, já que até o momento, não existe consenso sobre qual seria o melhor marcador para a sua identificação em nenhum tipo de câncer<sup>(49)</sup>.

Com a teoria das CTC, passa-se de uma noção que o tumor é um aglomerado de células de origem monoclonal, todas semelhantes, diferenciadas apenas pelas mutações subsequentes para um modelo que aceita que o tumor é, na verdade, um “órgão”, com diferentes populações celulares, incluindo um estoque de CT que seriam também responsáveis pela proliferação e pelo seu crescimento<sup>(47)</sup>. Ainda, segundo os mesmos cientistas, esse estoque representaria apenas entre 1 a 20% da população celular. Infelizmente, assim como as CT normais, aquelas do câncer não apresentam um tipo específico de marcador de superfície: ao invés disso, existem padrões de marcação, com várias proteínas de superfície<sup>(33)</sup>. Ebben *et al.*<sup>(50)</sup> resumiu os principais tipos de neoplasias e seu padrão de marcadores celulares, como se pode observar na Tabela 2. Para se obter a confirmação que se trata de uma CTC, é necessário que a célula em questão seja capaz de reproduzir o tumor inicial em um ensaio clonogênico *in vivo* (esse teste é considerado o “padrão ouro”)<sup>(47)</sup>.

Al-Hajj e colaboradores<sup>(45)</sup> separaram as células de tumores de mama utilizando citometria de fluxo com os anticorpos anti-CD44, anti-CD24 e anti-B38.1, que se encontraram diferencialmente expressos entre as populações (CD44 e CD24 são moléculas de adesão, enquanto que o B38.1 é um marcador específico para câncer de ovário e mama). Com a separação das células conforme seu perfil de marcação, os pesquisadores injetaram diferentes populações em camundongos NOD/SCID. Observou-se que apenas a população com a marcação CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-baixo</sup> teve a capacidade de formar novos tumores, com a mesma heterogeneidade de células do

tumor inicial, identificando, assim, esta linhagem, como prováveis células-tronco do câncer de mama <sup>(45)</sup>.

**Tabela 2.** Cânceres e respectivos marcadores específicos de superfície celular.

Tipo de Câncer	Marcador de superfície celular
Leucemia	CD34 <sup>+</sup> , CD38, CD19 <sup>+</sup>
Mama	CD44 <sup>+</sup> , CD24 <sup>+</sup> ; ALDH1 <sup>+</sup>
Cérebro	CD133 <sup>+</sup>
Melanoma	CD20 <sup>+</sup> ; ABCB5 <sup>+</sup>
Colorretal	CD133 <sup>+</sup> ; EpCAM <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> , CD166 <sup>+</sup> ; ALDH1 <sup>+</sup>
Pulmão	CD24 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> ; CD133 <sup>+</sup>
Sarcomas	CD105 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup> , Stro1 <sup>+</sup>
Cabeça e Pescoço	CD44 <sup>+</sup>
Fígado	CD133 <sup>+</sup> ; CD90 <sup>+</sup> , CD44 <sup>+</sup>
Pâncreas	CD44 <sup>+</sup> , CD24 <sup>+</sup> , ESA <sup>+</sup> ; CD133 <sup>+</sup>

ABC: cassete ligado a ATP; ALDH: aldeído desidrogenase; EpCAM: molécula de adesão à célula epitelial; ESA: antígeno específico epitelial; Stro: marcador estromal. Fonte: adaptado de Ebben *et al.* (50).

#### 1.4 CTC e câncer de mama

Após o primeiro trabalho de caracterização das CTC feito por Al-Hajj e colaboradores <sup>(45)</sup>, os trabalhos realizados com CTC em câncer de mama só têm aumentado. Abraham e colaboradores <sup>(51)</sup> investigaram o valor prognóstico das células com perfil CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/baixo</sup>, utilizando tecidos incluídos em parafina, com e sem recorrências. Não foi constatado um aumento dessas células na progressão da doença, assim como não foram encontradas diferenças significativas na percentagem de CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/baixo</sup> nos subtipos de câncer de mama. No entanto, houve uma maior percentagem destas células em tumores primários de pacientes que tiveram metástases, especialmente ósseas <sup>(51)</sup>.

