

PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE ONCOGÉNICAS

EN LA RESISTENCIA TERAPÉUTICA DE TUMORES DE MAMA

MARCO A VELASCO VELÁZQUEZ ¹, MARISOL DE LA FUENTE GRANADA ²

¹ DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. ² DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. MÉXICO DF, MÉXICO

RESUMEN

Las células madre oncogénicas constituyen una subpoblación de células tumorales que tienen la capacidad de auto-renovarse y de generar tumores heterogéneos en animales de experimentación. Estudios recientes han demostrado que las células madres oncogénicas juegan un papel central en la tumorigénesis, la progresión tumoral y la sensibilidad al tratamiento, lo que las convierte en blancos muy prometedores para el desarrollo de nuevas terapias antineoplásicas. En el caso particular del cáncer de mama estas células se descubrieron en 2003. Tras su identificación, diversos estudios se enfocaron en identificar las actividades celulares que caracterizan a esta población, lo cual permitió saber que las células madres mamarias son más resistentes a la quimioterapia que el resto de las células tumorales. Al sobrevivir al tratamiento, estas pueden ser capaces de repoblar el tumor y producir recurrencia. El presente artículo tiene como objetivo resumir evidencia reciente que indica que tanto cambios en la expresión de transportadores de membranas como alteraciones en diversas vías de señalización participan en la quimiorresistencia de las células madre mamarias. Adicionalmente, esta revisión discute las posibles estrategias para vencer la resistencia terapéutica y lograr la erradicación de las células. Esas estrategias pueden ser la base para la generación de mejores terapias que prevengan la recurrencia de los tumores de mama.

PALABRAS CLAVE: Cáncer, célula madre, oncogénica, resistencia terapéutica, quimioterapia.

SUMMARY

The cancer stem cells are a subpopulation of tumor cells that display self renewal capability and generate heterogeneous tumors when injected into a experimentation animals. Recent studies have shown that stem cancer cells play a key role in the tumor development, progression, and treatment sensitivity, making cancer stem cells are very promising targets for the development of a new therapies for cancer. In the case of breast cancer, stem cells were discovered in year 2003. Since they identification, different studies have characterized the cell activities that distinguish this population. Now it is well known that breast cancer stem cells are more resistant to chemotherapy than the rest of the breast cancer cells. Given that cancer stem cells survive the treatment, they may be capable to repopulate the tumor, causing relapse. The present paper aims to summarize the recent evidence that indicates that changes in the expression of membrane transporters as well as alterations in various signaling pathways are involved in the generation of resistance in breast cancer stem cells. In addition, this review discusses the possible strategies to overcome drug resistance and to achieve the eradication of the cancer stem cells. These strategies may become the basis for the development of new therapies that block relapse in breast cancer.

KEY WORDS: Cancer, stem cell, oncogenes, therapeutic resistance, breast cancer, chemotherapy.

Recibido: 19/03/2009 Revisado: 01/04/2009
Aceptado para publicación: 28/04/2009

Correspondencia: Marco A. Velasco Velázquez.
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina,
UNAM Apdo. Postal 70-297, Ciudad Universitaria.
México D.F. 04510, México. Tel. + (52-55) 5623-
2282 Fax + (52-55) 5616-1489 E-mail: marcovelasco@
correo.unam.mx

INTRODUCCIÓN

Las células cancerosas dentro de un tumor presentan heterogeneidad funcional, es decir, diferentes células presentan diferente morfología, grado de diferenciación, capacidad proliferativa, e invasividad⁽¹⁾. Recientemente se ha identificado una pequeña subpoblación de células con características biológicas únicas: 1. Se dividen asimétricamente, generando otra célula igual (es decir se auto-renuevan) y una célula progenitora; y 2. Cuando se trasplantan a animales son capaces de generar un tumor que presenta linajes heterogéneos⁽²⁾. A estas células, por sus características comunes con las células madre normales, se les ha llamado células madre oncogénicas (CMO). El descubrimiento de las CMO ha llevado a proponer la hipótesis de que es este grupo reducido de células malignas son las responsables de la iniciación y progresión del tumor, e incluso pueden estar involucradas en la formación de metástasis y la recurrencia tumoral^(3,4). La hipótesis también sugiere que las nuevas terapias antitumorales debieran estar dirigidas a erradicar las células de más alta jerarquía en la formación del tumor: las CMO.

