

6. Células madre del cáncer

AUGUSTO SILVA GONZÁLEZ

RESUMEN

Desde hace años sabemos que los tumores son masas celulares con un crecimiento anómalo, que causan la invasión y destrucción de órganos y tejidos y, si no se detienen a tiempo, causan la muerte del individuo. Sin embargo, la masa tumoral dentro de un tumor sólido o las células del cáncer que componen una leucemia son heterogéneos en cuanto a las células que lo componen. Hoy sabemos que, entre los tipos celulares que podemos encontrar dentro de un tumor, existe un pequeño grupo de células que son responsables de poder trasplantar este tumor en un ratón inmunodeprimido (ratón desnudo, *nude mice*) y formar un nuevo tumor con las mismas características que el tumor original. La gran mayoría de las células tumorales, carecen de esta propiedad y tras su trasplante, las células se pierden y el tumor nunca aparece. Estas células que son capaces de reproducir el mismo tumor en otro animal, y probablemente las mismas que son capaces de crear metástasis en otras zonas del cuerpo, son denominadas Células Madre del Cáncer (CSC). Si estas células son las responsables de inducir o de mantener el cáncer su estudio nos permitirá, no solamente conocer mejor las bases celulares y moleculares del cáncer, sino la posibilidad de abordar de una manera completa su tratamiento y curación. De estas células, de sus características y de los diferentes modelos y tipos de cáncer donde se han descubierto, trata esta revisión. Para que un cáncer se cure, es necesario y suficiente eliminar las CSC.

ABSTRACT

We have known for many years that tumors are cellular masses with an abnormal growth that cause invasion and destruction of organs and tissues, and that, if they are not stopped, lead to death of the individual. Inside the tumor mass o among leukaemia tumoral cells, however, there is heterogeneity regarding cell types. We now know that among the cell types that we can find within a tumor, it exists a small group of cells which are responsible for a new tumor growth if they are transplanted to nude mice; this tumor would have the same characteristics as the original. The majority of tumoral cells lack this property and, after a transplant, they are lost and do not produce a new tumor.

These cells that are able of reproducing the same tumor in another animal and, possibly, the cells that are able to generate a methastases in another location in the body, are denominated Cancer Stem Cells (CSC). If they are responsible of induction or maintenance of a cancer, their study will allow us not only to better know the cellular and molecular basis of cancer, but also the possibility of a more complete approach towards therapy and cure. This review presents the different types and characteristics of CSC and the models in which they have been studied. For a cancer to be cured, is necessary and sufficient to eliminate the CSC.

INTRODUCCIÓN

La hipótesis más aceptada en este momento, es que las células madre del cáncer son células que tienen unas características que podemos considerar similares a las células madre adultas específicas de tejido. Esta hipótesis, está basada en los primeros datos que apuntaban que el origen de cada tipo diferente de cáncer se debe generar entre las poblaciones de células madre específicas de cada tejido. Si consideramos algunas de las características que tienen las células tumorales estas son muy similares a las que tienen las células madre adultas (Tabla 1).

En cualquier caso hay indicios que apuntan a que la transformación en las células iniciadoras de cada tipo de cáncer, pueden estar asociadas a células muy tempranas, con una alta capacidad de autorrenovación y

CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

TABLA 1. *Características de las células madre*

Capacidad de autorrenovación	Aquella actividad que permite, tras la división celular conservar la capacidad pluripotente en una célula hija.
Replicación ilimitada	Aunque con distintas velocidades las diferentes células madre presentan divisiones durante toda la vida.
Divisiones asimétricas	División donde cada célula hija se comporta de forma diferente.
Larga vida y con diferente tipo de envejecimiento	En discusión. Ambas tienen una larga vida y por lo tanto más oportunidades de acumular nuevas mutaciones.
Sensibilidad a los fármacos	Las células madre tienen en su superficie moléculas transportadoras que eliminan muchos colorantes y evitan que se acumulen drogas tóxicas.
Marcadores celulares	Unas y otras pueden y tienen algunos marcadores propios, lo que nos podría ser de ayuda para su identificación. Huella celular.
Capacidad de diferenciación	Esta capacidad es esencial en las células madre, pero sabemos que algunos tumores pueden generar células con características de células maduras.
Capacidad clonal	La capacidad de una sola célula de replicar la colonia entera y formar un nuevo clon es una actividad compartida.

emparentadas más directamente con las células madre embrionarias que con las células madre adultas específicas de tejidos. Es sorprendente que un tumor hematopoyético o un cáncer de mama, en un individuo adulto, pueda estar relacionado con mecanismos que han ocurrido en las primeras etapas del desarrollo embrionario, pero hay datos que apuntan a que muchas de las rutas y mecanismos que operan en las etapas tempranas del desarrollo, no están completamente anulados en las células de los individuos adultos y en algunas células tumorales. Estos recientes descubrimientos están planteando muchos interrogantes sobre la biología de las células madre y su papel en la tumorigénesis.

LAS CÉLULAS MADRE DEL ADULTO ESPECÍFICAS DE TEJIDO

Pertencen a un conjunto de células que localizadas en microentornos específicos de un tejido, un nicho, permiten el mantenimiento de los tejidos. Hoy sabemos que cada tejido tiene una vida media y que al cabo de determinados años las células que constituyen un corazón, pulmón, músculo o hígado son diferentes a las células que tenían diez o quince años antes (1, 2). Esto sugiere la presencia en cada tejido de un conjunto de células, denominadas células madre adultas específicas de tejido, que sustituyen a las células envejecidas o dañadas por nuevas células capaces de cumplir todas las funciones a las que estaban destinadas (3). Este conjunto de células madre o troncales derivan de las células embrionarias que tenían la capacidad de generar a todo el resto de células madre de tejidos.

Las células embrionarias sólo son totipotentes en estadios muy tempranos de la embriogénesis, de hecho sólo hasta estadios embrionarios de 8 blastómeros podemos considerarlas totipotentes, mientras que en estadios posteriores, y sobre todo en estado de blastocisto, un grupo de células se acumulan en uno de los polos, y pierden esta condición, considerándose a esa masa de células como células pluripotentes. El acúmulo celular en el blastocisto se denomina «masa interna celular» (*inner cell mass*, ICM), y constituye el pre-embrión, generando todos los tejidos del futuro individuo a partir de las tres capas embrionarias: endodermo, ectodermo y mesodermo (Figura 1).

Así, existe un gradiente de actividad pluripotente y de actividad de autorrenovación, que se asocia con presencia en estados muy tempranos del desarrollo, y que las células van perdiendo según se van diferenciando hasta llegar a ser una célula completamente madura (Figura 2).

