



Raquel Alexandra Miguéis Henriques Ferreira

AS CÉLULAS ESTAMINAIS CANCERÍGENAS COMO ALVOS PARA NOVAS TERAPÊUTICAS DO CANCRO DA MAMA

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AS CÉLULAS ESTAMINAIS CANCERÍGENAS COMO ALVOS PARA NOVAS TERAPÊUTICAS DO CANCRO DA MAMA

Monografia realizada no âmbito da unidade curricular Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
orientada pela Professora Doutora Alexandrina Ferreira Mendes e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de
Coimbra

Raquel Alexandra Miguéis Henriques Ferreira

2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Raquel Alexandra Miguéis Henriques Ferreira, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010125676, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Relatório de Estágio apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia deste Relatório de Estágio, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de Setembro de 2016

(Raquel Alexandra Miguéis Henriques Ferreira)

A Orientadora da Monografia

(Doutora Alexandrina Ferreira Mendes)

A Orientanda

(Raquel Alexandra Miguéis Henriques Ferreira)

Um agradecimento sincero,

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e todo o seu corpo docente e não docente por todo o conhecimento e orientações prestadas ao longo deste percurso académico.

À Doutora Alexandrina Ferreira Mendes por toda a orientação e apoio prestados, os quais foram essenciais na realização desta monografia.

Aos meus pais e irmã que sempre me apoiaram e tornaram possível a realização deste sonho.

A todos os meus amigos por estarem sempre presentes.

A Coimbra, cidade dos estudantes.

Índice

Abreviaturas.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
1. Introdução.....	1
2. Hipóteses e modelos para a génese e desenvolvimento do cancro.....	2
2.1 Carcinogénese	2
2.2 Células Estaminais cancerígenas	2
2.3 Origem das CSC	3
2.4 Propriedades das CSC	4
3. A hipótese das BCSC	5
4. Heterogeneidade e origem dos tumores mamários	5
5. Mecanismos de origem e plasticidade das BCSC.....	6
5.1 Vias de sinalização celular envolvidas nas BCSC.....	7
5.2 EMT e MET e suas implicações na heterogeneidade tumoral, na metastização e na resistência à terapêutica.....	11
5.3. Papel do nicho na plasticidade das BCSC.....	14
6. Mecanismos de resistência das BCSC à quimioterapia convencional	16
6.1 Papel do nicho na resistência à terapêutica	18
7. Conclusões e perspetivas futuras	19
8. Referências bibliográficas.....	21

Abreviaturas

AACR - Associação Americana para a Investigação do Cancro

ABC - *ATP-binding cassette*

ALDH - aldeído desidrogenase

AML - leucemia mieloide aguda

BCRP – proteína de resistência do cancro da mama

BCSC – células estaminais cancerígenas do cancro da mama

BSO – butionina sulfoximina

CSC - células estaminais cancerígenas

EMT - transição epitelial mesenquimal

GABA - ácido γ -aminobutírico

GSI - inibidores da γ -secretase

HIF – fator induzível por hipoxia

IL – interleucinas

JAK - cinases de tirosina *Janus Kinases*

MDR – transportador de multirresistência à terapêutica

MET - transição mesenquimal-epitelial

NAD - dinucleótido de nicotinamida e adenina

NF- κ B – factor nuclear kappa B

NOD/SCID - murganhos diabéticos não obesos e com imunodeficiência combinada severa