Em 2005, Ponti *et al.* <sup>(52)</sup> conseguiram, pela primeira vez, estabelecer culturas de longa duração da linhagem CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/baixo</sup>, um marco importante, já que essas culturas servem como modelo de estudo *in vitro*. Das dezesseis linhagens inicialmente estudadas, apenas três sobreviveram a longo termo e foram capazes de originar tumores em camundongos SCID.

Morel e colaboradores <sup>(53)</sup> provaram que células epiteliais mamárias primárias têm condições de se transformar em CTC *in vitro* com a indução de oncogenes e outros genes associados ao câncer. Os pesquisadores utilizaram células com perfil CD44<sup>baixo</sup>CD24<sup>+</sup> e induziram a via do oncogene Ras, conseguindo, ao final do experimento, células com o perfil CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-/baixo</sup>. No mesmo trabalho, ainda foi provado que as células sofreram o processo de TEM, examinando marcadores epiteliais: as células apresentaram baixos níveis de vimentina e fibronectina (marcadores epiteliais), e altos níveis de E-caderina e de β-catenina (perfil mesenquimal).

Ginestier e colaboradores <sup>(54)</sup> estudaram a expressão da aldeído desidrogenase (ALDH), uma enzima que faz parte do metabolismo do ácido retinóico, e parece fazer parte do processo de diferenciação das CT. O primeiro ensaio foi realizado em tecidos mamários normais, para avaliar a presença de populações ALDH<sup>+</sup>. Essas populações foram identificadas e apresentaram características comuns às CT. O próximo passo foi a investigação de populações ALDH<sup>+</sup> em câncer de mama. Os pesquisadores concluíram

que apenas as populações ALDH<sup>+</sup> eram capazes de formar tumores, mesmo quando implantadas em baixo número.

Charafe-Jauffret *et al.* <sup>(55)</sup> estudaram a associação do perfil ALDH<sup>+</sup> na evolução de pacientes com câncer de mama inflamatório (CMI), um dos tipos mais agressivos da doença, e para o qual não há nenhum marcador prognóstico descrito. Foi encontrada uma relação entre esse perfil e o desenvolvimento de metástases e sobrevida. Com este resultado, foi sugerida a aplicação clínica desse parâmetro como fator prognóstico para o CMI.

Outro estudo relacionado às CTC no câncer de mama foi realizado por Conley e colaboradores <sup>(56)</sup>, no qual os autores constataram que fármacos anti-angiogênicos aumentaram a quantidade de CTC presentes em tumores, por hipóxia. Foi observado que as drogas retardaram o crescimento tumoral assim que atingiram um tamanho médio de três milímetros, apresentando extensas áreas de hipóxia. Utilizando coloração histoquímica, os pesquisadores puderam constatar que as células de perfil ALDH<sup>+</sup> se concentravam nas áreas de hipóxia. Este estudo ofereceu uma explicação de por que tratamentos baseados em agentes anti-angiogênicos oferecem respostas transitórias e podem induzir a recorrência da doença.

Lu e colaboradores <sup>(57)</sup> focaram seu estudo no nicho das CTC, visando a relação entre os monócitos e macrófagos associados a tumores (TAM) e as CTC do câncer de mama. Os pesquisadores encontraram a proteína CD90 (glicoproteína que interage com células adjacentes, e que medeia a adesão de monócitos) superexpressa em células epiteliais mamárias humanas forçadas a passar pela TEM. As células com perfil CD90<sup>+</sup> se mostraram com maior capacidade de formar mamosferas e produziram tumores mais agressivos e metastáticos, enquanto que as que tiveram sua expressão reduzida resultaram em tumores menores e com um início tardio. Este perfil foi comprovadamente necessário para que os monócitos se ancorassem às CTC em estudos *in vitro*, e a presença de macrófagos foi fundamental para a formação de tumores *in vivo*. O mecanismo de interação das TAM e CTC foi, então, estudado, e os pesquisadores descobriram que algumas citocinas secretadas pelas CTC eram as responsáveis pela comunicação intercelular, barrada quando se separava as células por uma membrana. Como essa combinação CTC+TAM se provou mais eficaz em criar tumores, ela deve ser estudada mais a fundo e alvos potenciais podem surgir para o desenvolvimento de novas terapias.