Lo importante es que cada una de estas células embrionarias de la ICM será la responsable de la generación de las futuras células madre específicas de tejido. Es de la ICM de donde se obtienen las líneas estables embrionarias o células ES (*embryonic stem cells*), que permiten mantener en cultivo *in vitro*, y a lo largo de muchas generaciones, células con capacidad embrionaria. Es muy importante poder obtener líneas de células ES estables, ya que estas tendrían la capacidad de convertirse en cualquier célula de un individuo adulto. El control adecuado

CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

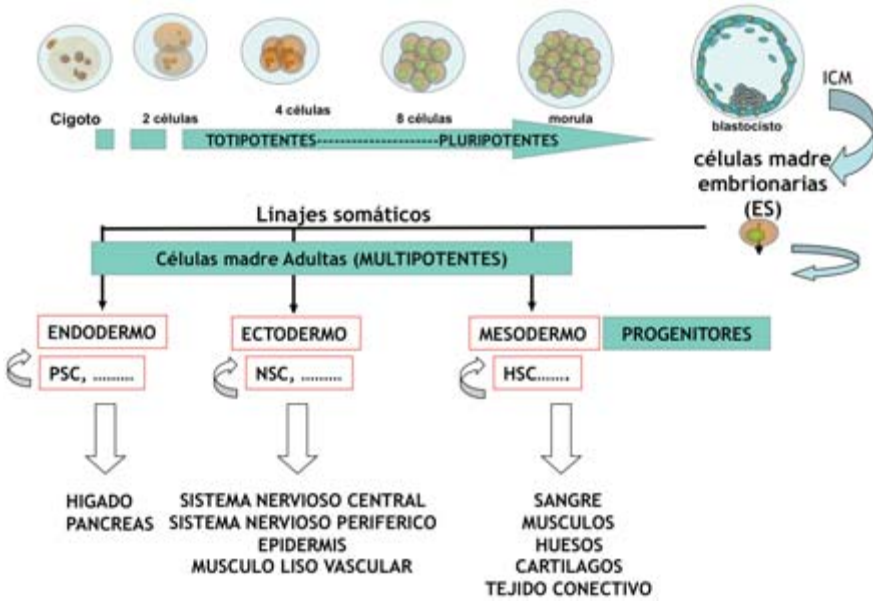


FIGURA 1. Generación de células madre embrionarias y tipos de adultas.

Células madre y otros tipos celulares

- **ES. Células madre embrionarias.**
 - Derivan de la masa celular interna (ICM)
 - Son **pluripotentes** (capaces de generar un nuevo embrión)
- **Células madre embrionarias "comprometidas"**
 - Derivadas de las diferentes capas embrionarias
 - **Multipotentes** (específicas de capa)
- **Células madre adultas**
 - Específicas de tejido
 - Tienen una localización (nicho) particular
 - **Multipotentes** (específicas de tejido)
- **Progenitores multipotentes (MMP)**
- **Células diferenciadas y maduras**

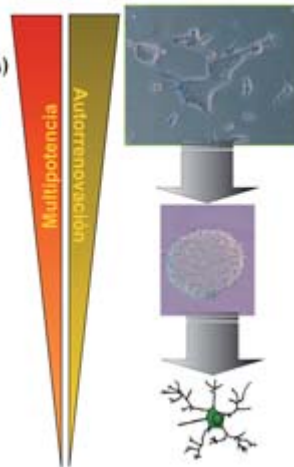


FIGURA 2. Características de las células madre embrionarias, adultas y de los progenitores.

de la correcta diferenciación de estas células ES hacia células específicas de tejido, o sus células diferenciadas, generaría una fuente ilimitada de las células de cada tejido, que podrían ser utilizadas en futuras aproximaciones en medicina regenerativa.

Sin embargo, la situación hoy dista mucho de estar controlada y así las líneas celulares embrionarias ES que se han derivado, cuando se trasplantan *in vivo*, en animales de experimentación, generan con alta frecuencia masas celulares indiferenciadas —teratomas— que, en algunos casos, tienen una alta capacidad metastática, produciendo los teratocarcinomas. En seres humanos, se han utilizado inicialmente algunas de estas células (hES), con no muy buenos resultados, y de momento, solo se usan con fines de investigación. Los mecanismos de cómo se generan estas masas tumorales a partir de las células ES no están aún bien definidos, pero esta situación nos ha puesto en guardia sobre la capacidad de generar tumores de muchas de las células que consideramos células madre.

La principal causa de lo anterior es que toda célula con características de «madre» tiene al menos dos rasgos que la distinguen del resto de las otras células: estas células nunca pierden su capacidad de mantenerse como célula madre a lo largo de toda la vida del organismo (concepto que definiremos como *autorrenovación*), y la segunda es su capacidad de generar células diferenciadas y, en sus etapas finales, células maduras completamente funcionales. Esta actividad la logran al poder sufrir una división de tipo asimétrica, donde una célula da lugar en su proceso de división a dos células hijas diferentes, una que mantiene una total capacidad de mantenerse como célula madre, y otra que se convierte en un progenitor con menor actividad de autorrenovarse, y que será de la que derive la célula diferenciada propia de los tejidos (Figura 3).

Lo cierto es que el número de células madre específicas de tejido es muy bajo, y en la gran mayoría de los tejidos aún desconocemos cuales son los posibles marcadores que nos permitan obtener la información necesaria para su identificación y localización.

La identificación y selección de estas células madre de cada tejido, nos permitiría, no solo conocer mejor su biología y estudiar como son capaces de llevar a cabo estas divisiones asimétricas a lo largo de toda la vida del organismo, sino usarlas en modelos de reparación tisular en zo-

CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

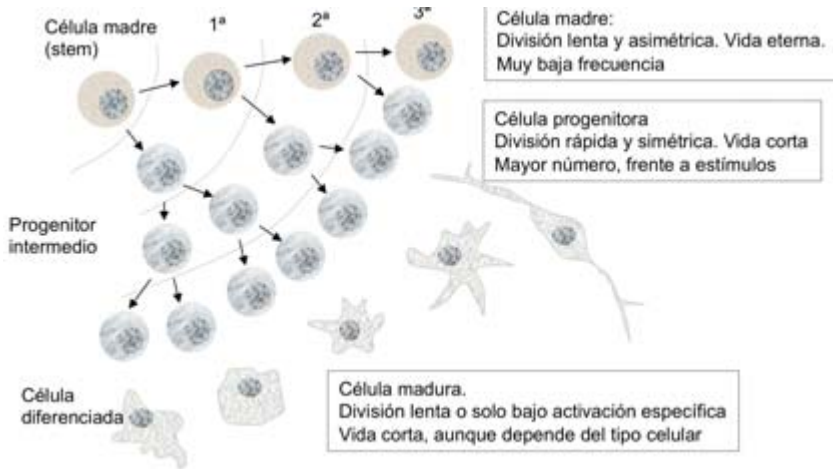


FIGURA 3. Diferencias entre célula madre, progenitoras y células diferenciadas.

nas dañadas de tejidos, y probablemente diferenciarlas hacia algunos de los linajes de células que deberán ser sustituidas.

Aunque es verdad que desconocemos un método selectivo para poder identificar y seleccionar la célula origen de muchos tejidos, cada día nuevos artículos científicos nos aproximan a subpoblaciones celulares de organismos adultos que identifican poblaciones capaces de generar modelos *in vitro* de diferenciación celular, y que nos permiten obtener células funcionalmente activas, y con características de células madre muy similares a las encontradas en un tejido. El trasplante de estas poblaciones, sin embargo, no siempre funciona *in vivo*.

LAS CÉLULAS MADRE TEJIDO ESPECIFICAS Y EL CÁNCER

¿Por qué es tan importante conocer estas células madre específicas de tejido y qué relación tienen con el cáncer? La respuesta es sencilla, pensamos que el cáncer proviene de estas células.

Desde hace años sabemos que muchos tratamientos frente al cáncer no generan una respuesta de eliminación total de las células malignas y, por lo tanto, no conllevan su curación. En muchas ocasiones, un pequeño grupo de células resiste el envite de los tratamientos de quimioterapia y radioterapia y logra *escapar*. Estas células residuales se comportan

como células activas tumorales, aunque a veces de bajo índice mitótico, es decir crecen lentamente, por lo que la mayoría de los fármacos antitumorales clásicos les afectan en menor grado. Eso nos dice varias cosas importantes, 1) que los tumores son masas celulares heterogéneas, constituidos por diferentes tipos celulares y con diferente grado de diferenciación, b) que las células más resistentes a los fármacos antitumorales son, en general, una porción menor dentro de un tumor, y 3) que estas células tienen características similares a las células madre adultas del tejido correspondiente.

