

Artigo de Revisão/Review Article

Uma nova abordagem de cancro baseada na teoria das células estaminais

New insights on cancer based on the stem cells theory

Filipe Martins *, Maria Botelho **, António Cabrita ***, Carlos Freire-de-Oliveira ****

Hospitais da Universidade de Coimbra (HUC), Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia (CIMAGO), Instituto de Biofísica e Biomatemática do Instituto Biomédico de Investigação em Luz e Imagem (IBILI), Instituto de Patologia Experimental (IPE), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (FMUC)

ABSTRACT

Stem cells are being intensively studied because, in addition to therapeutic weapons, they can also be targets in treatment strategies of many diseases, namely in cancer, where they have an important etiologic role. Classical regulatory pathways of stem cells are deregulated in several tumours, strengthening the role of these cells in the carcinogenesis process.

The mammary gland is a good model for studying carcinogenesis because of its unique anatomic, functional and pathologic characteristics. There are several exceptional experimental models used in etiologic, pathophysiologic, diagnostic and therapeutic research in cancer using this complex organ. After isolation of tumoural stem cells in the haematopoietic system, the breast and brain were the organs whose solid tumours were studied in order to isolate stem cells.

In this article, a monoclonal theory of cancer is presented, supported by the stem cell theory and by extensive experimental work. Stem cells mutations would be in the origin of the most aggressive and undifferentiated tumours, whereas tumours with better prognosis would be originated in more differentiated progenitor cells. The higher aggressiveness of the former could be explained by expression of MDR proteins in stem cells. The protective role of pregnancy in breast cancer, would in the light of the exposed theory, be explained by the inhibitory influences of differentiated tissue.

The isolation of tumour stem cells, combined with profound knowledge of cancer regulatory pathways, may lead us to develop, in the short future, specific therapeutic strategies that could transform cancer into a treatable or chronic disease.

INTRODUÇÃO

As *stem cells*, ou células mãe, intervêm no processo de transformação neoplásica e, à luz do que se vai

conhecendo sobre essa participação, espera-se que venham a ser úteis para o diagnóstico e também para o tratamento. Estas células apresentam uma capacidade ilimitada de proliferar, autorenovação e plasticidade

* Interno Complementar de Ginecologia e Obstetrícia dos HUC, Bolseiro da Fundação Calouste Gulbenkian, Investigador do CIMAGO, IBILI e IPE-FMUC

** Directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática do IBILI, Professora Catedrática da Faculdade de Medicina de Coimbra, Vicepresidente e Investigadora do CIMAGO

*** Director do IPE, Professor Auxiliar da Faculdade de Medicina de Coimbra, Investigador do CIMAGO

**** Director do Serviço de Ginecologia, HUC, Professor Catedrático da Faculdade de Medicina de Coimbra, Presidente e Investigador do CIMAGO

dade, podendo dar origem a células idênticas (divisão simétrica) ou a uma célula semelhante à progenitora e outra com características diferentes (divisão assimétrica). Estas propriedades fazem delas intervenientes primordiais em estratégias de tratamentos em patologias diversas, entre as quais se destacam as doenças neurodegenerativas (doenças de Parkinson e Alzheimer), as doenças musculares degenerativas, a diabetes mellitus, as insuficiências hepática e cardíaca e o cancro¹.

No âmbito da patologia tumoral maligna, as *stem cells* surgem não só como agentes terapêuticos mas também como possíveis alvos para terapêutica. A sua influência na carcinogénese é longínqua, reportando-se ao século XIX quando, após Johannes Muller (1838) ter referido que o cancro era composto por células e não por linfa coagulada, Julius Vogel (1845) sugeriu uma teoria segundo a qual as células tumorais tinham origem em elementos germinativos amorfos dispersos no seio do tecido normal os quais, não conseguindo caracterizar, denominou *Blastema* ou *Seminum morbi*. Mais recentemente, no final da década de 70², observou-se que as células tumorais apresentam fenótipos muito variados, desde células quase embrionárias a quase diferenciadas. Porém, todas elas derivam de células idênticas às *stem cells*³. Perto do final do século passado, Trosko (1989) propôs a teoria das *stem cells*⁴, segundo a qual os tumores teriam origem em *stem cells* (por definição, seriam imortais até ser induzida uma diferenciação terminal) que acumulariam alterações que impossibilitavam a sua normal diferenciação, dando origem a *stem cells* tumorais. Posteriormente, integrou os conceitos da carcinogénese já alicerçados anteriormente (oncogene e gene supressor tumoral; iniciação, promoção e progressão) na sua teoria⁵.