Chao e colaboradores <sup>(58)</sup> avaliaram a enzima histona deacetilase (HDAC) 8 e seu papel na estabilização da proteína Notch1 (associada ao processo de tumorigênese, resistência a drogas e recorrência, além de renovação de CTC). Três tipos de inibidores de HDAC foram utilizados em diferentes linhagens celulares de câncer de mama e foi constatado que houve uma diminuição da expressão do Notch1, implicando que não há uma dependência do tipo celular na regulação do Notch pelo HDAC. Estudos posteriores provaram, por *knockout* de genes, que apenas o HDAC8 (e nenhum outro gene da família) foi responsável pela diminuição de CTC e da expressão do Notch1. O silenciamento do HDAC8 *in vivo* demonstrou que esse processo diminui e atrasa a formação de tumores, sugerindo que a inibição do HDAC8 também é um alvo terapêutico interessante para diminuir a subpopulação de CTC no câncer de mama.

Um estudo recente realizado na Suécia demonstrou a importância do RE- $\beta$  (receptor de estrogênio tipo  $\beta$ ) nas CTC do câncer de mama. Enquanto que o RE- $\alpha$  positivo é ligado aos tumores luminiais, os pesquisadores não encontraram diferenças de expressão do RE- $\beta$  entre os diferentes subtipos mamários, sendo expresso em 79,2% dos tumores pesquisados. Ainda, as CTC apresentaram fenótipo RE- $\alpha$  negativo, mas, em sua grande maioria, RE- $\beta$  positivo, enquanto que linhagens diferenciadas apresentam sua expressão

diminuída. Foram produzidas linhagens celulares com o gene RE- $\beta$  silenciado e os cientistas concluíram que a formação de mamíferas teve uma redução significativa. Eles, então, testaram o efeito do E2 (17 $\beta$ -estradiol), do agonista seletivo do RE- $\beta$ , o DPN, do antagonista seletivo do RE- $\beta$ , o PHTPP e do agonista seletivo do RE- $\alpha$ , o PPT. Foi observado que tanto o DPN quanto o PPT causaram o aumento do tumor em linhagens luminais, sendo o aumento máximo conseguido pela combinação de ambos; em linhagens TN, o *knockdown* do RE- $\beta$  reduziu o volume tumoral pela metade. Outro resultado interessante do estudo foi que a combinação do E2 e PHTPP reduziu o número de células com o perfil ALDH<sup>+</sup>, além de diminuir o tamanho tumoral, fazendo com que o RE- $\beta$  seja um alvo terapêutico interessante mesmo em tumores TN que, até o momento, não possuem nenhuma terapia alvo-específica<sup>(59)</sup>.

Como pode ser observado, os estudos envolvendo CTC em câncer de mama continuam em ampla expansão. No entanto, existem, ainda, algumas questões a serem estudadas. Existem dois protocolos diferentes descritos para a caracterização das CTC: o de Al-Hajj *et al.*<sup>(45)</sup>, que identifica o perfil CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-baixo</sup> e o de Ginestier *et al.*<sup>(54)</sup>, com o perfil ALDH<sup>+</sup>. Apesar de ambos os perfis terem conseguido, com sucesso, causar tumores *in vivo*, as linhagens celulares delimitadas por eles não são as mesmas. A sobreposição dos dois perfis se dá em um pequeno número de células que se apresenta altamente tumorigênica, podendo originar um tumor a partir de apenas vinte células. O perfil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/ALDH<sup>-</sup> não se mostrou tumorigênico, e o perfil ALDH<sup>+</sup> que não apresentou o caráter CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> foi capaz de gerar tumores, mas com um número de células superior a 1.500<sup>(54)</sup>. A descoberta que os dois protocolos identificam dois tipos celulares distintos, com uma pequena sobreposição, pede uma investigação mais detalhada de qual, de fato, seria o perfil correto de uma CTC no câncer de mama.