Aunque no se sabe si las CMO derivan de células madre normales o de células progenitoras que han adquirido la capacidad de auto-renovación, ambos escenarios consideran que las CMO adquieren sus características fenotípicas mediante alteraciones genéticas. En conjunto, estas alteraciones hacen que las CMO sean más resistentes a las terapias antineoplásicas que el resto de las células tumorales⁽⁵⁾. Las CMO que sobreviven a la terapia pueden ser capaces de repoblar los tumores y producir una recaída. Además, dado que las mutaciones pueden ser transmitidas a toda la progenie de las CMO, es probable que el nuevo tumor muestre mayor resistencia, lo que permitiría la evolución hacia la malignidad. Por tanto, ahora el reto está en

identificar los blancos terapéuticos que pueden atacarse en las CMO. En el caso particular del cáncer de mama, se han identificado algunos de los mecanismos por lo que las CMO son resistentes a la quimioterapia. El presente artículo resume esa evidencia y discute las posibles estrategias para vencer la resistencia de las CMO mamarias.

CARACTERÍSTICAS DE LAS CMO MAMARIAS

En los últimos 6 años se han descrito CMO en tumores de mama, cerebro, colon, páncreas, próstata, pulmón, y de cabeza y cuello⁽⁶⁻¹⁰⁾. En tumores de mama humanos la identificación de las CMO se logró en 2003 por Al-Hajj y col.⁽⁶⁾. Ellos descubrieron una población celular, caracterizada por los marcadores de superficie CD44⁺/CD24^{-low}/ESA⁺, y linaje⁻ (falta de expresión de CD2, CD3, CD10, CD16, CD18, CD31, CD64, y CD140b), que constituye menos del 5 % del total de células tumorales. Dicha subpoblación es altamente tumorigénica, pues la inyección de tan sólo 200 células CD44⁺/CD24^{-low}/linaje⁻ a ratones inmunosuprimidos es suficiente para generar tumores. En contraste, se requieren 5 x 10⁴ células cancerosas sin separar para generar tumores consistentemente. Los tumores generados por las CMO recapitulan la heterogeneidad fenotípica del tumor inicial y contienen una minoría de células CD44⁺/CD24^{-low}/linaje⁻ que pueden ser inyectadas en otros animales para formar nuevos tumores heterogéneos⁽⁶⁾.

También se han aislado CMO mamarias de muestras de pacientes propagadas *in vitro*⁽¹¹⁾ y de líneas celulares de cáncer de mama⁽¹²⁾, aprovechando la capacidad de las CMO de formar mamó esferas no-adherentes en cultivo. Las mamó esferas están enriquecidas de células con el fenotipo CD44⁺/CD24^{-low}, y estas células mantienen la capacidad de iniciar tumores cuando se inyectan en ratones inmunosuprimidos. Sin

embargo, sólo una fracción de células CD44⁺/CD24^{-low} es capaz de formar mammas secundarias⁽¹¹⁾. En concordancia, las líneas celulares de cáncer de mama con alto porcentaje (90 %) de células CD44⁺/CD24^{-low} no son más tumorigénicas que líneas de células que contienen sólo el 5 % de células con el mismo fenotipo⁽¹²⁾. Estos datos indican que sólo un subgrupo dentro de las células CD44⁺/CD24^{-low} tiene características de CMO y por tanto se requieren marcadores adicionales para identificar a las CMO mamarias. Más recientemente, la aldehído deshidrogenasa (ALDH), una enzima detoxificante asociada con células madre hematopoyéticas y neurales^(13,14), se ha identificado como marcador de CMO mamarias. Células tumorales de mama positivas para ALDH tienen la capacidad de generar tumores que asemejan la heterogeneidad de los tumores parentales⁽¹⁵⁾. Congruentemente, un estudio en 577 muestras de pacientes con carcinoma de mama mostró que la expresión de ALDH correlaciona con mal pronóstico⁽¹⁵⁾.