NSC - células estaminais normais

P-gp – glicoproteína P

RANKL – ligando do recetor ativador do NF- κ B

ROCK - proteína cinase associada a Rho

ROS – espécies reativas de oxigénio

shRNA - *short hairpin RNA*

TGF- β – fator de crescimento transformante β

TACE –enzima conversora do fator de necrose tumoral- α

VEGFR-3 – recetor do fator de crescimento vascular endotelial 3

Resumo

As células estaminais cancerígenas do cancro da mama (BCSC) são uma pequena população celular heterogénea que exhibe propriedades das células estaminais. Devido às suas capacidades de autorrenovação e de diferenciação, estas são capazes de induzir o crescimento tumoral, formação de metástases, recorrência tumoral e resistência à terapêutica. Múltiplos mecanismos são considerados fatores subjacentes às propriedades apresentadas pelas BCSC. Tais mecanismos incluem as vias de sinalização celular, tais como Wnt, Notch e Hedgehog, e estímulos libertados pelo microambiente tumoral, os quais são responsáveis pela ativação da transição epitelial-mesenquimal, uma característica central da heterogeneidade das células tumorais e da resistência farmacológica. Assim, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas capazes de matar todas as BCSC é uma necessidade urgente. A caracterização das BCSC e dos mecanismos a elas subjacente é essencial para a identificação de potenciais alvos para novas estratégias terapêuticas que isoladamente ou em combinação com a quimio e radioterapia convencionais, possam aumentar a eficácia terapêutica e prevenir a recidiva tumoral e a metastização em doentes com cancro da mama.

Palavras-chave: Alvos terapêuticos; cancro da mama; células estaminais cancerígenas; plasticidade; resistência à terapêutica; transição epitelial-mesenquimal

Abstract

Breast Cancer Stem Cells (BCSC) are a small heterogeneous cell population in breast cancer that displays stem cell properties. Due to their self-renewing and differentiation capabilities, they are able to induce tumour growth, metastases, recurrence and multiple drug resistance. Multiple mechanisms are considered underlying factors for the properties presented by BCSC. Such mechanisms include signalling pathways, like Wnt, Notch and Hedgehog, and stimuli released by the tumour microenvironment, which are responsible for activation of epithelial-mesenchymal transition, a central feature of tumour cell heterogeneity and drug resistance. Therefore, new therapeutic approaches able to kill all BCSC are an urgent need. The characterization of BCSC and their underlying mechanisms is essential for the identification of potential targets for new therapeutic strategies that isolated or in combination with conventional chemo- and radiotherapies, can improve efficacy and prevent tumour relapse and metastasis formation in breast cancer patients.

Keywords: Breast cancer; epithelial-mesenchymal transition; plasticity; stem cells; therapeutic resistance; therapeutic targets

I. Introdução

O cancro é um conjunto de doenças que apresenta elevada incidência e mortalidade em todo o mundo. Este conjunto de doenças é caracterizado pela proliferação celular descontrolada, que origina o tumor primário, e pela migração e invasão de outros tecidos por células do tumor primário, formando metástases ou tumores secundários à distância. Os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento podem ser internos (alterações genéticas e epigenéticas) e/ou externos (poluição, tabaco, álcool, exposição a radiações, entre outros). No entanto, a redução da exposição a fatores externos e a deteção precoce de algumas alterações morfológicas e funcionais em certas partes do corpo, como por exemplo a presença de nódulos na mama ou a ocorrência de tosse persistente sem causa aparente, podem ser sinais de alerta, úteis na prevenção do desenvolvimento e progressão da doença.(American Cancer Society, 2016)

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, em 2012 ocorreram 14 milhões de novos casos e 8.2 milhões de mortes por cancro em todo o mundo, das quais 521 000 foram devidas ao cancro da mama.(World Health Organization, 2011)

O diagnóstico tardio e a resistência à terapêutica são os principais fatores que contribuem para a elevada mortalidade. Nas últimas décadas, têm sido realizados inúmeros estudos de modo a conhecer os mecanismos moleculares do cancro, com vista a desenvolver metodologias de diagnóstico e terapêutica eficazes.(American Cancer Society, 2016; World Health Organization, 2011)

O Cancro da Mama é o cancro mais comum entre mulheres de todo o mundo. Este tipo de cancro apresenta diferentes subtipos moleculares e histológicos que podem ocorrer por alterações genéticas e epigenéticas. Têm sido aplicadas diferentes modalidades terapêuticas que incluem cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. No entanto, ainda se observam muitos casos de resistência à terapêutica e recidiva da doença.(Schwarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016)

O conceito mais recente associado à falha na terapêutica e reincidência tumoral é o das Células Estaminais Cancerígenas (*Cancer Stem Cells - CSC*). Em 2006, a Associação Americana para a Investigação do Cancro (*American Association for Cancer Research - AACR*) definiu célula estaminal cancerígena como uma “célula dentro do tumor que possui capacidade de autorrenovação e de originar linhagens heterogéneas das células cancerosas que constituem o tumor.”(Clarke *et al.*, 2006) O desenvolvimento de estratégias

terapêuticas que atuem e destruam este tipo de células poderá permitir um avanço importante no controlo do cancro.