Actualmente se han podido identificar distintos tipos de células presentes en distintos tipos de cánceres y que se señalan como posibles células CSCs en leucemias (4-6), cáncer de mama (7-10), de cerebro (11-14), cánceres colo-rectales (15-17), cáncer de cabeza y cuello (18, 19), cáncer de páncreas (20) o de próstata (21-24). Los estudios de estas células nos enseñan la validez de esta nueva hipótesis del cáncer, y sus posibles implicaciones en el tratamiento de estas enfermedades.

EL MODELO HEMATOPOYÉTICO

Uno de los problemas principales en la investigación del cáncer es que desconocemos como se inicia, y si este inicio comienza, como parece, en una única o en un grupo limitado de células, el primer paso que deberíamos de dar sería tratar de identificar esas células capaces de iniciar o de mantener un tumor. Hoy la hipótesis de la presencia de las CSC, se basa principalmente en nuestro conocimiento del sistema hematopoyético (25).

En los años 1950 y 1960, se empezaron a dar los primeros pasos que llevaron a descubrir que todas las células de la sangre provenían de un único tipo celular, que de forma jerárquica daba lugar a células precursoras sanguíneas, las cuales, a su vez, generaban los componentes celulares de la sangre. Se vio que estas células madre hematopoyéticas, HSC, son células de vida muy larga, sin casi división celular (quiescentes) y pluripotentes, al poder generar muchos diferentes tipos celulares, y capaces de autorrenovarse a lo largo de la vida del individuo. Este modelo ha sido el que se ha seguido para buscar células madre específicas en otros tejidos, pero la situación es, como veremos, mucho más

TABLA 2

- Mutaciones en células madre hematopoyéticas (CD34⁺/CD38) originan algunos tipos de **Leucemia Mieloide Aguda**. Una pequeña población de células progenitoras CD138⁻ inducen AML tras su inyección en ratones desnudos NOD/SCID.
- **El cáncer de mama humano** puede ser trasferido a un ratón desnudo NOD/SCID con menos de 100 células del cáncer con marcadores CD44⁺CD24^{-low}Lin⁻. El tumor que generan en los ratones es de características similares al tumor de mama original.
- Menos de un 1% de las células de **tumores cerebrales** pediátricos son capaces de formar neuroesferas (CD133⁺) de forma clonal.
- **Las células CSC** que inician tumores de **páncreas humanos** son CD44⁺, CD24⁺, ESA⁺. Pueden formar tumores en ratones NOD/SCID que son histológicamente indistinguibles de los tumores humanos de los que provienen.
- La células CSC del **cáncer colorrectal** humano se han identificado con los marcadores ESA⁺, CD44⁺, CD166⁺.
- **El antígeno de CSC de Próstata** (PSCA), es un homólogo de los antígenos de superficie de la familia Ly-6/Thy-1, específico de las células madre de la próstata, y esta sobre-expresado en muchas células de carcinoma de próstata (human carcinoma transitional cells, TCC)

compleja (26-29). El diseño de un modelo jerárquico permite, no obstante, una alta producción de células sanguíneas sin un agotamiento de las reservas del *pool* de células madre mas pluripotentes (30). Además, y más importante, esto genera una cierta protección del riesgo de que se produzcan cambios genéticos que conduzcan a leucemias y otras patologías hematopoyéticas: como las mutaciones están directamente relacionadas con la división celular, éstas se producirán con más frecuencia en las células progenitoras que presentan una alta tasa de división celular, pero una menor vida media, que en las células madre hematopoyéticas que tiene baja tasa de proliferación, aún con una larga vida. Si consideramos que muchos cánceres son el resultado de la acumulación de más de una mutación, una vida corta siempre favorecerá que las células no tengan tiempo para acumular mutaciones y, por lo tanto, para transformarse en una célula tumoral.

Los estudios sobre enfermedades hematológicas, en particular la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia mieloide aguda (LMA), han servido de modelos donde se detectaron por primera vez las células CSC (ver capítulo 2).

La LMA es una enfermedad clonal debido a una hematopoyesis aberrante y caracterizada por la acumulación de células blásticas inmaduras que no se diferencian normalmente. A pesar de su homogeneidad morfológica, las células blásticas son biológicamente heterogéneas (31-34); sólo una pequeña proporción de células muy proliferativas de blastos leucémicos (AML-CFU) son capaces de generar colonias *in vitro*. Para explicar la heterogeneidad de las células observadas en la LMA se piensa que, dentro de un tumor, las células cancerosas tienen distinta capacidad de generar un nuevo tumor y ellas y solo ellas, y no de forma aleatoria, son las únicas capaces de iniciar un cáncer.

Debemos mencionar que el concepto de CSC es doble: por un lado podemos referirnos al grupo de células que son las células iniciadoras de un cáncer o al grupo de células responsables del mantenimiento y crecimiento del cáncer. No siempre sabemos si ambas poblaciones son idénticas, o si la CSC responsable de perpetuar el cáncer comprende a las células responsables del inicio de ese cáncer.

Lo que sí sabemos es que en las LMA, un grupo de células madre leucémicas, tienen un inmunofenotipo similar al de las células HSC normales. Ambas son CD34+ y CD38-, y ambas tienen la maquinaria de autorrenovación que las hace capaces de mantenerse largo tiempo conservando la capacidad de diferenciarse a distintos fenotipos. Algunos de los genes implicados en el desarrollo normal del sistema hematopoyético y de las células leucémicas son comunes y necesarios para ambos fenómenos, como es el caso del gen Bmi-1. De hecho, hoy sabemos que al igual que pasa con los progenitores hematopoyéticos normales, los progenitores de las leucemias son también quiescentes, o mantienen una baja capacidad de proliferación (35-39).

Por otro lado, sería de una enorme utilidad conocer cual es el origen de las células que inician esta LMA. Los primeros datos apuntan a que la transformación celular de las células normales, ocurre en las células madre, más que en progenitores comprometidos con un determinado linaje. Esta hipótesis propone que el fenotipo de los blastos leucémicos está influido por la propia naturaleza de la transformación celular.

Sin embargo los programas genéticos que activan la autorrenovación de las células CSC en las LMA, no son aún conocidos y, dado que

representan el vértice de la pirámide de donde derivarán y se mantendrán este tipo de leucemias, sería deseable buscar el origen molecular de los cambios, y analizar los genes, los programas transcripcionales y las rutas moleculares en donde actúan. Sabemos que, en un modelo de ratón de la leucemia humana LMA, las modificaciones tempranas de las células HSC se disparan por translocaciones cromosómicas del oncogén MLL, que ocurre entre un 10-20% de LMA. La translocación del oncogén MLL, provoca a su vez cambios en las rutas transcripcionales de grupos de genes como Myb/Hmgb3/ y Cbx5, que son capaces de inducir la inmortalización celular independiente del complejo Hoxa/Meis (40-48). Este complejo regula genes que están directamente involucrados en los procesos de empaquetamiento de la cromatina en las células madre embrionarias y no en las células madre adultas (40-44).