Até o momento, não foi possível a comprovação das CTC *in situ* nas pacientes com câncer de mama. O único teste que era possível realizar era a marcação radioativa, que permitia o delineamento de CT e células progenitoras, mas que, por causa da exposição à radiação necessária, não é mais eticamente aceitável em humanos<sup>(60)</sup>. Novas terapias têm sido sugeridas para o combate ao câncer, porém se encontram em fases pré-clínicas ou clínicas. E mesmo terapias inicialmente consideradas altamente efetivas, como a anti-angiogênica ou mesmo as terapias alvo, se mostraram limitadas<sup>(56)</sup>, sugerindo que talvez a doença deva ser combatida com combinações terapêuticas, onde as CTC poderiam ter um papel relevante futuramente.

## Conclusões

O câncer de mama é uma doença que, apesar de ser extensivamente pesquisada, ainda apresenta aspectos a serem elucidados. Dentre estes, o porquê de algumas terapias específicas, como os agentes anti-angiogênicos, que são inicialmente muito efetivas, levarem à resistência, podendo dar origem a recidiva e metástase. Também que as CT ocorrem naturalmente nos diferentes tecidos humanos e que essas fornecem um bom argumento para a teoria das CTC nos diversos cânceres humanos. No câncer de mama, as CTC parecem constituir importantes mecanismos de manutenção da doença, mas seu uso ainda se encontra restrito às pesquisas, já que sua caracterização necessita de maior entendimento para uma segura aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70, 2000.
2. Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. Genética do câncer. In. *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora, pp. 261-285, 2004.
3. Weinberg RA. The nature of cancer. In. *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science, pp.31-70, 2013.
4. Organização Mundial de Saúde. *World Cancer Report*. 2014.
5. Instituto Nacional do Câncer. *Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2016a.
6. National Cancer Institute. *Breast Cancer Treatment (PDQ®)–Health Professional Version*. 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/breast/hp/breast-treatment-pdq>>. Acesso em 29 junho 2016.
7. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures*. Atlanta: American Cancer Society. 2005.
8. Jemal A, Vineis P, Bray F, Torre L, Forman D. *O Atlas do Câncer*. Atlanta: American Cancer Society, 2014.
9. Schootman M, Jeffe D, Reschke A, Aft R. The full potential of breast cancer screening use to reduce mortality has not yet been realized in the United States. *Breast Cancer Research and Treatment*, 85: 219-222, 2004.
10. Santos Junior JC, Soares LFM. Câncer de mama. In. *Oncologia Básica*. Eds., S.C. Vieira, A.M.L. Lustosa, C.N.B. Barbosa, J.M.R. Teixeira, L.X.E. Brito, L.F.M. Soares e M.A.T. Ferreira. Teresina: Fundação Quixote, pp. 40-60, 2012.
11. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasis). 2014. *Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM*. Disponível em <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>>. Acesso em 29 junho 2016.
12. O'Shaughnessy J. Extending survival with chemotherapy in metastatic breast cancer. *The Oncologist*, 10: 20-29, 2005.
13. Redig AJ, McAllister SS. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. *J Intern Med*, 274: 113-126, 2013.
14. Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
15. Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Bio Med Research International*, 2013: 1-11, 2013.

16. Hospital do Câncer A.C. Camargo. Oncogenética. Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário. 2016. Disponível em <<http://www.accamargo.org.br/especialidades/oncogenetica/38/>>. Acesso em 01 maio 2017.
17. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6: 718-730, 2009.
18. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind Ch. TNM Classification of Malignant Tumours. 2009.
19. Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48: 113-131, 2002.
20. Instituto Oncoguia. Câncer de Mama. 2014. Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/cancer-home/cancer-de-mama/20/12/>>. Acesso em: 27 abril 2017.
21. Contesso G, Mouriessse H, Friedman S, Genin J, Sarrazin D, Rouessé J. The importance of histological grade in long-term prognosis of breast cancer. A study of 1010 patients, uniformly treated, at the Institut Gustave Roussy. *J Clin Oncol*, 5: 1378-1386, 1987.
22. Elston, CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19: 403-410, 1991.
23. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
24. Cirqueira MB, Moreira MAR, Soares LR, Freitas-Júnior R. Subtipos moleculares do câncer de mama. *Femina*, 39-10: 499-503, 2011.
25. Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH. Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama. Projeto Diretrizes, 2001.
26. Sociedade Brasileira de Mastologia. Saiba Tudo Sobre o Câncer de Mama. 2016. Disponível em <[http://www.sbmastologia.com.br/index.php?option=com\\_flippingbook&view=category&layout=thumbnails&id=3&Itemid=960](http://www.sbmastologia.com.br/index.php?option=com_flippingbook&view=category&layout=thumbnails&id=3&Itemid=960)>. Acesso em: 27 abril 2017.
27. National Comprehensive Cancer Network. Cancro da Mama. Linhas de Orientação NCCN para Doentes. Lisboa: National Comprehensive Cancer Network. 2011.
28. Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Mama: O Que a Mulher Precisa Saber? 2016b.