2. Hipóteses e modelos para a génese e desenvolvimento do cancro

2.1 Carcinogénese

O cancro é uma doença complexa que apresenta diversos mecanismos celulares e moleculares associados à sua formação e progressão. Sabe-se que a formação do cancro é devida à acumulação de mutações pelas células dos tecidos. No entanto, é difícil determinar qual o tipo de célula de origem do cancro, uma vez que este é caracterizado por heterogeneidade celular.

Atualmente existem dois modelos que procuram explicar esta característica que contribui para a sua formação. O modelo de evolução clonal/estocástico defende que qualquer célula normal pode originar uma neoplasia maligna, através da aquisição aleatória de alterações genéticas e epigenéticas ao longo do tempo. Esta hipótese é sustentada por estudos clínicos de leucemias de células B linfoblásticas. O outro modelo, modelo hierárquico/CSC, defende que existe uma hierarquia entre as células cancerígenas, sendo que as CSC são as que se encontram no seu topo. Estas sofrem proliferação excessiva e descontrolada dando origem a diversas linhagens de células diferenciadas, o que constitui um evento precoce da carcinogénese. A explicação deste modelo tem como base estudos da linha germinativa e de cancro da mama. (Dawood *et al.*, 2014; Souza e Schenka, 2015; White e Lowry, 2015; Yoshida e Saya, 2016) Embora este modelo se baseie na organização hierárquica entre as células nos tecidos normais e em tumores, não explica de onde derivam as CSC. Como vai ser referido posteriormente, as CSC podem provir de diferentes tipos de células. Assim, a hipótese da origem do cancro pode sustentar-se nestes dois modelos, mas tende a ser mais complexa do que até agora foi demonstrado. (Guo, 2014).

2.2 Células Estaminais cancerígenas

O conceito de Células Estaminais Cancerígenas poderá ter surgido a partir de publicações de Cohnheim. Este autor apresentou, em 1889, a hipótese de que durante a embriogénese são produzidas mais células do que aquelas necessárias para o

desenvolvimento de um organismo e que as células remanescentes poderão estar envolvidas na carcinogénese. (Sell, 2004) No entanto, a primeira evidência sólida da existência deste tipo de células capazes de originar cancro apenas surgiu em 1997 por Bonnet e Dick, que demonstraram que apenas as células $CD34^+/CD38^-$ imaturas derivadas de doentes com leucemia mieloide aguda (*Acute Myeloid Leukemia - AML*) eram capazes de induzir condições malignas em murganhos diabéticos não obesos e com imunodeficiência combinada severa (*non-obese diabetic / severe combined immunodeficiency disease - NOD/SCID*) (Bonnet e Dick, 1997). Deste então, tem sido demonstrada a existência de células neoplásicas com características de células estaminais em vários tipos de tumores malignos. (Ajani *et al.*, 2015; Jaworska *et al.*, 2015)

2.3 Origem das CSC

A exata explicação da origem das CSC permanece ainda desconhecida. No entanto, existem três hipóteses para a explicar, das quais nenhuma é exclusiva, que referem que as CSC provêm de:

- Células estaminais normais adultas que acumulam mutações genéticas e modificações epigenéticas, o que é favorecido pelo seu longo tempo de vida;
- Células progenitoras, resultantes da primeira diferenciação de células estaminais;
- Células diferenciadas maduras, após sofrerem transformação, desdiferenciação e aquisição de características de células estaminais (capacidade de autorrenovação e de diferenciação em múltiplas linhagens celulares). (Schwarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016)