En modelos murinos se han utilizado otros marcadores de células madre para identificar las CMO mamarias. En líneas celulares tumorales generadas de ratones deficientes de BRCA1, Wright y col. encontraron dos poblaciones diferentes de posibles CMO: una con el fenotipo CD44⁺/CD24⁻ y otra siendo CD133⁺⁽¹⁶⁾. Ambas subpoblaciones de células son capaces de repoblar las diferentes fracciones celulares encontradas en las líneas parentales, producen mammas *in vitro*, generan tumores en ratones, y expresan el marcador de pluripotencialidad Oct4. Estos datos, junto con el hecho de que CD133 se utiliza en la identificación de CMO de colon y de carcinoma hepatocelular⁽¹⁷⁾, indican que CD133 puede ser utilizado como un marcador de CMO mamarias. De manera similar, la subunidad β1 de integrinas (CD29) ha sido señalada como potencial marcador de CMO mamarias. Las subpoblaciones de células CD24⁺/CD29⁺ aisladas de líneas celulares tumorales generadas en ratones deficientes de BRCA1 muestran la capacidad de auto-renovación, diferenciación, y

tumorigenicidad⁽¹⁸⁾. Sin embargo, actualmente se desconoce si las subpoblaciones CD133⁺ o CD24⁺/CD29⁺ están presentes en tumores humanos o si se superponen con otras poblaciones previamente descritas.

MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA DE LAS CMO MAMARIAS

Los actuales tratamientos sistémicos del cáncer de mama utilizan agentes citotóxicos, hormonales e inmunoterapéuticos. En general, estos agentes inducen tasas de respuesta que van del 60 % al 80 % en los cánceres de mama primarios y aproximadamente 50 % en las metástasis^(19,20). Sin embargo, a pesar de la eficacia de la respuesta primaria, la mediana de la duración de la respuesta a la quimioterapia es de 8 a 14 meses⁽²¹⁾. En consecuencia, en 5 años el 20 % a 70 % de las pacientes presenta enfermedad recurrente⁽²¹⁻²³⁾. Aún más, en la remisión la resistencia a la terapia no es sólo común sino esperada⁽²⁰⁾, incrementando el riesgo de muerte.

En el cáncer de mama, el papel de la quimioterapia en la selección y la amplificación de las CMO se han estudiado mediante diferentes estrategias. Por ejemplo, la proporción de células con capacidad de auto-renovación *in vitro* se ha comparado entre pacientes que han recibido quimioterapia neoadyuvante y pacientes que nunca han recibido terapia. La formación de mammas es 14 veces mayor en las células tumorales de los pacientes que ya habían recibido quimioterapia⁽²⁴⁾. Este fenómeno fue confirmado estudiando muestras pareadas de pacientes antes de la quimioterapia y después de la quimioterapia neoadyuvante. La formación de mammas, así como la proporción de células CD44⁺/CD24^{-low}, aumentan aproximadamente 10 veces después de la quimioterapia⁽²⁴⁾. Estos datos sugieren que la quimioterapia ejerce una presión selectiva que hace que el número de CMO se incremente.

Pruebas adicionales en modelos de ratón

apoyan la teoría de que la expansión de las CMO durante el tratamiento contribuye a la resistencia posterior. Los tumores de mama que aparecen espontáneamente en ratones mutados en BRCA1 y p53 son sensibles a cisplatino; sin embargo, unos meses después del tratamiento, aparecen nuevos tumores en el mismo sitio. La proporción de células CD29^{hi}/CD24^{med} en los tumores recurrentes es 4 veces mayor que en tumores primarios no tratados ⁽²⁵⁾. Sorprendentemente, cuando las células CD29^{hi}/CD24^{med} tumores recurrentes fueron inyectadas en ratones inmunosuprimidos forman tumores que sólo son parcialmente sensibles a cisplatino. Una segunda ronda de selección y trasplante aumenta aún más la fracción CD29^{hi}/CD24^{med} y genera tumores que son completamente refractarios a cisplatino ⁽²⁵⁾, lo que indica la aparición de células progenitoras resistentes al fármaco.

PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS EN LA RESISTENCIA DE CMO MAMARIAS

Las células madre normales tienen bombas de membrana para protegerse de la acumulación de compuestos potencialmente nocivos. Esta característica permitió la identificación de una subpoblación que eficientemente saca el colorante intracelular Hoechst 33342 y que poseen características de células madre, a la que se llamó “población lateral” (*SP* por sus siglas en inglés)⁽²⁶⁾. No es de extrañar que las CMO se encuentren en la fracción *SP* de las células tumorales y, por tanto, tengan una mayor capacidad de bombear fármacos hacia el exterior de la célula. Por ejemplo, la fracción *SP* de células leucémicas tiene incrementado el aumento de flujo de salida de los fármacos mitoxantrona y daunorrubicina ⁽²⁷⁾.

Una fracción *SP* también ha sido identificada en la línea celular MCF-7 ⁽²⁸⁻³⁰⁾, lo que sugiere que el aumento del flujo de salida de drogas también puede estar presente en las CMO mamarias.

Estos datos concuerdan con que la fracción *SP* en células Cal-51 muestra un aumento de 30 veces en la expresión de el transportador de la familia ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*) ABCG2, en comparación con las células sin separar ⁽³⁰⁾. Sin embargo, células individuales de la fracción *SP* pueden diferenciarse para originar una mezcla heterogénea de células *SP* y células no *SP* que no expresan el transportador ⁽³⁰⁾. Del mismo modo, la expresión de ABCG2 disminuye con la diferenciación *in vitro* de células SKBR3 ⁽²⁴⁾. Por tanto, parece que en líneas celulares de cáncer de mama la expresión de transportadores ABC y la consecuente capacidad de bombear fármacos desde el espacio intracelular se pierde durante la diferenciación de las CMO a células cancerosas. Sin embargo, evidencia *in vivo* sugiere que la exposición a agentes quimioterapéuticos impide la diferenciación de las CMO. Yu y col. estudiaron las propiedades de tumores generados por células SKBR3 obtenidas después de 3 pases consecutivos en ratones que recibían epirubicina. Los tumores estuvieron altamente enriquecidos en células CD44⁺/CD24⁻/linaje⁻ y las células de esos tumores forman 20 veces más mamóesferas que las células de los tumores generados con la línea celular parental ⁽²⁴⁾. Todos estos datos indican que la subpoblación de CMO puede aumentar durante la quimioterapia y que la expresión de los transportadores ABC desempeña un papel clave en su supervivencia. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar la importancia específica de cada uno de estos transportadores durante la supervivencia y expansión de CMO mamarias, así como su relevancia clínica.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA DE CMO MAMARIAS

Las células madre normales, aunque tienen el potencial de auto-renovación, pasan la mayor parte de su tiempo en la fase G₀ del

ciclo celular. Como las CMO comparten varias características con las células madre normales, es en general aceptado que las CMO tienen un ciclo celular más lento que el resto de las células cancerosas. Este estado quiescente puede contribuir a la resistencia a quimioterapéuticos que actúan principalmente en células proliferantes. Las CMO aisladas de tumores humanos de mama se encuentran en su mayoría (75 %) en G₀/G₁ ⁽⁶⁾, lo que sugiere que el retardo en el ciclo celular si participa en la quimiorresistencia.

Adicionalmente, se ha reportado que alteraciones en diversas vías de señalización, tales como HER-2, NOTCH, WNT, Y HEDGEHOG, que podrían estar contribuyendo a la resistencia a fármacos en las CMO mamarias ^(31, 32) para revisiones recientes. Por ejemplo, HER-2 puede jugar un papel en la regulación de población de CMO. Células que sobre-expresan HER-2 también expresan el marcador de células madre ALDH1⁺ ⁽¹⁵⁾. En CMO de otros tejidos, ALDH1 es mediador de la resistencia a la ciclofosfamida ⁽³³⁾, lo que sugiere que la señalización mediada por HER-2 pueden favorecer la resistencia. En concordancia, el bloqueo de HER-2 con el inhibidor de trastuzumab reduce en un 50 % la tasa de recurrencia de la quimioterapia adyuvante convencional ⁽³⁴⁾.