CÉLULAS MADRE DE TUMORES CEREBRALES

La identificación de células progenitoras del cáncer fue definido por primera vez, en tumores sólidos, con tumores cerebrales. Usando un modelo de generación de astrocitomas muy agresivos, denominados astrocitomas tipo IV o glioblastomas multiformes, fue posible identificar subpoblaciones celulares concretas dentro del tumor, que eran capaces de transmitir este tumor cuando a nivel clonal se trasplantaban en el cerebro de ratones inmunodeficientes. Esta situación que hoy denominamos células madre de cáncer de cerebro, creó en el momento de su descubrimiento no pocas dudas sobre su existencia y sobre su capacidad de ser la únicas responsables de la generación de este tipo de tumores.

Los tumores neurológicos, incluyen todos aquellos neoplasmas que derivan tanto del sistema nervioso central (SNC) como del periférico (SNP) y, en general, se clasifican por criterios morfológicos e inmunohistoquímicos. Como las neuronas del individuo adulto están prácticamente detenidas —postmitóticas—, no es sorprendente que la mayoría de los tumores cerebrales sean de origen glial. Estos tumores llamados gliomas incluyen aquellos en los predominan los astrocitos (astrocitomas), oligodendrocitos (oligodendriomas) o sus mezclas como los oligoastrocitomas, o células del epéndimo de los ventrículos (ependimomas). Estos tumores son los principales del sistema nervioso central,

mientras que en el sistema nervioso periférico, los neurofibromas o los Schwannomas son los más frecuentes (49-52). La aportación de los tumores cerebrales ha sido decisiva a la hora de aceptar la existencia de las CSC, porque fueron las primeras que se definieron (53, 54), y porque el avance en la identificación y seguimiento de estos tumores ha permitido su localización en nichos cerca de los tejidos neovasculares formados con el crecimiento del tumor (11).

Los primeros estudios del grupo de Dirks *et al.* (53, 54), permitieron identificar una población celular presente en determinado tipo de astrocitomas agresivos (tipo IV, o glioblastomas multiformes, GBM), y que reunía las condiciones que luego se definieron para una célula CSC. Así, constituían una pequeña fracción del tumor y su trasplante en un ratón inducía un GBM de iguales características al original. La posibilidad de identificación nace al obtener un anticuerpo monoclonal que reconocía un antígeno de superficie de las células madre neurales denominado CD133 (55). Células CD133+ fueron localizadas en el GBM y se encontró que era la fracción CD133+ la que mejor inducía nuevos tumores cerebrales, tras su trasplante en nuevos ratones, al compararla con la fracción CD133- (54).

La identificación de células CD133+/nestina+ (otro marcador de célula madre neural temprana), permitió descubrir la proximidad de estas células cerca de los capilares nuevos que se forman con el crecimiento del tumor (11). De hecho, la presencia de las células endoteliales de los neo-vasos tiene un efecto sobre la actividad de autorrenovación, y en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células tumorales cerebrales. La participación del endotelio vascular en el mantenimiento de las CSC, ha permitido crear una nueva estrategia antitumoral para tumores cerebrales, que se basa en terapias anti-angiogénicas, las cuales retrasan o reducen la capacidad de generar nuevos epitelios vasculares. Tratamientos con la nueva droga Tarceva (Erlotinib), un agente selectivo que inhibe el receptor de EGF y de la tirosina kinasa del oncogen ERBB2 (56), o Avastin (Bevacizumab), un inhibidor específico de VEGF, tienen un gran impacto sobre el desarrollo de los glioblastomas multiformes más agresivos, y podrían tener un potente efecto antitumoral (este tratamiento será aprobado por la FDA en el año 2009).

CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE MAMA

A diferencia de otros tejidos y órganos que son estructurados durante la embriogénesis, y que preservan su arquitectura durante toda la vida del organismo, la glándula mamaria tiene una serie de cambios en su morfología durante distintas etapas del desarrollo. En humanos, el epitelio mamario consiste en un intrincado entramado de ductos que se forman después del nacimiento y a través del lecho de grasa de la mama. Estos ductos los forman una membrana basal, contráctil, de células mioepiteliales y una capa de células tipo-epiteliales denominada capa luminal (57). Durante la pubertad, y a través de los estímulos hormonales, los ductos proliferan rápidamente, generando nuevas ramificaciones y aumentando de tamaño y densidad. El proceso final de la diferenciación es en el momento del embarazo y de la lactancia, cuando se crean y crecen las estructuras lobulo-acinares, que contienen las células alveolares productoras de leche (58). Tras la lactancia, y cuando se reduce la demanda de leche materna, el tejido mamario sufre una apoptosis masiva y una importante remodelación tisular, volviendo la mama a la forma de antes del embarazo. Esta situación nos permite un análisis detallado de la presencia y localización de las células madre del tejido mamario, su papel durante los distintos procesos de crecimiento y proliferación del tejido y su actividad tras los cambios hormonales.

Las hormonas que regulan este proceso son los estrógenos y la progesterona (59). Algunos tumores mamarios cursan con la expresión de receptores de estrógenos (ER+), y ello tiene enorme importancia en la prognosis del tumor, al ser los tumores mamarios ER+ menos agresivos y mejor tratables que los tumores ER-, más agresivos (60). De hecho, uno de los primeros tratamientos frente a los tumores ER+ es la terapia hormonal, así como el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a estos receptores, y que permite la rápida eliminación de las células ER+. Aún no sabemos por qué se generan tumores ER+ y ER- pero su identificación tiene importantes repercusiones diagnósticas y pronósticas en los futuros tratamientos a aplicar.

¿Cómo se relaciona la presencia de los receptores ER con la carcinogénesis mamaria? Recientemente, distintos grupos han aportado importantes evidencias de que las células madre del cáncer mamario están localizadas y son similares a las células madre de tejido mamario (7, 10,

61, 62). Usando marcadores celulares del tejido mamario y separando las celulares mediante citometría de flujo, es posible identificar a la célula madre tumoral mamaria como células CD44+, CD24- Linaje- (no linfocitos T o B). Sólo un pequeño porcentaje (< 2%) de las células de un tumor mamario tiene este fenotipo y sólo estas células son capaces de transferir el cáncer mamario en un ratón NOD/SCID (63). Las células con receptores para estrógenos ER+, que hasta ahora se habían asociado con células quiescentes, están más asociadas a células con una baja tasa proliferativa, algo que ya podemos asociar a células más primitivas y más indiferenciadas. Estas células ER+ se asocian a poblaciones *side population* (SP) que, como habíamos mencionado, están más próximas a células progenitoras mamarias (64, 65). El hecho de que estas células ER+ puedan formar parte del *pool* de células madre de mama, podría sugerir que los estrógenos pueden influir en el establecimiento de compartimentos celulares durante el desarrollo.

Aunque no hay una imagen clara de cómo se desarrollan los tumores mamarios y el papel del receptor de estrógeno ER, los tumores ER-, que se denominan de tipo 1, derivan de células muy primitivas o progenitores tempranos. Son tumores muy indiferenciados, que presentan marcadores de la zona basal y luminal, agresivos y de mal pronóstico. Un segundo tipo de tumores mamarios, denominados tipo 2, son más heterogéneos en la expresión de ER, su grado de diferenciación es menor y tienen un pronóstico intermedio. Mientras que los tumores ER+ o de tipo 3, tienen células más diferenciadas, están más asociados a células progenitoras con un cierto grado de proliferación (66).

En conclusión, en el modelo de tumores mamarios, la presencia de células madre tempranas, ligadas a la generación de todos los tipos de células que constituyen la glándula mamaria, puede estar directamente relacionada con la generación de tumores altamente agresivos; aunque también detectamos tumores con células más diferenciadas, que presentan mejor pronóstico y con receptores de estrógenos.

CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE PÁNCREAS E HÍGADO

El adenocarcinoma pancreático es una enfermedad altamente letal, que se suele diagnosticar en estadios muy avanzados de la enfermedad y

para la cual no hay ninguna terapia efectiva. Tiene el peor pronóstico de entre las principales enfermedades, con una media de 3 años de supervivencia, siendo la cuarta causa de muerte por cáncer y con una incidencia anual de más de 30,000 muertos anuales sólo en EEUU (67).

A pesar de los avances médicos en cirugía y nuevas terapias, poco se ha avanzado en su tratamiento. Una de las peculiaridades de esta enfermedad es su rápida invasividad local y su temprana diseminación sistémica, lo que causan su alta mortalidad. A pesar de los esfuerzos en comprender las bases moleculares y las características del cáncer de páncreas, los resultados han sido hasta ahora muy pobres. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han considerado la hipótesis de las CSC y, sobre todo, no han reparado en la enorme heterogeneidad de las células que componen este tipo de tumores. De nuevo, como en otro tipo de cánceres humanos, se ha comprobado que sólo transmiten este tipo de tumores a un ratón inmunodeprimido un reducido grupo de células del tumor, lo que pone de relieve la existencia de células CSC en los tumores pancreáticos. Recientemente, se ha descubierto la existencia de estas células madre del cáncer de páncreas, usando modelos de xenotrasplante en ratones NOD/SCID, identificadas como una pequeña subpoblación tumoral con los marcadores CD44+, CD24+ ESA+ (68, 69). Las CSC de páncreas tienen una alta tasa de autorrenovación, la capacidad de producir distintos tipos celulares que componen el páncreas y una alta expresión de la molécula de señalización del desarrollo Sonic Hedghog (SHH) (70). La mayoría de los datos que apoyan el potencial tumorigénico de estas CSC pancreáticas derivan de la formación de tumores *de novo*, tras el trasplante subcutáneo de estas poblaciones, un nicho que no es probablemente el mejor microentorno celular para el desarrollo de estos tumores pero que ponen de relieve el enorme potencial tumorigénico de estas poblaciones celulares. Así, sólo 100 células CD44+, CD24+, ESA+, que representan menos del 1% (entre 0,2-0,8%) de la masa tumoral pancreática, producen tras su trasplante subcutáneo, un 50% de éxito en ratones NOD/SCID. De hecho, el número de tumores que se obtienen de la inyección de estas células es superior en trasplantes subcutáneos que cuando se inyectaban directamente en el páncreas del ratón NOD/SCID. Las CSC pancreáticas tienen sobre-regulados genes importantes de mantenimiento de su actividad autorrenovadora, incluyendo SHH y Bmi-1 (69).

El páncreas y el hígado derivan de una misma población de células pluripotentes del endodermo, y comparten muchos aspectos en su desarrollo temprano. Aunque cada uno de estos tejidos se origina de dominios espaciales múltiples, y bajo la influencia de genes y rutas bioquímicas diferentes, lo cierto es que los progenitores hepáticos y pancreáticos pueden revertir su curso de diferenciación y convertirse en progenitores intestinales.

De nuevo, es posible encontrar subpoblaciones específicas en algunos tumores hepáticos, principalmente asociados a carcinomas hepáticos HCC (hepatocarcinomas), aunque en estas poblaciones se detecta la importancia de las rutas de la Wnt/beta-catenina en la activación y expansión de células ovas. Así, las células tumorales del HCC son OV6(+) y representan una subpoblación que confiere una alta quimioresistencia, un condición que también es típica de las CSCs de otros tumores humanos (71).

CÁNCER INTESTINAL Y CÉLULAS MADRE INTESTINALES

La localización y la identificación de las células madre del intestino han sido controvertidas, debido a la falta de marcadores específicos y modelos de estudio que nos pudieran mostrar las propiedades de estas células. Recientemente, distintos grupos han identificado estas células tanto en estómago como intestino delgado y en las criptas del colon (72). Las células madre intestinales se pueden reconocer por la expresión de Lgr5, un gen diana de Wnt que codifica una proteína G de un «receptor huérfano» (*orphan receptor*) y Bm1, un miembro de la familia *polycomb*, asociados a la remodelación de la cromatina (73). Las células madre intestinales Lgr5+ Bm1+, tienen actividad multipotente, división lenta (una división por día) y son capaces de generar el epitelio intestinal durante más de un año (74-77). La identificación de Lgr5 en otras poblaciones de células madre asociadas a la activación de la ruta Wnt, nos indica que este gen podría ser un buen marcador de las células madre vinculadas con esta ruta bioquímica. La ruta Wnt es importante a la hora de comprender la posible presencia de células tumorales en el cáncer de colon, donde la activación de la ruta induce una masiva proliferación de progenitores de la cripta intestinal, y el disparo del cáncer de colon. De hecho, la mayoría de los canceres colorrectales se inician

por mutaciones en el gen supresor *Apc*, actor muy importante de la ruta Wnt, que cambia el estado activado de forma constitutiva. También *Lgr5* está asociado a la ruta Wnt y a la tumorigénesis. Además, sabemos que esta subpoblación de células progenitoras intestinales es necesaria para iniciar el cáncer colorrectal. De nuevo, la presencia de las células iniciadoras del cáncer está directamente asociada a la modificación directa de las células madre intestinales (78-80).

CÉLULAS MADRE DE CÁNCER DE PIEL

Las células madre epidérmicas han sido caracterizadas como células de baja actividad proliferativa, de larga vida, que residen en sitios discretos de la piel. La situación es algo más compleja en la piel (y desconocemos si esto se puede trasladar a otros tejidos) al descubrir que la epidermis interfolicular, los folículos del pelo y las glándulas sebáceas de la piel, tienen sus propias e independientes células madre epidérmicas (81). Además existen otras células madre especializadas en envoltura y papila dérmica y un tercer tipo de células madre correspondientes a la cresta neural epidérmica (ver capítulo 8). Todos estos tipos de células madre utilizan, sin embargo, rutas bioquímicas similares donde Notch, Wnt/B catenina; c-myc y Hedgehog se combinan para mantener la homeostasis de la piel (82). Hoy sabemos que los carcinomas de células escamosas (SCCs) derivan de una pequeña población de CSC (83).

Esta población de células CSC de los tumores SCC, expresan marcadores característicos de las células madre epidérmicas normales, como son el marcador MCSP y el FREM4D, pero carecen de otros que también están presentes en las células madre de piel, «durmientes» o de «proliferación lenta», como *Lrig1* y *MAP4*, probablemente porque en las células CSCs de piel, éstas pierden el carácter quiescente al ser células proliferativas (84, 85).

En modelos experimentales de cáncer de piel en ratones, e inducidos mediante tratamientos con agentes que mutan el gen *ras*, como la 7,12, dimetil-bencil-antraceno (DMBA), se han identificado poblaciones de células madre del cáncer que tiene marcadores CD34+ (alto); y otros marcadores de las células madre del *bulge* (protuberancia) como *EfrinaA4*, *Sox9*, *Runx1*, *Tcf3*, y *tenascina-C* (86, 87). También identifica-

mos unos altos niveles de la integrina $\alpha 6 \beta 4$, cuya presencia en tumores de piel se relaciona con un peor pronóstico. La aparición de la $\alpha 6 \beta 4$, parece que es dependiente de las distintas mutaciones de oncogenes que se acumulan en estos tipos de tumores (88).

De nuevo, comprobamos que las células que podemos asociar con aquellas que inician el cáncer de piel, tienen marcadores en la superficie, similares a los que esperaríamos de una célula madre normal.