A origem a partir de células estaminais normais (*Normal Stem Cells - NSC*) tende a ser a hipótese mais plausível para a formação das CSC, devido ao seu longo tempo de vida, presença em vários tecidos e partilha de características biológicas com as CSC. No entanto, existe evidência da sua origem a partir de células progenitoras e células diferenciadas maduras, por exemplo, nos subtipos basal e luminal de cancro da mama, respetivamente. Tal facto pode ocorrer por transição epitelial mesenquimal (*epithelial-mesenchymal transition - EMT*), característica que dá plasticidade às células e permite que transitem de estados diferenciados para o estado estaminal. (Brookset *et al.*, 2015; Schwarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016)

2.4 Propriedades das CSC

As CSC foram assim denominadas pois apresentam as mesmas propriedades fundamentais das NSC, embora de forma desregulada. Essas propriedades estão fortemente relacionadas com o processo de formação e crescimento tumoral, e incluem:

- Autorrenovação por mitose simétrica (a célula estaminal dá origem a duas células estaminais filhas) ou assimétrica (a célula estaminal dá origem a uma célula estaminal filha e a uma célula em diferenciação) – permite a perpetuação das células estaminais e assim a manutenção e crescimento do tumor;
- Manutenção do comprimento dos telómeros – permite a divisão celular contínua, o que favorece a autorrenovação;
- Capacidade de diferenciação celular – responsável pela heterogeneidade intratumoral;
- Plasticidade celular através do mecanismo de transição epitelial-mesenquimal (EMT),envolvida na formação de CSC, por desdiferenciação celular, e na formação de metástases distantes, por aquisição de capacidade de migração para outros tecidos;
- Baixa taxa de proliferação e longo tempo de vida que ocorre essencialmente em fase quiescente – falha da terapêutica convencional, que atua essencialmente em células em divisão;
- Elevada expressão de transportadores de efluxo da família ABC (*ATP-binding cassette*)que lhes confere resistência à terapêutica citostática convencional.(Guo, 2014; Schawarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016; Souza e Schenka, 2015)

Para além destas propriedades, as CSC apresentam robustez em certas características biológicas, como a resistência ao stress oxidativo, a rápida reparação de danos do DNA (por exemplo, aqueles que são causados pelos fármacos) e a adaptação ao microambiente hiper-inflamatório ou hiponutrido, pelo desencadear de mecanismos que promovem a imunossupressão e a angiogénese. Deste modo, as CSC são capazes de resistir à terapêutica e provocar um estado de Doença Residual Mínima que permite que estas células voltem a proliferar, resultando na recorrência e metastização do cancro. (Kauret *al.*, 2014; Yao *et al.*, 2015; Yoshida e Saya, 2016)

3. A hipótese das BCSC

O primeiro relato da existência de CSC em tumores sólidos foi publicado por Al-Hajj *et al.* em 2003. Estes investigadores provaram que apenas a linha celular $CD44^+/CD24^{-/low}/lin^-$, isolada de Cancro da Mama humano, era capaz de induzir a formação de tumores em murganhos NOD/SCID. (Al-Hajj *et al.*, 2003). Esta descoberta foi mais tarde confirmada por outros grupos de investigação. (Souza e Schenka, 2015)

Estudos posteriores identificaram a enzima aldeído desidrogenase I (*Aldehyde dehydrogenase* - ALDH1) como potencial marcador para a identificação das CSC do Cancro da Mama (*Breast Cancer Stem Cells* – BCSC), uma vez que as células com esse marcador apresentam características fenotípicas e funcionais das células estaminais mamárias, tanto normais como cancerígenas. O aumento da atividade de ALDH1 ocorre em células com capacidade tumorigénica e de autorrenovação. (Ginestier *et al.*, 2007) Uma vez que as BCSC representam apenas cerca de 1 % do tumor, ensaios que detetam células com este fenótipo têm sido frequentemente utilizados para as identificar. Mesmo com a descoberta de outros marcadores das BCSC, os fenótipos $CD44^+/CD24^{-/low}/lin^-$ e ALDH1 continuam a ser os mais utilizados para as identificar. (Schwarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016; Velasco-Velazquez *et al.*, 2012)