A origem do cancro em *stem cells* pode justificar a quase inexistência de tumores malignos cardíacos. Classicamente, as células musculares cardíacas apresentam a possibilidade de hipertrofia, mas não de hiperplasia, sendo o local de um enfarte do miocárdio preenchido por tecido fibroso, sugerindo a inexistência de células musculares progenitoras capazes de reparar a lesão.

As vias envolvidas na proliferação das *stem cells* e na diferenciação celular são responsáveis muitas vezes pela regulação tumoral, nomeadamente as do

Wnt, Notch e Hedgehog, reforçando o possível envolvimento destas células-mãe na carcinogénese.

As *stem cells* tumorais são células que, ao contrário das restantes células tumorais, proliferam dando origem a tumores quando injectadas *in vivo* ou esferas de células tumorais quando cultivadas *in vitro*. Poderão estar na origem das metástases, quando algumas destas células atingem outros órgãos. A quimioterapia com os citostáticos convencionais provoca uma redução acentuada da massa tumoral; porém, não é, a maioria das vezes, capaz de eliminar as *stem cells* tumorais, as quais podem apresentar mecanismos de resistência eficazes, nomeadamente à terapia. A sua sobrevivência à terapia pode ser responsável pelas recidivas tumorais. Desta forma, estas células tumorais com propriedades progenitoras tornam-se um alvo apetecível de inovadoras estratégias terapêuticas, já que um tratamento direccionado à sua eliminação pode levar à erradicação do tumor^{6,7,8}.

Mama como modelo de estudo da carcinogénese

O cancro da mama é um dos tumores malignos mais prevalentes na mulher, com importantes implicações sociais e psicológicas. Por outro lado, a glândula mamária tem características anatómicas, funcionais e patológicas que a tornam num órgão único para o estudo da carcinogénese⁹.

Primariamente, o parênquima mamário sofre grande parte do seu crescimento após a puberdade, permitindo a realização de estudos experimentais do desenvolvimento, realizados em idade juvenil ou adulta, e apresentando oportunidades para manipulação não disponíveis em outros órgãos. Com base nesta característica foram elaboradas metodologias de transplantação de tecidos, tumores e células tumorais para o leito adiposo mamário. Em segundo lugar, a acessibilidade da glândula e a organização dos ductos permite uma fácil visualização das alterações existentes (aparecimento de tumores), uma fácil colheita e manipulação cirúrgica do órgão e uma administração de moléculas específicas às células do parênquima mamário, as quais estão na origem do desenvolvimento neoplásico. Em terceiro lugar, a mama é um alvo de diferentes carcinogénios, químicos, virais ou físicos, o que permite o desenvolvimento de modelos únicos e complexos de progressão neoplásica. Em

quarto lugar, a maioria dos modelos animais apresenta vários pares de glândulas mamárias pelo que permite manipulações nas glândulas de um lado, servindo as contralaterais, muitas vezes, de controlo. Finalmente, a complexidade da regulação hormonal e de factores de crescimento funciona como uma abordagem sofisticada para o estudo das acções hormonais.

Isolamento de células progenitoras de cancro da mama

Uma vez que as *stem cells* têm uma vida longa e apresentam uma alta capacidade proliferativa, podem acumular mutações que as desregulam durante o processo da carcinogénese, mantendo as características funcionais das células-mãe (autorrenovação, diferenciação, telomerase activa, activação de vias antiapoptóticas, aumento da actividade dos transportadores de membrana, independência dos mecanismos de ancoragem e capacidade de migração), dando origem a uma diferenciação aberrante responsável pela heterogeneidade tumoral¹⁰.

A primeira evidência directa da existência de *stem cells* tumorais está relacionada com as situações malignas do foro hematológico, nomeadamente nas leucemias, sendo que mais recentemente foi demonstrada a sua presença em tumores sólidos (cérebro e mama)^{11,12,13,14,15}.

A existência de *stem cells* no cancro da mama foi apoiada pela identificação, através da utilização de citometria de fluxo, de uma subpopulação minoritária de células tumorais com um fenótipo CD44⁺/CD24⁻/Lineage⁻ (ou Lin⁻, que representa a exclusão de células que expressam marcadores endoteliais – CD31, e de antígenos hematopoiéticos – CD45 e TER119) que possuíam características altamente tumorigénicas. Apenas 200 células com este fenótipo formavam tumores em ratinhos NOD/SCID, enquanto a grande maioria das restantes células eram incapazes de o fazer, mesmo quando injectadas dezenas de milhares de células. Por outro lado, os tumores formados pela injeção das células isoladas previamente tinham a mesma heterogeneidade fenotípica que os tumores de onde tinham sido extraídas¹³.