En la búsqueda de células madre del cáncer de piel, se ha recurrido a la identificación y localización de células denominadas «side population» (SP), que corresponden a fracciones minoritarias de células precursoras que están presentes en muchos tejidos. Las células SP se caracterizan por su capacidad de bombear y eliminar algunos colorantes vitales, como el Hoechst 33342 o la rodamina 123, que tiñen las células vivas sin causarles daño. Las células SP, tienen en la superficie potentes complejos, que se denominan «transportadores ABC», y que les permite no quedarse teñidas con estos colorantes. Así, en condiciones en las que podemos teñir una población disgregada de un tejido, las células que se asocian a las células progenitoras del tejido, no resultan teñidas con el colorante Hoechst 33342 y, por lo tanto, se pueden seleccionar mediante citometría de flujo (89).

La localización de las subpoblaciones SP, tanto en epidermis normal como tumoral, ha creado una cierta confusión. Las poblaciones SP de queratinocitos pueden presentar una gran capacidad de proliferación *in vitro* y son capaces de formar más eficientemente epitelios estratificados que las poblaciones no-SP, en poblaciones humanas definidas por los marcadores $\alpha 6$ y CD71 (90). Sin embargo, las células SCC sólo presentaban el marcador epidermoide CSPG4/MCSP y no se encontraron cambios en la expresión de la integrina $\beta 1$ o la queratina 1 (ker-1); pero mostraban mayor capacidad tumorigénica en modelos de trasplantes subcutáneos, lo que de nuevo sugería que la población SP de la SCC tenían características de CSC (91).

CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER EN OTROS TUMORES

Cada vez hay más evidencias que sugieren que este tipo de células, minoritarias dentro del tejido, pueden estar asociadas a la carcinogénesis

de un órgano determinado. Hasta ahora hemos mencionado algunos datos sobre tumores hematopoyéticos, de cerebro, páncreas o hígado, de tejido mamario o de piel. Pero seguramente esto no es todo, y ya sabemos que hay otros tumores, como el cáncer de próstata, o algunos cánceres de pulmón, donde también ha sido posible seleccionar las células iniciadoras del tumor dentro de la masa tumoral, lo cual, a) confirma que la mayoría (si no todos) los tumores son heterogéneos, y b) que sólo una pequeña parte de la masa del tumor mantiene una alta capacidad pluripotente y con capacidad de reproducir, expandir y, posiblemente, mantener el tumor.

Lo importante de toda esta información es que, después de muchos años, estamos ahora más capacitados para tratar de eliminar definitivamente un cáncer, siempre que adecuemos nuestro pronóstico y su terapia reconociendo la existencia de este tipo minoritario, pero relevante, de células CSC.

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER POR LA PRESENCIA DE CÉLULAS MADRE DEL CÁNCER

La existencia de un grupo de células, dentro de un tumor, con características diferentes del resto de la masa tumoral, y responsables del inicio o del mantenimiento del cáncer, nos obliga a considerar estas células como las primeras dianas a las que habría que dirigir nuestro arsenal terapéutico.

De hecho, las actuales estrategias en terapias antitumorales no tienen en cuenta la distinta sensibilidad a drogas o la posible expresión de receptores específicos, de estas CSC al compararlas con la mayoría de las células de la masa tumoral. Hoy tenemos suficiente información para comenzar a diseñar nuevas moléculas innovadoras dirigidas específicamente frente a estas subpoblaciones celulares.

Tradicionalmente, los tratamientos antitumorales se basan en el ataque masivo y no discriminado frente a las poblaciones celulares con un alto grado proliferativo, donde los efectos primarios se traducen en la detección de una fuerte bajada de la masa tumoral, pero que en la gran mayoría de los casos es insuficiente para garantizar la completa remisión del tumor o la curación. Estas drogas genotóxicas, en general re-

ducen de una forma significativa la masa tumoral pero, en muchas ocasiones, dejan al descubierto el ataque frente a las células CSCs. Sin embargo, sabemos que las poblaciones tumorales tumorigénicas y no-tumorigénicas tienen una diferente sensibilidad a muchas drogas genotóxicas (92, 93); las células CD34+ y CD38- son significativamente menos sensibles a danorubicina (93) o citarabina (94).

Este nuevo modelo de cáncer cambiará nuestro concepto de resistencia a drogas y nos permitirá descubrir nuevos mecanismos de esta resistencia. Hoy día conocemos el importante papel que juegan en estas células algunas moléculas transportadores de la superficie celular, miembros de la familia de transportadores ABC, que sabemos están diferencialmente expresados en las CSC, y que tienen la peculiaridad de literalmente «escupir» las drogas tóxicas que llegan a las células relativizando su daño. Es el caso de las LMA, donde transportadores ABC reducen el efecto de la mitoxantrona o la danorubicina, dos agentes muy empleados en el tratamiento de esta enfermedad. Este mismo caso lo encontramos con el uso de Gleevec en el tratamiento de la LMC, cuyo efecto no elimina completamente las células con el transcrito BCR/ABL, responsable en gran medida de esta enfermedad.

Un segundo aspecto a considerar bajo esta visión de la presencia de las células CSC, es la posibilidad de un nuevo diagnóstico del cáncer y, sobre todo, de su posible capacidad metastática. La identificación de las células CSC y de sus posibles marcadores específicos podría determinar un diagnóstico más temprano de la enfermedad y su capacidad real de ser susceptible de generar metástasis. La presencia de células residuales después de un tratamiento estándar con drogas antitumorales, sería más que deseable y nos permitiría conocer el auténtico efecto del tratamiento. La identificación de las células CSC, constituye por ello una pieza clave en la investigación del cáncer, tanto para mejorar la eficacia de los tratamientos como para garantizar una acción selectiva sobre las células y, por ello, la completa eliminación del tumor y la curación.

CONCLUSIONES

El cáncer es una anomalía de las células madre, embrionarias o adultas, y el estudio de éstas es esencial en la búsqueda de tratamientos

para curar la enfermedad. Muchos investigadores pensamos que los tumores derivan de células madre tumorales que se parecen a las células madre tejido- específicas, y quizá utilizan rutas similares a las que presentan las células madre embrionarias.

Sin embargo, aunque admitamos la existencia de células madre iniciadores de un tumor, o quizás células madre de tumor, que mantienen la proliferación de este tumor, aún somos incapaces de explicar claramente el proceso de desarrollo tumoral. El paso de células madre tumorales hacia poblaciones heterogéneas no está en absoluto claro. Podríamos quizá asociarlo a cambios como los encontrados durante el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*), un paso que pueden dar las células varias veces antes de acabar de convertirse en células diferenciadas y funcionales. Existen múltiples factores de transcripción y citoquinas, que influyen en este proceso (95-97). Genes de la familia *snail* o factores como el TGF β son elementos fundamentales en esta transición, y algunos de ellos están directamente implicados en los procesos inflamatorios pre-cancerosos (98-100). El paso entre la célula madre tumoral y el tumor no es probablemente un único paso, y cambios durante este proceso o su capacidad metastática marcan el futuro comportamiento del tumor.

Por último, cabe volver a mencionar los problemas de nomenclatura, al poder considerar a las células madre del cáncer como células que generan el cáncer, más que como células capaces de mantener el crecimiento ilimitado de un tumor. Aunque la teoría nos indica que si eliminásemos la población CSC de un tumor, este se «secaría» y se perdería, la realidad es que todavía no hemos hecho este experimento y aun no sabemos si realmente esta «mínima» subpoblación tumoral tiene el enorme significado que creemos que tiene. Además, tampoco está claro si una CSC, que tiene por definición «capacidad para mantener su autorrenovación y la capacidad de generar todos los tipos celulares que componen este tejido o tumor», es la célula de la que deriva el tumor o si, por el contrario, el tumor deriva de una célula normal pero que durante el proceso de transformación ha generado una célula con estas características, a la que denominamos Célula Madre del Cáncer (101).