4. Heterogeneidade e origem dos tumores mamários

O Cancro da Mama não é uma simples e única doença, mas sim um complexo grupo de doenças que apresenta elevada heterogeneidade intra e intertumoral. Como acima referido, a heterogeneidade intratumoral é, provavelmente, devida à diferenciação celular das BCSC que origina diversos subclones celulares dentro do tumor. Estes incluem diferentes CSC, células progenitoras e células diferenciadas não-proliferativas. A heterogeneidade intertumoral está intimamente relacionada com a célula de origem e com as alterações genéticas precoces que irão ser responsáveis pela formação de um subtipo específico do cancro em cada indivíduo. (Burrell *et al.*, 2013; Smalley *et al.*, 2013; Souza e Schenka, 2015)

O Cancro da Mama foi classificado em diferentes subtipos com base em diferentes parâmetros moleculares, que têm em conta a estrutura e expressão de genes, e parâmetros histológicos. Os subtipos tumorais mais relatados até ao momento são os subtipos basal, luminal A, luminal B e de sobreexpressão de HER2. No entanto, devido ao avanço da

tecnologia e melhor capacidade em determinar os perfis de tumores individuais, não há ainda consenso sobre que subtipos realmente existem e qual a relação entre os parâmetros moleculares e histológicos, sendo que a sua classificação é ainda imperfeita.(Brookset *al.*, 2015; Sreekumaret *al.*, 2015)

Um dos pontos-chave na formação de cada subtipo tumoral é a célula que lhe dá origem. Estudos recentes demonstraram que as NSC da mama não são necessariamente as células de eleição para iniciação tumoral, sendo mais provável que os diferentes subtipos moleculares derivem de células em diferentes níveis de diferenciação. Vários autores concluíram que células progenitoras luminais poderão estar na origem do subtipo basal. Em concordância com esta evidência, outros estudos revelaram que tumores contendo mutações no gene supressor tumoral *Brcal* são enriquecidos em células progenitoras luminais que sofrem posterior diferenciação, originando um tumor de subtipo basal. No caso dos tumores do subtipo luminal A e B, a célula de origem foi associada a uma célula luminal madura. Os estudos com o objetivo de elucidar a célula de origem tumoral são normalmente realizados em murganhos podendo haver limitações na extrapolação dos resultados para o cancro da mama humano. Por esta razão, não foram ainda apontadas as células de origem de todos os subtipos de cancro da mama. A descoberta da célula de origem de cada subtipo tumoral poderá ter uma importância significativa no desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento eficazes.(Brookset *al.*, 2015; Smalleyet *al.*, 2013; Sreekumaret *al.*, 2015)

5. Mecanismos de origem e plasticidade das BCSC

A desregulação dos mecanismos de autorrenovação e de diferenciação celular, assim como a aquisição de propriedades estaminais através da desdiferenciação celular são processos que dão origem às BCSC. Múltiplas vias de sinalização estão envolvidas tanto na desregulação destes mecanismos, como no processo de EMT que confere plasticidade às células. Algumas das vias de sinalização associadas a estes processos são as vias Wnt, Notch e Hedgehog.(Bozorgi,et *al.*, 2015)

A plasticidade celular refere-se à capacidade das células transitarem entre estados diferenciados e não diferenciados, e é ilustrada pelo processo reversível de EMT. O conceito da EMT tem sido associado à disseminação do tumor para locais distantes, onde, mais tarde, foi descoberto que ocorre o processo reverso de transição mesenquimal-epitelial