29. Leal JHS, Cubero D, Giglio AD. Hormonioterapia paliativa em câncer de mama: aspectos práticos e revisão da literatura. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 8: 338-343, 2010.
30. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Experimental Cell Research*, 284: 54-65, 2003.
31. Eyler CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 26: 2839-2845, 2008.
32. Clarke M, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*, 124: 1111-1115, 2006.
33. Durand C, Charbord P. Stem cell concepts. In. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine V3*. Gistrup: River Publishers, pp. 3-28, 2015.
34. Cairns J. Mutation selection and the natural history of cancer. *Nature*, 225: 197-200, 1975.
35. Potten CS, Hume WJ, Reid P, Cairns J. The segregation of DNA in epithelial stem cells. *Cell*, 15: 899-906, 1978.
36. Karpowicz P, Morshead C, Kam A, Jervis E, Ramunas J, Cheng V, Kooy D. Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 170: 721-732, 2005.
37. Lin, H. The stem-cell niche theory: lessons from flies. *Nature Reviews Genetics*, 3: 931-940, 2002.
38. Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 283: 534-537, 1999.
39. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Células-Tronco, Terapias Celulares e Bancos de Células. O que é Preciso Saber*. 2016.
41. Master Z, Resnik DB. Stem-cell tourism and scientific responsibility. *European Molecular Biology Organization*, 12: 992-995, 2011.
42. Sell, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 51: 1-28, 2004.
43. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111, 2001.

44. Lapidot T, Sirard C, Vermeer J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645-648, 1994.
45. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 3983-3988, 2003.
46. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea - a paradigm shift. *Cancer Res*, 66: 1883-1890, 2006.
47. Dhingra S, Tan D. Cancer stem cells. In: *Principles of Molecular Diagnosis and Personalized Cancer Medicine*. Eds. D. Tan e H. Lynch. Wolters Kluwer, pp.14-28, 2015.
48. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed Editora. 2008.
49. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res*, 66: 9339-9344, 2006.
50. Ebben JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Suo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin. Ther. Targets*, 14: 621-632, 2010.
51. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougu M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Research*, 11: 1154-1159, 2005.
52. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 65: 5506-5511, 2005.
53. Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *Public Library of Science*, 3: 1-7, 2008.
54. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kloor CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1: 555-567, 2007.
55. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houbenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Human Cancer Biology*, 16: 45-55, 2010.

- 56 Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, Newman B, Korkaya H, Heath AN, Clouthier SG, Wicha MS. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 2784-2789, 2012.
- 57 Lu H, Clauser KR, Tam WL, Fröse J, Ye X, Eaton EN, Reinhardt F, Donnenberg VS, Bhargava R, Carr SA, Weinberg R. A breast cancer stem cell niche supported by juxtacrine signalling from monocytes and macrophages. *Nature Cell Biology*, Advance Online Publication, 2014.
- 58 Chao MW, Chu PC, Chuang HC, Shen FH, Chou CC, Hsu EC, Himmel LE, Huang HL, Tu HJ, Kulp SK, Teng CM, Chen CS. Non-epigenetic function of HDAC8 in regulating breast cancer stem cells by maintaining Notch1 protein stability. *Oncotarget*, 7: 1796-1807, 2015.
- 59 Ma R, Karthik GM, Lövrot J, Haglund F, Rosin G, Katchy A, Zhang X, Viberg L, Frisell J, Williams C, Linder S, Fredriksson I, Hartman J. Estrogen receptor  $\beta$  as a therapeutic target in breast cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst*, 109: 1-14, 2017.
- 60 Clevers H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nature Medicine*, 17: 313-319, 2011.