No me cabe duda de que en los próximos años la progresiva comprensión de estos procesos nos permitirá un mejor abordaje del cáncer

pero, por ahora, el diseño de nuevas terapias y obtener drogas dirigidas contra las poblaciones minoritarias que representan los tumores más agresivos, será decisivo para mejorar nuestros arsenales contra esta enfermedad, y quizá lograr su curación definitiva. De nuevo la ciencia, abierta y libre, tiene la palabra.

ABREVIATURAS

ABC, (*ATP-binding cassette*) transportadores de dominios de unión al ATP; AML-CFU, células proliferativas de blastos leucémicos; *Apc*, gen supresor; BCR/ABL, tirosina quinasa codificada por el gen de fusión *bcr/abl* ; Bmi-1, miembro de la familia polycmb, CG, Células germinales; CSC, (*cancer stem cells*) células madre cancerosas; DMBA, 7, 12 dimetil-bencil antraceno; EMT, transición epitelio-mesenquimal; ER, receptores de estrógenos; GMB, glioblastomas multiformes; HCC, carcinoma hepatocelular; HSC, Células madre hematopoyéticas; ICM, (*inner cell mass*) masa interna celular; *Lgr5*, gen diana de Wnt; LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crónica; NOD, modelo de ratón diabético no obeso; PSCA, antígeno de CSC de próstata; SCC carcinoma de células escamosas; SCID, modelo de ratón con inmunodeficiencia combinada severa (sin linfocitos funcionales), SHH, *sonic hedgehog*; SNC, sistema nervioso central; SNP, sistema nervioso periférico; SP, población lateral; TCC, células transicionales de carcinoma humano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Spalding KL, Arner E, Westermarck PO *et al.* (2008) Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453**, 783-787.
2. Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA *et al.* (2005) Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell* **122**, 133-143.
3. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF y Weissman IL (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-111.
4. Bonnet D (2005) Cancer stem cells: lessons from leukaemia. *Cell proliferation* **38**, 357-361.
5. Daley GQ (2004) Chronic myeloid leukemia: proving ground for cancer stem cells. *Cell* **119**, 314-316.

6. Huntly BJ y Gilliland DG (2005) Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer* **5**, 311-321.
7. Cariati M y Purushotham AD (2008) Stem cells and breast cancer. *Histopathol* **52**, 99-107.
8. Farnie G y Clarke RB (2006) Breast stem cells and cancer. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 141-153.
9. Vonderhaar BK y Smith GH (2008) Stem cells and breast cancer. Introduction. *Breast Dis* **29**, 1.
10. Wicha MS (2007) Breast cancer stem cells: the other side of the story. *Stem Cell Rev* **3**, 110-112; discussion 113.
11. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M *et al.* (2007) A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* **11**, 69-82.
12. Galderisi U, Cipollaro M y Giordano A (2006) Stem cells and brain cancer. *Cell Death Differ* **13**, 5-11.
13. Yu SC, Ping YF, Yi L *et al.* (2008) Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer letters* **265**, 124-134.
14. Yuan X, Curtin J, Xiong Y *et al.* (2004) Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**, 9392-9400.
15. Boman BM y Huang E. (2008) Human colon cancer stem cells: a new paradigm in gastrointestinal oncology. *J Clin Oncol* **26**, 2828-2838.
16. Cammareri P, Lombardo Y, Francipane MG *et al.* (2008) Isolation and culture of colon cancer stem cells. *Methods Cell Biol* **86**, 311-324.
17. Takaishi S, Okumura T y Wang TC (2008) Gastric cancer stem cells. *J Clin Oncol* **26**, 2876-2882.
18. Hombach-Klonisch S, Paranjothy T, Wiechec E *et al.* (2008) Cancer stem cells as targets for cancer therapy: selected cancers as examples. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **56**, 165-180.
19. Nitsch SM, Pries R y Wollenberg, B (2007) Head and neck cancer triggers increased IL-6 production of CD34+ stem cells from human cord blood. *In vivo* **21**, 493-498.
20. Gou S, Liu T, Wang C *et al.* (2007) Establishment of clonal colony-forming assay for propagation of pancreatic cancer cells with stem cell properties. *Pancreas* **34**, 429-435.
21. Kasper, S (2008) Stem cells: The root of prostate cancer? *J Cell Phys* **216**, 332-336.
22. Lawson DA y Witte ON (2007) Stem cells in prostate cancer initiation and progression. *Jour Clin Invest* **117**, 2044-2050.
23. Lawson DA, Xin L, Lukacs R *et al.* (2005) Prostate stem cells and prostate cancer. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **70**, 187-196.
24. Sartor O y Koochekpour S (2004) Stem cells and prostate cancer. *Clin Prostate Cancer* **3**, 11-12.

25. Wang JCY y Dick JE (2005) Cancer stem cells: lesson from leukemia. *Trends Cell Biol* **15**, 494-501.
26. Adolfsson J, Mansson R, Buza-Vidas N *et al.* (2005) Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cell lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295-306.
27. Akashi K, Traver D, Miyamoto T y Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197.
28. Kondo M, Weissman IL y Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672.
29. Takano H, Ema H, Sudo K y Nakauchi H (2004) Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J Exp Med* **199**, 295-302.
30. Hanahan D y Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
31. Griffin JD y Lowenberg B. (1986) Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood* **68**, 1185-1195.
32. Rambaldi A, Wakamiya N, Vellenga E *et al.* (1988) Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *J Clin Invest* **81**, 1030-1035.
33. Sabbath KD y Griffin JD (1985) Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Scand J Haematol* **35**, 251-256.
34. Vellenga E y Griffin JD (1987) The biology of acute myeloblastic leukemia. *Seminars Oncol* **14**, 365-371.
35. Guan Y, Gerhard B, y Hogge DE (2003) Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML) *Blood* **101**, 3142-3149.
36. Guan Y y Hogge DE (2000) Proliferative status of primitive hematopoietic progenitors from patients with acute myelogenous leukemia (AML) *Leukemia* **14**, 2135-2141.
37. Guzman ML, Neering SJ, Upchurch D *et al.* (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **98**, 2301-2307.
38. Guzman ML, Upchurch D, Grimes B *et al.* (2001) Expression of tumor-suppressor genes interferon regulatory factor 1 and death-associated protein kinase in primitive acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **97**, 2177-2179.
39. Terpstra W, Ploemacher RE, Prins A *et al.* Fluorouracil selectively spares acute myeloid leukemia cells with long-term growth abilities in immunodeficient mice and in culture. *Blood* **88**, 1944-1950.
40. Jamieson C. (2009) The malignant consequences of reverting to an embryonic transcriptional program. *Cell stem cell* **4**, 97-98.
41. Jordan CT (2006) Searching for leukemia stem cells—not yet the end of the road? *Cancer cell* **10**, 253-254.