(*mesenchymal-epithelial transition* - MET) responsável pela expansão celular, ocorrendo assim a formação e manutenção de metástases. Recentemente, foi descrita uma ligação entre a EMT e as BCSC, particularmente no que diz respeito à formação destas células. A EMT está envolvida na plasticidade celular que permite a conversão do estado diferenciado em estaminal. Assim, percebeu-se que, mediadas por alterações do microambiente e das vias de sinalização, as células cancerosas podem transitar entre estes dois estados. Estas descobertas têm um elevado peso a nível clínico, pois demonstraram que a eliminação de todas as BCSC por um agente citotóxico não significa a cura da doença, uma vez que se pode manter uma massa de tumor residual que pode sofrer desdiferenciação para BCSC e promover o novo crescimento tumoral. (Guo, 2014; Smalley *et al.*, 2013)

5.1 Vias de sinalização celular envolvidas nas BCSC

As vias de sinalização, como Wnt, Notch e Hedgehog (Figura 1), têm uma influência fundamental durante a embriogénese e na homeostasia do tecido adulto, através da estrita regulação das NSC. A desregulação aberrante destas vias resulta em processos carcinogénicos, consequentes à formação e manutenção das BCSC, assim como em mecanismos de resistência à terapêutica. (Bozorgiet *et al.*, 2015)

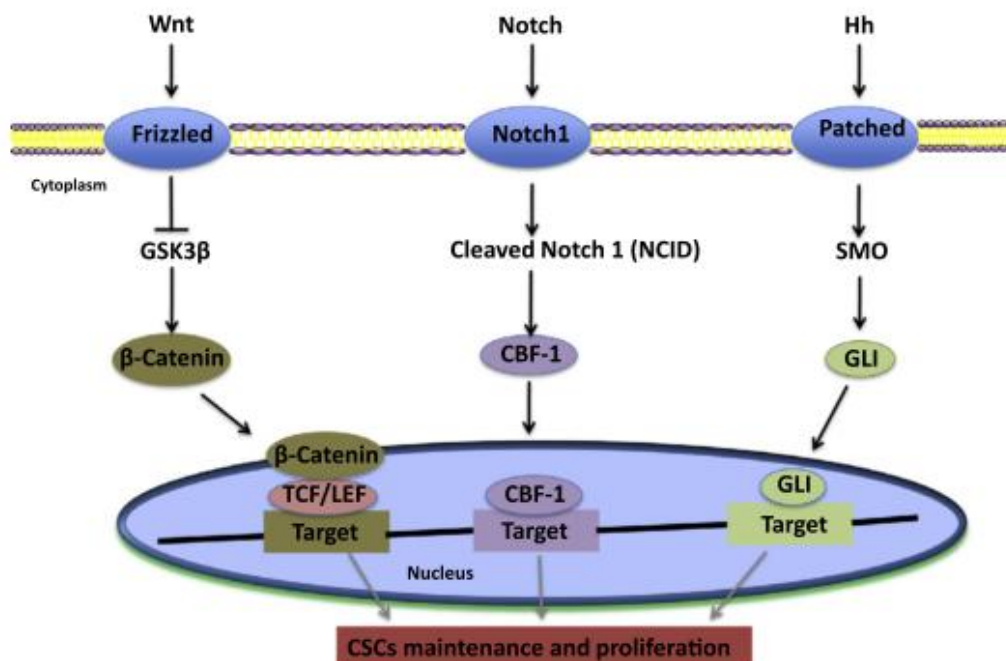


Figura 1 – Esquema simples das vias de sinalização Wnt, Notch e Hedgehog (Hh). A ativação das vias Wnt, Notch e Hh desencadeia uma cascata de sinalização que ativa os fatores de transcrição β -catenina, CBF-1 e GLI, respetivamente, ocorrendo transcrição de genes-alvos responsáveis pela manutenção e proliferação das BCSC. Reproduzido de Geng *et al.*, 2014.