Posteriormente, houve a tentativa de isolamento e cultivo *in vitro* destas células iniciadoras de cancro

da mama, utilizando uma técnica previamente usada para culturas de *stem cells* e células progenitoras mamárias, tendo-se obtido culturas de células com capacidade de autorrenovação e proliferação extensa, na forma de grupos clonais esféricos de células não aderentes, as mamosferas¹⁶. Algo de semelhante se passa nos tumores cerebrais com a formação de neurosferas. As células que formavam as mamosferas eram Conexina-43⁻/Oct-4⁺, apresentavam expressão aumentada de factores neoangiogénicos e citoprotectores e formavam tumores em ratinhos NOD/SCID com injeção de apenas 1000¹⁷.

Mais recentemente, houve o isolamento de células que, *per si*, eram capazes de regenerar uma glândula mamária inteira no murganho, *stem cells* mamárias^{6,13,18,19} que eram Lin⁻ e CD29^{hi}/CD24⁺ ou CD49^{hi}/CD24^{med}, respectivamente. Estes estudos podem abrir as portas a uma maior purificação das *stem cells* tumorais com o conseqüente desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas a estas células e erradicação dos tumores.

A gravidez e a protecção do cancro da mama

A gravidez precoce é o factor protector do cancro da mama melhor estudado, não só por representar uma situação fisiológica, mas também porque a explicação destes mecanismos preventivos pode desvendar importantes conceitos relacionados com a carcinogénese e a quimioprevenção^{20,21,22}.

As mulheres que têm uma primeira gravidez de termo antes dos 20 anos têm um risco 50% menor de desenvolver cancro da mama ao longo da sua vida, enquanto este risco é exacerbado se a mesma ocorrer depois dos 35 anos^{23,24}. Este efeito protector existe se as gravidezes forem de termo, uma vez que estudos experimentais revelaram que uma gravidez interrompida seria responsável por uma protecção parcial^{25,26}.

Uma recente meta-análise²⁷ revelou que este efeito protector da gravidez estava confinado aos cancros da mama com resposta hormonal que apresentavam positividade para os receptores de estrogénico e de progesterona (RE+/RP+)²⁸.

Durante a gravidez, há um amadurecimento da glândula mamária com diferenciação celular. Após o parto e a lactação, apesar de haver uma regressão

da glândula mamária, existem certos vestígios de características de diferenciação celular que se mantêm, quer no humano quer no rato^{29,30}.

Várias são as teorias que justificam a protecção sobre o cancro da mama concedida pela gravidez, porém existem quatro que reúnem o maior consenso e que têm simultaneamente pontos em comum. No final desta revisão, propomos um possível quinto mecanismo (ver *Teoria das stem cells e subtipos de tumores malignos na mama*).

A primeira teoria coloca o papel fulcral desta protecção devido à gravidez nas variações dos níveis hormonais, nomeadamente do estradiol, da prolactina e da hormona do crescimento^{31,32}). A segunda refere que a gravidez acarreta uma maior diferenciação celular que se mantêm após a involução, levando a uma menor capacidade proliferativa das células epiteliais e tornando-as por isso menos susceptíveis à transformação neoplásica²⁹. A terceira hipótese tem como base a aceitação da teoria das stem cells. Coloca o papel protector da gravidez na diminuição do número de stem cells mamárias com um menor número de percursores epiteliais potencialmente susceptíveis de transformação³³. Finalmente, uma vez que a protecção é exercida sobre os tumores com positividade para os receptores de estrogéneos, pode dever-se a uma alteração na resposta aos estrogéneos, de forma directa ou parácrina, através de mecanismos dependentes ou independentes dos receptores de estrogéneo (RE)²¹.

Cancro da mama, *stem cells* e receptores de estrogéneo

Recentemente, foram isoladas populações celulares do epitélio mamário do murganho com propriedades de *stem cells*^{18,19}, localizadas predominantemente na camada basal. Como as células com expressão de RE α se localizam especificamente na camada luminal, podemos inferir que as stem cells apresentam negatividade para os RE. Estes conceitos foram directamente demonstrados, por qPCR (*quantitative PCR*) e imuno-histoquímica, sabendo-se que as células epiteliais da população luminal eram enriquecidas em RE e RP (receptores de progesterona), quando comparadas com a fracção enriquecida em *stem cells*³⁴. Porém, este último grupo apresentava uma expressão aumen-

tada de EGFR/ErbB1, conceito que veio reforçar o papel das *stem cells* no cancro da mama do subtipo basal, cuja expressão de receptores é idêntica³⁵.