42. Somerville TC y Cleary ML (2006) Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer cell* **10**, 257-268.
43. Somerville TC y Cleary ML (2006) PU.1 and Junb: suppressing the formation of acute myeloid leukemia stem cells. *Cancer cell* **10**, 456-457.
44. Somerville TC, Matheny CJ, Spencer GJ *et al.* (2009) Hierarchical maintenance of MLL myeloid leukemia stem cells employs a transcriptional program shared with embryonic rather than adult stem cells. *Cell stem cell* **4**, 129-140
45. Viatour P, Somerville TC, Venkatasubrahmanyam S *et al.* (2008) Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family. *Cell stem cell* **3**, 416-428.
46. Wang Z, Smith KS, Murphy M *et al.* (2008) Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature* **455**, 1205-1209.
47. Wong P, Iwasaki M, Somerville TC *et al.* (2007) Meis1 is an essential and rate-limiting regulator of MLL leukemia stem cell potential. *Genes & Develop* **21**, 2762-2774.
48. Yokoyama A, Somerville TC, Smith KS *et al.* (2005) The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**, 207-218.
49. Holland EC (2001) Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nature Rev* **2**, 120-129.
50. Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM *et al.* (2001) Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes & Develop* **15**, 1311-1333.
51. Woodruff JM (1999) Pathology of tumors of the peripheral nerve sheath in type 1 neurofibromatosis. *Am Jour Med Gen* **89**, 23-30.
52. Zhu Y y Parada LF (2002) The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* **2**, 616-626.
53. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M *et al.* (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* **63**, 5821-5828.
54. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID *et al.* (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, 396-401.
55. Uchida N, Buck DW, He D *et al.* (2000) Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 14720-14725
56. Akita RW y Sliwkowski MX (2003) Preclinical studies with Erlotinib (Tarceva) *Semin Oncol* **30**, 15-24.
57. Howard B y Gusterson B. (2000) Human breast development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **5**, 119-137.
58. Rudland PS, Ormerod EJ y Paterson FC (1980) Stem cells in rat mammary development and cancer: a review. *J Royal Soc Med* **73**, 437-442.
59. Anderson E. (2002) The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* **4**, 197-201.
60. Dontu G, El-Ashry D y Wicha MS (2004) Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 193-197.

61. Lynch MD, Cariati M y Purushotham AD, (2006) Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. *Breast Cancer Res* **8**, 211.
62. Song LL y Miele L. (2007) Cancer stem cells—an old idea that’s new again: implications for the diagnosis and treatment of breast cancer. *Expert Opin Biol Ther* **7**, 431-438.
63. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ y Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **100**, 3983-3988.
64. Engelmann K, Shen H y Finn OJ (2008) MCF7 side population cells with characteristics of cancer stem/progenitor cells express the tumor antigen MUC1. *Cancer Res* **68**, 2419-2426.
65. Liu Y, Lu WL, Guo J *et al.* (2008) A potential target associated with both cancer and cancer stem cells: a combination therapy for eradication of breast cancer using vinorelbine stealthy liposomes plus parthenolide stealthy liposomes. *J Control Release* **129**, 18-25.
66. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF y Wicha MS (2003) Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif* **36** Suppl 1, 59-72.
67. Hoyert DI, Heron MP, Murphy SL y Kung, HC (2003) Deaths final data for 2003. *Nat Vital Stat Rep* **19**, 1-120.
68. Jimeno A, Feldmann G, Suarez-Gauthier A *et al.* (2009) A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther* **8**, 310-314.
69. Li C, Heidt DG, Dalerba P *et al.* (2007) Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res* **67**, 1030-1037.
70. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW *et al.* (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* **425**, 851-856.
71. Zaret KS y Grompe M (2008) Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* **322**, 1490-1494.
72. Barker N, Ridgway RA, van Es *et al.* (2009) Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* **457**, 608-611.
73. Jaks V, Barker N, Kasper M *et al.* (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature Genetics* **40**, 1291-1299.
74. Kim JH, Yoon SY, Kim CN *et al.* (2004) The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer letters* **203**, 217-224.
75. Reinisch C, Kandutsch S, Uthman A y Pammer J (2006) BMI-1: a protein expressed in stem cells, specialized cells and tumors of the gastrointestinal tract. *Histol & Histopathol* **21**, 1143-1149.
76. Sangiorgi E y Capecchi MR (2008) Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nature Gen* **40**, 915-920.
77. Tateishi K, Ohta M, Kanai F *et al.* (2006) Dysregulated expression of stem cell factor Bmi1 in precancerous lesions of the gastrointestinal tract. *Clin Cancer Res* **12**, 6960-6966.

78. Batlle E (2008) A new identity for the elusive intestinal stem cell. *Nature Genetics* **40**, 818-819.
79. Casali A y Batlle E (2009) Intestinal stem cells in mammals and Drosophila. *Cell stem cell* **4**, 124-127.
80. Clevers H y Batlle E (2006) EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**, 2-5.
81. Ambler CA y Maatta A (2009) Epidermal stem cells: location, potential and contribution to cancer. *J Pathol* **217**, 206-216.
82. Moriyama M, Durham AD, Moriyama H *et al.* (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Developmental Cell* **14**, 594-604.
83. Locke M, Heywood M, Fawell S, Mackenzie, IC (2005) Retention of intrinsic stem cells hierarchies in carcinoma-derived cell lines. *Cancer Res* **65**, 8944-8950.
84. Jensen KB, Jones J y Watt FM (2008a) A stem cell gene expression profile of human squamous cell carcinomas. *Cancer let* **272**, 23-31.
85. Jensen UB, Yan X, Triel C *et al.* (2008b) A distinct population of clonogenic and multipotent murine follicular keratinocytes residing in the upper isthmus. *J Cell Sci* **121**, 609-617.
86. Braun KM (2008) Cutaneous cancer stem cells: beta-catenin strikes again. *Cell Stem Cell* **2**, 406-408.
87. Malanchi I, Peinado H, Kassen D *et al.* (2008) Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature* **452**, 650-653.
88. Raymond K, Kreft M, Song JY *et al.* (2007) Dual Role of alpha6beta4 integrin in epidermal tumor growth: tumor-suppressive versus tumor-promoting function. *Mol Biol Cell* **18**, 4210-4221.
89. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG *et al.* (2004) A distinct «side population» of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Nat Acad Sci USA* **101**, 14228-14233.
90. Terunuma A, Kapoor V, Yee C *et al.* (2007) Stem cell activity of human side population and a6 integrin-bright keratinocytes defines by a quantitative in vitro assay. *Stem Cells* **25**, 664-669.
91. Loebinger MR, Giangreco A, Groot KR *et al.* (2008) Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade. *British J Cancer* **98**, 380-387.
92. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M, Weissmann I y Clark M (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 43-47.
93. Costello RT, Mallet F, Gaugler B *et al.* (2000) Human Acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* **60**, 4403-4411.
94. Guzman ML, Swiderski CF, Howard DS *et al.* (2002) Preferential induction of apoptosis for primary human leukemic stem cells. *Proc Natl Acad, Sci USA* **99**, 16220-16216-16225.

95. Brabletz S, Schmalhofer O y Brabletz T (2009) Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol* **217**, 307-317.
96. Hollier BG, Evans K y Mani SA (2009) The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *J Mammary Gland Biol & Neoplasia* **14**, 29-43.
97. Santisteban M, Reiman JM, Asiedu MK *et al.* (2009) Immune-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition In vivo Generates Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Res* **69**, 2887-2895.
98. Kabashima A, Higuchi H, Takaishi H *et al.* (2009) Side population of pancreatic cancer cells predominates in TGF-beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and invasion. *Intern J Cancer*.
99. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y *et al.* (2008) Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* **121**, 3317-3324.
100. Niessen K, Fu Y, Chang L *et al.* (2008) Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol* **182**, 315-325.
101. Jordan CT (2009) Cancer Stem Cells: Controversial or just Misunderstood? *Cell Stem Cells* **4**, 2003-2005.