Por otro lado, la vía del receptor NOTCH también desempeña un papel en la resistencia de CMO mamarias. Esta vía, que regula la auto-renovación de las células mamarias normales ⁽³⁵⁾ y se encuentra sobre-activada en carcinomas humanos ^(36,37), promueve directamente la transcripción del gen antiapoptótico SURVIVINA en líneas celulares de cáncer de mama ⁽³⁸⁾. A su vez, el aumento de los niveles de SURVIVINA desregula múltiples puntos de control mitóticos, contribuyendo a la inestabilidad genética ⁽³⁹⁾ e inhibiendo la apoptosis inducida por fármacos o radiación ^(40,41). Evidencia adicional de la función del eje NOTCH/SURVIVINA en la supervivencia y resistencia de CMO mamarias

incluye: 1. NOTCH-1 protege células CD44⁺/CD24^{-low} de cáncer mama de la radiación ⁽⁴²⁾; 2. Anticuerpos neutralizantes ANTI-NOTCH-4 producen la pérdida de viabilidad en mamóesferas generadas a partir de cultivos primarios de carcinoma ductal *in situ* ⁽⁴³⁾; y 3. La proteína SURVIVINA está sobre-expresada en cultivos de CMO mamarias ⁽¹¹⁾. Estos datos sugieren que SURVIVINA puede operar como un factor citoprotector regulado por NOTCH, que promueven la persistencia a largo plazo de las CMO mamarias.

ESTRATEGIAS PARA ERRADICAR A LAS CMO

El modelo de células madre establece que sólo las CMO son capaces de producir tumores; por tanto, las CMO serían la fuente de las recurrencias. Esto convierte a las CMO en los blancos ideales para el desarrollo de nuevas terapias para el cáncer. El principal objetivo de esas terapias sería la erradicación de las CMO sin perjudicar a otros tipos de células. Sin embargo, para lograr ese objetivo, se requiere una mejor comprensión de la biología de las CMO. La evidencia presentada arriba indica que la erradicación CMO mamarias podría basarse en: 1. La expresión diferencial de receptores. 2. La expresión alterada de transportadores de fármacos, y 3. Las vías de señalización alteradas.

MARCADORES ESPECÍFICOS DE LAS CMO COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS

La utilización de marcadores específicos para ubicar y destruir a las CMO fue estudiado en primer lugar en leucemias. Anticuerpos citotóxicos anti-CD33 (un marcador de las células madre leucémicas) se han utilizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA) ⁽⁴⁴⁾. Aun cuando el anticuerpo produce citopenia debido a sus efectos sobre las células

madre hematopoyéticas normales, induce la remisión en algunos casos y, por tanto, muestra potencial como medio de erradicación células madre leucémicas ⁽⁴⁵⁾. De manera similar, un anticuerpo monoclonal contra CD44 induce la diferenciación terminal y apoptosis de células de LMA ⁽⁴⁶⁾. CD44 también se ha utilizado para atacar células cancerosas que lo expresan en tumores sólidos, incluidos los de mama. Anticuerpos anti-CD44 o moléculas solubles de ácido hialurónico (ligando de CD44) conjugadas con fármacos citotóxicos o radioligandos, reducen la progresión de la enfermedad en pacientes o modelos animales ⁽⁴⁷⁾.

Estos prometedores datos sugieren que una vez que se conozca el fenotipo preciso de las CMO mamarias, se lograrán eficiente la identificación de estas células, ya sea para atacarlas o para monitorear el progreso de la terapia.

MODULACIÓN DEL TRANSPORTE DE FÁRMACOS

La sobre-expresión de transportadores de la familia ABC participa en la resistencia de CMO a fármacos. Como algunos de estos transportadores se expresan en células tumorales “diferenciadas”, mediando su quimiorresistencia, ya se han estudiado diferentes estrategias para inhibir a los transportadores ABC ⁽⁴⁸⁾. En primer lugar, se ha propuesto que nuevos fármacos citotóxicos que no puedan ser utilizados como sustrato por los transportadores ABC serían útiles para superar la resistencia. Por ejemplo, la anamicina es un derivado de la antraciclina que no puede ser sacado de la célula por los transportadores ABC y por lo tanto el fármaco es tóxico para la línea celular resistente MCF-7/VP ⁽⁴⁹⁾. En segundo lugar, una gran proporción de los estudios se han centrado en el uso simultáneo de inhibidores de los transportadores ABC con fármacos citotóxicos. Sin embargo, los ensayos clínicos con este tipo de inhibidores han demostrado que producen graves efectos secundarios, debido a