Por outro lado, o isolamento e a transplantação de células epiteliais mamárias basais e de células luminais RE⁺ e RE⁻, demonstrou que as células luminais RE⁺ não tinham capacidade de regenerar o tecido mamário, ao contrário das células da camada basal, que apresentavam uma actividade regenerativa exacerbada³⁶.

Desta forma, o estrogénio não parece ter um papel regulador directo sobre as *stem cells*, podendo ser a sua acção explicada através de um mecanismo parácrino. Esta relação parácrina entre as células RE⁺ e as *stem cells* pode justificar como o estrogénio pode promover o crescimento de tumores RE⁻³⁷ e como é que a ooforectomia é protectora neste tipo molecular de cancro da mama³⁸.

Stem cells tumorais e as multiresistências

Algumas células tumorais são resistentes a diversas combinações de citostáticos e por isso são consideradas multiresistentes. Esta multiresistência pode ser conferida através de diferentes mecanismos: diminuição da captação ou aumento do efluxo de fármacos; sequestro de fármacos; alteração dos alvos (topoisomerases); activação de sistemas que levam a uma eliminação de tóxicos (glutathione/glutathione-S-transferases citocromo p450); aumento da reparação de DNA lesado, inibição da apoptose; entre muitos outros^{39,40}. A multiresistência na dependência de transportadores ABC membranares representa um mecanismo fisiológico protector dos tecidos de barreira bem como das *stem cells* no adulto^{41,42}. Alguns destes transportadores são a glicoproteína P (gp-P ou *ABCB1*), a proteína de resistência do cancro da mama (BCRP ou *ABCG2*) e a proteína associada a multiresistência do tipo 1 (MRP1 ou *ABCC1*)⁴³. A localização de glicoproteína-P no tubo digestivo ajuda a prevenir a entrada de tóxicos no tubo digestivo (⁴⁴); nos túbulos renais e na membrana canalicular dos hepatócitos, auxilia na depuração de substâncias; no cérebro, nos testículos e na placenta são as responsáveis pela protecção destes santuários farmacológicos e do feto das agressões tóxicas⁴⁵. As *stem cells*, como responsáveis pela reparação dos tecidos em situação

de lesão, estão imunes a muitas agressões exteriores, sendo que as proteínas MDR (*multidrug resistant proteins*) protegem-nas de diversos tóxicos e químicos, oferecendo portanto resistência a muitos agentes citostáticos⁴⁶. As terapias direccionadas às moléculas de sinalização, aos receptores celulares, às proteínas de adesão e/ou às cadeias enzimáticas podem ser altamente eficazes na destruição maciça do tumor, embora deixe intactas as *stem cells* tumorais capazes de o reconstituir, do mesmo modo que os citostáticos destroem os folículos pilosos do couro cabeludo sem eliminarem as *stem cells* dos mesmos.

O mecanismo de acção destes transportadores consiste no efluxo de diversas substâncias que entram na célula. Esta propriedade foi usada para uma maior purificação de *stem cells*, usando substratos específicos (rodamina 123, Hoechst 33342...) e separação de células activadas por fluorescência⁴⁷.

Estudos recentes no cancro do pulmão não de pequenas células (NSCLC) demonstraram que a expressão de MDR era de 6% nos tumores bem diferenciados e de 50% nos tumores fracamente diferenciados⁴². Por outro lado, em amostras emparelhadas de cancro da mama, a percentagem de expressão de MRP1 e de MDR-1 após o tratamento com quimioterapia era significativamente superior à das amostras colhidas antes da quimioterapia^{48,49,50}.

Estudos recentes demonstram ainda que a Sobrevida desempenha um papel importante na regulação da gp-P, nomeadamente na linha celular de cancro da mama MCF-7 e nas células resistentes à adriamicina, resultando em resistência farmacológica e em inibição da apoptose⁵¹.

Teoria das *stem cells* e subtipos de tumores malignos na mama

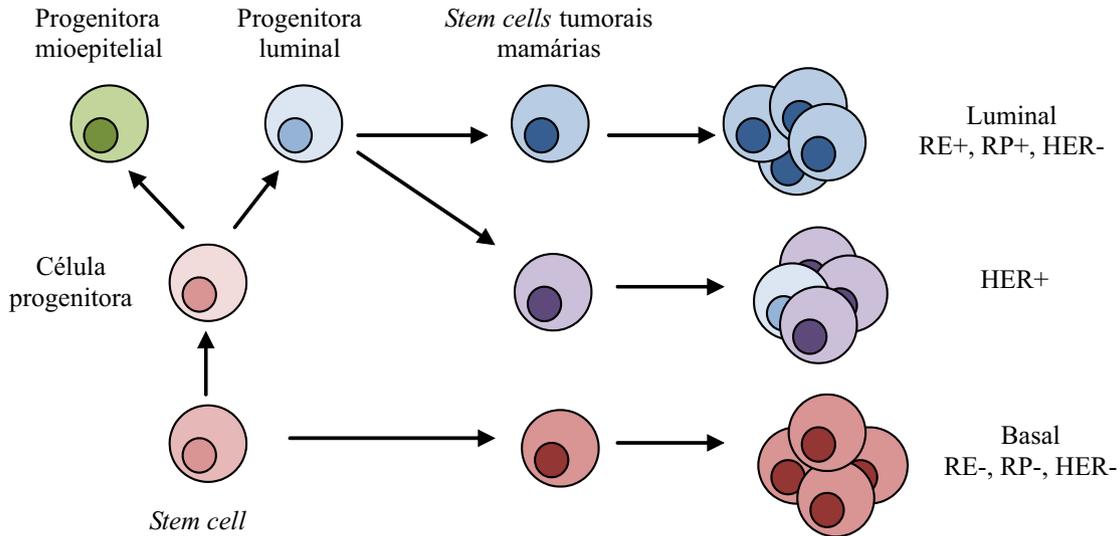
Classicamente, a heterogeneidade de células tumorais é derivada de mutações acumuladas ao longo do tempo em diferentes células que fazem de cada tumor uma entidade única e complexa. Porém, alicerçados na teoria das *stem cells*, anteriormente exposta, e sedimentados em conhecimentos adquiridos recentemente, apresentamos um modelo para a fisiopatologia do cancro, baseado em conhecimentos aceites pela comunidade científica e em resultados preliminares que obtivemos.

Durante o desenvolvimento ou regeneração de um órgão, as *stem cells* e as células progenitoras normais encontram-se em constante proliferação; porém, quando esse mesmo órgão se encontra formado ou regenerado, elas suspendem a sua proliferação, parecendo estar sujeitas a um controlo inibitório por mecanismos de retrocontrolo exercidos pelas células diferenciadas. Muitos autores acreditam que as lesões neoplásicas têm origem em células com capacidade proliferativa, *stem cells* ou células progenitoras. Assim, podemos colocar a hipótese de a proliferação de certas células tumorais ser inibida pelo tecido diferenciado circundante, tal como acontece com as células normais em desenvolvimento ou em regeneração. Estudos recentes *in vitro* e os nossos resultados *in vivo* (ainda não publicados) vêm corroborar a existência deste efeito inibitório das células normais sobre as tumorais através de influências parácrinas⁵². Hipoteticamente, uma mutação numa célula progenitora pode torná-la insensível a alguns dos mecanismos de inibição, começando esta célula transformada e com potencial neoplásico a dividir-se de forma simétrica ou assimétrica, dando origem a células idênticas à inicial ou mais diferenciadas, respectivamente.

Admitindo a monoclonalidade dos tumores, a existência de diferentes tipos moleculares de tumores pode-se dever aos diferentes níveis na hierarquia de células progenitoras onde as mutações podem ocorrer. As alterações nas células mais primitivas e indiferenciadas poderiam estar na origem dos tumores mais indiferenciados e agressivos; do mesmo modo, as células progenitoras, oriundas das primeiras, poderiam dar origem a tumores mais diferenciados e de melhor prognóstico (Figura 1).

No que diz respeito à glândula mamária, as novas técnicas que estudam em simultâneo as alterações genéticas em centenas de genes (microarray) permitem identificar carcinomas que, tal como as *stem cells* normais, são negativos para RE, RP e HER-2, os chamados triplo-negativos, muitos dos quais têm origem em células basais que estão situadas precisamente nas zonas onde também se situam as *stem cells*. Em seguida, encontramos por ordem decrescente de agressividade, os tumores que expressam

Figura 1. Possível modelo explicativo da origem dos subtipos moleculares de cancro da mama.



apenas o HER2, os que combinam a apresentação do HER2 com os receptores de estrogénio e de progesterona e ainda os que apresentam apenas receptores hormonais sendo estes últimos os mais diferenciados e os menos agressivos (Figura 1). Acreditamos que a maior diferenciação destes tumores esteja associada a uma maior susceptibilidade à inibição exercida pelas células diferenciadas circundantes.