la inhibición de las funciones fisiológicas de los transportadores ABC ⁽⁴⁸⁾. En tercer lugar, la reducción en la expresión de transportadores ABC puede proporcionar un método eficaz para vencer la resistencia. Recientemente, se reportó que el alcaloide berberina disminuye la expresión del transportador ABCG2 y reduce la fracción SP de células de la línea MCF-7 ⁽⁵⁰⁾, lo que sugiere que los productos naturales pueden ser útiles para atacar CMO mamarias.

INTERVENCIONES EN VÍAS DE SEÑALIZACIÓN

Las moléculas que participan en las vías desreguladas que controlan la auto-renovación y la supervivencia de las CMO mamarias son obvios blancos potenciales para el desarrollo de nuevas terapias. Por lo tanto, las vías HER-2, NOTCH, WNT, Y HEDGEHOG están siendo investigadas a fin de encontrar los elementos de señalización que son diferentes en las CMO ^(31,32). Adicionalmente, la identificación de factores de transcripción o promotores preferentemente activos en las CMO mamarias puede ser útil en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas. Recientemente, los promotores MDR, hTERT, y Cox-2 han sido identificados como activos en las CMO mamarias, por lo que adenovirus oncolíticos bajo el control de estos promotores son eficaces para matar células CD44+/CD24low/- in vitro y reducir el crecimiento tumoral in vivo ⁽⁵¹⁾. Aun cuando los autores del estudio reportan que la fracción CD44+/CD24low/- no fue erradicada totalmente, estos resultados sugieren que este tipo de estrategia puede tener aplicación en pacientes con cáncer de mama.

Podemos concluir que las CMO tienen un papel central en la progresión del cáncer de mama, pues están involucradas no sólo en la tumorigénesis, sino en la generación de quimiorresistencia. Conforme surge nueva información sobre la biología de las CMO mamarias, se están preparando estrategias alternativas para erradicar

estas células. Esas estrategias pueden servir de base para la generación de terapias que mejoren las respuestas actuales y que prevengan la recurrencia de la enfermedad, mejorando así la calidad de vida de las pacientes.

Agradecimientos

Esta investigación estuvo financiada parcialmente por UNAM y CONACyT. México.

REFERENCIAS

1. Heppner GH, Miller BE. Tumor heterogeneity: Biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev.* 1983;2(1):5-23.
2. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339-9344.
3. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumors: Accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(10):755-768.
4. Li F, Tiede B, Massague J, Kang Y. Beyond tumorigenesis: Cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* 2007;17(1):3-14.
5. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumor stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):275-284.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(7):3983-3988.
7. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):504-514.
8. Glinisky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev.* 2007;3(1):79-93.
9. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007;67(3):1030-1037.
10. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(3):973-978.
11. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506-5511.
12. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 2008;10(2):R25.
13. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells.* 2006;24(4):975-985.
14. Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH, et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood.* 2004;104(6):1648-1655.
15. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555-567.
16. Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. BRCA1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008;10(1):R10.
17. Suetsugu A, Nagaki M, Aoki H, Motohashi T, Kunisada T, Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;351(4):820-824.
18. Vassilopoulos A, Wang RH, Petrovas C, Ambrozak D, Koup R, Deng CX. Identification and characterization of cancer initiating cells from BRCA1 related mammary tumors using markers for normal mammary stem cells. *Int J Biol Sci.* 2008;4(3):133-142.
19. Guarneri V, Conte PF. The curability of breast cancer and the treatment of advanced disease. *Eur J Nucl*