Desta forma, podemos explicar o efeito protector da gravidez através do maior contingente de células diferenciadas que existe nesta situação e que exerceria a acima referida influência inibitória. Por outro lado, a especificidade desta protecção em relação aos tumores que apresentam receptores hormonais seria explicada devido à maior diferenciação e à maior susceptibilidade destes tumores aos efeitos antiproliferativos. Um estudo revelou que células epiteliais da glândula mamária de ratinhas virgens expostas ao DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene), potente carcinogénico, e transplantadas para ratinhas após a gravidez apresentavam menor incidência de tumores, quando comparada com ratinhas virgens que tinham recebido as mesmas células⁵³. Este estudo demonstra a relevância do meio circundante na carcinogénese.

Alguns dados epidemiológicos apoiam a existência de uma influência inibitória do epitélio glandular mamário na progressão tumoral, nomeadamente a maior prevalência de tumores mamários na peri e pós meno-

pausa, período da vida da mulher em que há uma regressão do epitélio mamário. Acresce-se que a maioria dos tumores mamários que surge ainda na idade fértil corresponde aos tumores mais indiferenciados e agressivos que, por hipótese, são os menos susceptíveis às influências inibitórias do epitélio diferenciado.

Considerar que as células diferenciadas têm um efeito controlador do crescimento das células tumorais pode ainda explicar a diferença de susceptibilidade aos carcinogénios em função da idade, por parte do epitélio mamário do rato. Os ratos fêmea com 50-55 dias de idade, com um epitélio ainda pouco diferenciado, produzem 2 a 3 vezes mais tumores do que os ratos fêmea com 100 dias, os quais teriam um epitélio diferenciado mais desenvolvido capaz de exercer o hipotético efeito inibitório^{29,54,55}. Porém, enquanto a maioria dos carcinomas submetidos a um carcinogénio entre os 50 e os 55 dias apresentam receptores hormonais^{56,57}, os tumores que surgem após administração do carcinogénio no rato fêmea com mais de 90 dias ou múltipara são independentes de hormonas⁵⁷.

Metaplasias e metástases

Admitindo o modelo previamente exposto, podemos explicar ainda os conceitos de metaplasia e de metástase. Quando mutações ou pressões selectivas do microambiente impõem a uma *stem cell* uma diferenciação errónea, surge uma célula progenitora de

outra linhagem (a qual é característica de outro tecido). As lesões que apresentam células deste tipo, as metaplasias, são caracteristicamente pré-neoplásicas e não estariam sujeitas ao sugerido efeito inibitório do tecido diferenciado respectivo, dando então origem a tumores de características diferentes das que seriam de esperar no órgão em causa (ex. metaplasia intestinal no esófago de Barret e o adenocarcinoma do esófago).

Por outro lado, quando uma célula alterada com capacidade proliferativa invade os tecidos e atinge outro órgão através da circulação sanguínea ou linfática, poderia dar origem a uma metástase, caso encontre receptores ou um nicho apropriado, uma vez que no órgão receptor não existiria o mesmo efeito inibitório que o órgão dador hipoteticamente exerce.

Modelo iniciação/promoção/progressão

Todos os conceitos anteriormente citados podem ser integrados no modelo iniciação/promoção/progressão do cancro. A iniciação dar-se-ia no momento da mutação numa via reguladora específica da *stem cell* ou da célula progenitora que, porém, seria controlada por um equilíbrio precário entre os factores estimuladores e a inibição exercida pelo meio envolvente diferenciado. Quando este equilíbrio se perdesse, por exemplo numa situação de inflamação crónica com destruição do tecido diferenciado e do hipotético efeito inibitório, começaria então a fase de promoção neoplásica com proliferação celular ilimitada. Mais tarde, haveria acumulação de alterações nas células tumorais, com consequente invasão tecidual e disseminação sistémica, surgindo a fase de progressão.

Considerando todas estas afirmações, podemos afirmar, de uma forma talvez polémica pela oposição que revela face às ideias instaladas, que a fisiopatologia do cancro é em tudo similar nos diversos órgãos, apesar da existência de um processo multifactorial e da heterogeneidade fenotípica poder ter por base a variedade de agentes etiológicos, as diferenças entre as hierarquias celulares de cada tecido (desde as células mais primitivas às mais diferenciadas) e as diferentes células que podem ser mutadas dentro de cada hierarquia, bem como uma influência inevitável do microambiente envolvente.