- Med Mol Imaging. 2004;31(Suppl1):149-161.
20. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007;608:1-22.
 21. Pusztai L, Hortobagyi GN. High-dose chemotherapy: How resistant is breast cancer? *Drug Resist Updat.* 1998;1(1):62-72.
 22. Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 2002;97(1):72-81.
 23. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D, Pruneri G, Gentilini O, Veronesi P, et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: A study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res.* 2004;10(19):6622-6628.
 24. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. Let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell.* 2007;131(6):1109-11123.
 25. Shafee N, Smith CR, Wei S, Kim Y, Mills GB, Hortobagyi GN, et al. Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in BRCA1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* 2008;68(9):3243-3250.
 26. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 1996;183(4):1797-1806.
 27. Wulf GG, Wang RY, Kuehnle I, Weidner D, Marini F, Brenner MK, et al. A leukemic stem cell with intrinsic drug efflux capacity in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001;98(4):1166-1173.
 28. Patrawala L, Calhoun T, Schneider-Broussard R, Zhou J, Claypool K, Tang DG. Side population is enriched in tumorigenic, stem-like cancer cells, whereas ABCG2+ and ABCG2- cancer cells are similarly tumorigenic. *Cancer Res.* 2005;65(14):6207-6219.
 29. Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Alfaro MP, Buchholz TA, Rosen JM. WNT/beta-catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(2):618-623.
 30. Christgen M, Ballmaier M, Bruchhardt H, von Wasielewski R, Kreipe H, Lehmann U. Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. *Mol Cell Biochem.* 2007;306(1-2):201-212.
 31. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: Current opinion and future challenges. *Pathobiology.* 2008;75(2):75-84.
 32. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol.* 2008;26(17):2813-2820.
 33. Dylla SJ, Beviglia L, Park IK, Chartier C, Raval J, Ngan L, et al. Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS ONE.* 2008;3(6):e2428.
 34. Slamon D, Pegram M. Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol.* 2001;28(1 Suppl 3):13-19.
 35. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, Kawamura MJ, Abdallah WM, Wicha MS. Role of NOTCH signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* 2004;6(6):R605-615.
 36. Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer. *Cancer Res.* 2006;66(3):1517-1525.
 37. Pece S, Serresi M, Santolini E, Capra M, Hulleman E, Galimberti V, et al. Loss of negative regulation by Numb over NOTCH is relevant to human breast carcinogenesis. *J Cell Biol.* 2004;167(2):215-221.
 38. Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a NOTCH-SURVIVIN signaling axis. *Cancer Res.* 2008;68(13):5273-5281.
 39. Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(6):616-622.
 40. Ghosh JC, Dohi T, Raskett CM, Kowalik TF, Altieri DC. Activated checkpoint kinase 2 provides a survival signal for tumor cells. *Cancer Res.* 2006;66(24):11576-11579.
 41. O'Connor DS, Wall NR, Porter AC, Altieri DC. A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2(1):43-54.
 42. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(24):1777-1785.
 43. Farnie G, Clarke RB, Spence K, Pinnock N, Brennan K, Anderson NG, et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: Role of NOTCH and epidermal growth factor receptor signaling pathways. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(8):616-267.
 44. Tsimberidou AM, Giles FJ, Estey E, O'Brien S, Keating MJ, Kantarjian HM. The role of gemtuzumab

- ozogamicin in acute leukaemia therapy. *Br J Haematol.* 2006;132(4):398-409.
45. Sperr WR, Florian S, Hauswirth AW, Valent P. CD 33 as a target of therapy in acute myeloid leukemia: Current status and future perspectives. *Leuk Lymphoma.* 2005;46(8):1115-1120.
46. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemia stem cells. *Nat Med.* 2006;12(10):1167-1174.
47. Platt VM, Szoka FC, Jr. Anticancer therapeutics: Targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm.* 2008;5(4):474-486.
48. Ozben T. Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett.* 2006;580(12):2903-2909.
49. Perez-Soler R, Neamati N, Zou Y, Schneider E, Doyle LA, Andreeff M, et al. Annamycin circumvents resistance mediated by the multidrug resistance-associated protein (MRP) in breast MCF-7 and small-cell lung UMCC-1 cancer cell lines selected for resistance to etoposide. *Int J Cancer.* 1997;71(1):35-41.
50. Kim JB, Ko E, Han W, Shin I, Park SY, Noh DY. Berberine Diminishes the side population and ABCG2 transporter expression in MCF-7 breast cancer cells. *Planta Med.* 2008.
51. Bauerschmitz GJ, Ranki T, Kangasniemi L, Ribacka C, Eriksson M, Porten M, et al. Tissue-specific promoters active in CD44+CD24-/low breast cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(14):5533-5539.