Considerações finais

Os estudos recentes mostram-nos que as *stem cells* podem potencialmente desenvolver tumores, se sofrerem um desequilíbrio ou perturbação, interna ou externa. Aceitar esta ideia não implica uma ruptura com teorias passadas, mas antes abordagens adicionais para as quais a investigação sobre o cancro está a conduzir. A evidência da existência de células com e sem capacidade tumorigénica dentro do tumor, faz-nos envidar todos os esforços no sentido de isolarmos ou pelo menos de caracterizarmos as vias reguladoras destas células de forma a construir um arsenal terapêutico suficientemente eficaz para curar o cancro. Muitas são as áreas do cancro por desvendar, mas o desenvolvimento da interligação com as *stem cells* foi um passo importante nesse sentido. Desde a integração dos mecanismos hormonais, vias de regulação e angiogénese, até às influências ambientais e genéticas na carcinogénese e aos resultados epidemiológicos inexplicáveis, passando pela explicação das metástases e das recidivas, encontramos uma vastidão de conhecimentos por adquirir.

Vários grupos têm procurado estruturar as noções clássicas passadas nos conhecimentos mais recentes, tentando estudar os mecanismos etiológicos e fisiopatológicos do cancro, tendo sempre em vista o diagnóstico precoce e o tratamento. Busca-se um tratamento curativo ou que transforme o cancro numa doença crónica, em vez de tentar apenas paliar ou obviar o sofrimento tanto quanto possível, maximizando a qualidade de vida, sem esperança de um aumento quantitativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Mimeault M, Batra SK. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. *Stem Cells* 2006; 24:2319-2345.
2. Potter VR. Phenotypic diversity in experimental hepatomas: The concept of partially blocked ontogeny. *Br J Cancer* 1978; 38: 1-23.
3. Fialkow P. Clonal origin of human tumors. *Annu Rev Med* 1979;30:135-143.
4. Trosko JE, Chang CC. Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicol Lett* 1989; 49: 283-295.
5. Trosko JE. The Role of Stem Cells and Gap Junctional Intercellular Communication in Carcinogenesis. *J Biochem Mol Biol* 2003; 36: (1) 43-48.
6. Kalirai H, Clarke RB. Human breast epithelial stem cells and their regulation. *J Pathol* 2006; 208: 7-16.

7. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Research* 2005; 7(3): 86-95.
8. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, Huang Y, Hu X, Su F, Lieberman J, Song E. Let-7 Regulates Self-Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* 2007; 131: 1109-1123.
9. Medina D. The mammary gland: A unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia* 1996; 1:(1) 5-19.
10. Dontu G, Wicha MS. Survival of Mammary Stem Cells in Suspension Culture: Implications for Stem Cell Biology and Neoplasia. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005; 10(1): 75-86.
11. Bonnet D, Dick JA. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-7.
12. Warner J, Wang J, Hope K, Jin L, Dick J. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004; 23:23.
13. Al-Hajj M, Wicha M, Benito-Hernandez A, Morrison S, Clarke M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:3983-8.
14. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003;63:5821-8.
15. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396-401.
16. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & Dev* 2003; 17: 1253-1270.
17. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Res* 2005; 65(13):5506-11.
18. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 2006; 439:84-8.
19. Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, Li HJ, Eaves CJ. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006; 439:993-7.
20. Martins FC, Botelho MF, Laranjo M, Cabrita AM, Torgal I, de Oliveira CF. Pregnancy and its role in breast cancer. *Oncol Rev* 2008; 2:163-167.
21. Britt K, Ashworth A, Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:907-933.
22. Sivaraman L, Medina D. Hormone-Induced Protection Against Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002; 7(1):77-92.
23. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ* 1970; 43: 209-221.
24. Trichopoulos D, Hsieh CC, MacMahon B, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. Age at any birth and breast cancer risk. *Int J Cancer* 1983; 31:701-704.
25. Sinha DK, Pazik JE, Dao TL. Prevention of mammary carcinogenesis in rats by pregnancy: effect of full-term and interrupted pregnancy. *Br J Cancer* 1988; 57:390-394.
26. Russo J, Rivera R, Russo IH. Influence of age and parity on the development of the human breast. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 23:211-218.
27. Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. *Breast Cancer Res* 2006; 8 R43.
28. Potter JD, Cerhan JR, Sellers TA, McGovern PG, Drinkard C, Kushi LR, Folsom AR. Progesterone and estrogen receptors and mammary neoplasia in the Iowa Women's Health Study: how many kinds of breast cancer are there? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:319-326.
29. Russo J, Tay LK, Russo IH. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1982; 2:5-73.
30. Cardiff RD, Wellings SR. The comparative pathology of human and mouse mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4:105-122.
31. Emerman JT, Leahy M, Gout PW, Bruchovsky N. Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients. *Horm Metab Res* 1985; 17:421-424.
32. Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21:427-433.
33. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:832-844.
34. Asselin-Labat ML, Shackleton M, Stingl J, Vaillant F, Forrest NC, Eaves CJ, Visvader JE, Lindeman GJ. Steroid hormone receptor status of mouse mammary stem cells. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98:1011-1014.
35. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12(11):537-544.
36. Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A, Smalley MJ. Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *J Cell Biol* 2007; 176:19-26.
37. Gupta PB, Proia D, Cingoz O, Weremowicz J, Naber SP, Weinberg RA, Kuperwasser C. Systemic stromal effects of estrogen promote the growth of estrogen receptor negative cancers. *Cancer Res* 2007; 67:2062-2071.
38. Nissen-Meyer R. 'Prophylactic' ovariectomy and ovarian irradiation in breast cancer. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1964; 20:527-530.
39. Filipits M. Mechanisms of cancer: multidrug resistance. *Drug Discov Today* 2004; 1:229-234.
40. O'Driscoll L, Clynes M. Biomarkers and Multiple Drug Resistance in Breast Cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6:365-384.
41. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204(3):216-237.
42. Donnenberg VS, Landreneau RJ, Donnenberg AD. Tumorigenic stem and progenitor cells: Implications for the therapeutic index of anti-cancer agents. *J Control Release* 2007; 122:385-391.
43. Chang X. A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26:15-37.
44. Sparreboom A, van Asperen J, Mayer U, Schinkel AH, Smit JW, Meijer DK, Borst P, Nooijen WJ, Beijnen JH, van Tellingen O. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:2031-2035.
45. Lankas GR, Wise LD, Cartwright ME, Pippert T, Umbenhauer DR. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice. *Reprod Toxicol* 1998; 12:457-463.
46. Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol* 2005; 45:872-877.
47. Bertonecello I, Williams B. Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and Rhodamine 123 staining. In: *Methods in Molecular Biology: Flow Cytometry Protocols* (2nd edition). Hawley TS, Hawley RG (eds.). Humana Press Inc; 2004: 181-200.
48. Rudas M, Filipits M, Taucher S, Stranzl T, Steger GG, Jakesz R, Pirker

- R, Pohl G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2003; 81:149–157.
49. Leonessa F, Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10:43-73.
50. Lizard-Nacol S, Genne P, Coudert B, Riedinger JM, Arnal M, Sancy C, Brunet-Lecomte P, Fargeot P. MDR1 and thymidylate synthase (TS) gene expressions in advanced breast cancer: relationships to drug exposure, p53 mutations, and clinical outcome of the patients. *Anticancer Res* 1999; 19:3575-3581.
51. Liu F, Xie Z, Cai G, Jiang Y. The Effect of Survivin on Multidrug Resistance Mediated by P-Glycoprotein in MCF-7 and Its Adriamycin Resistant Cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30(12): 2279-2283.
52. Toillon RA, Lagadec C, Page A, Chopin V, Sautière PE, Ricort JM, Lemoine J, Zhang M, Hondermarck H, Le Bourhis X. Proteomics Demonstration That Normal Breast Epithelial Cells Can Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells through Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and Maspin. *Mol Cell Proteomics* 2007; 6(7):1239-47.
53. Abrams TJ, Guzman RC, Swanson SM, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S. Changes in the parous rat mammary gland environment are involved in parity associated protection against mammary carcinogenesis. *Anticancer Res* 1998; 18:4115–4121.
54. Grubbs CJ, Peckham JC, Cato KD. Mammary carcinogenesis in rats in relation to age at time of N-nitroso-N-methylurea administration. *J Natl Cancer Inst* 1983; 70:209–212.
55. Haslam SZ. Age as a modifying factor of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in the Lewis rat. *Int J Cancer* 1979; 23:374–379.
56. Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten MJ. Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 1990; 62:244-278.
57. Moon RC. **Influence of pregnancy and lactation** on experimental mammary carcinogenesis. In: Banbury Report 8: Hormones and Breast Cancer. Pike MC, Siiteri P and Welsch CW (eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1981: 353–364.
-