A via de sinalização Wnt é a via que se encontra mais bem caracterizada, apresentando evidência cumulativa que sugere que está envolvida na carcinogénese, no desenvolvimento tumoral e na formação de metástases, uma vez que regula os mecanismos de proliferação, diferenciação, migração e invasão das BCSC e é capaz de desencadear o processo de EMT. Os ligandos Wnt provenientes do microambiente ligam-se ao receptor Frizzled e coreceptor LRP 5/6, ativando a via de sinalização respetiva. Esta ativação desloca o complexo de regulação APC/Axina/GSK-3 β e promove a translocação e acumulação de β -catenina no núcleo que assim ativa a transcrição de genes envolvidos nos processos estaminais e de EMT, incluindo a Ciclina D, c-MYC, AXIN2, Survivina e Snail. A ausência de ligandos Wnt conduz à degradação proteossomal da β -catenina pelo complexo de regulação APC/Axina/GSK-3 β , o que impede a ativação da transcrição genética. (Ajani *et al.*, 2015; Borah *et al.*, 2015; Rangel *et al.*, 2016) A nível tumoral, esta via apresenta ativação aberrante que se deve a diferentes mecanismos, entre os quais mutações na Axina ou na β -catenina, hipermetilação do gene APC ou até sobreexpressão dos genes transcritos. Assim, esta via promove a autorrenovação descontrolada das BCSC e desencadeia processos de EMT, estando associada a sérias implicações malignas. (Rangel *et al.*, 2016) Alternativamente, existe a via de sinalização Wnt independente da β -catenina, cujo elemento-chave é a proteína cinase associada a Rho (*Rho-associated kinase* - ROCK), cuja desregulação em ambiente tumoral resulta na migração e formação de metástases pelas BCSC. As duas vias de sinalização encontram-se relacionadas uma vez que ROCK controla a ativação de c-MYC. (Mohammadi-Yeganeh *et al.*, 2016)

Vários mediadores desta via podem ser considerados como alvos terapêuticos. Estudos recentes identificaram um composto químico, a salinomicina, capaz de atingir seletivamente as BCSC. A salinomicina promove a degradação do coreceptor LRP6, inibindo assim a via de sinalização Wnt. Alguns componentes da dieta, como a curcumina, piperina e sulforafano, foram identificados como potenciais reguladores negativos de Wnt, podendo atuar como inibidores das BCSC. (Guo, 2014; Wei e Lewis, 2015) Atualmente, encontram-se

em fase Ib de ensaios clínicos dois biofármacos, Ipafricept (OMP-54F28) e Vantictumab (OMP-18R5), que atuam no recetor Frizzled inibindo a via Wnt. Ambos estão a ser estudados em combinação com quimioterapia convencional.(Brookset *al.*, 2015; OncoMed Pharmaceuticals, 2016) O uso de microRNAs, nomeadamente a família miR-340, como agentes supressores de tumores foi estudado por alguns autores recentemente. Mohammadi-Yeganeh, S. *et al*(2016)demonstraram que a sobreexpressão de miR-340 inibe os genes c-MYC e ROCK, resultantes da ativação das vias Wnt, traduzindo-se num aumento da percentagem de células apoptóticas e numa redução das capacidades de mobilidade e invasão das BCSC. A indução da expressão desta família de microRNA representa uma nova estratégia para prevenir a progressão e metastização do cancro da mama.

A via de sinalização Notch é responsável pela manutenção do balanço entre proliferação celular, diferenciação e apoptose em NSC. Em células cancerosas, Notch promove elevada proliferação celular, restringe a diferenciação e inibe a apoptose, conduzindo e mantendo o processo tumoral. (Bozorgiet *al.*, 2015)Tal como Wnt, a sinalização Notch envolve interação entre ligandos provenientes do microambiente com o recetor transmembranar Notch(1 – 4). A ligação de um ligando, Delta ou Jagged,ativa a via de sinalização e promove a clivagem do recetor transmembranar pela enzima conversora do fator de necrose tumoral- α (*tumor necrosis factor- α converting enzyme- TACE*) e, posteriormente, pela γ -secretase. A porção móvel intracelular do recetorsofre translocação até ao núcleo, onde ativa o fator de transcrição CBF-1, resultando na transcrição de genes-alvos de Notch, como genes da família HES e Ciclina D. (Borah *et al.*, 2015; Wei e Lewis, 2015) A desregulação desta via é também responsável pelo processo tumoral. No cancro da mama, foram encontradas mutações nos recetores Notch 1 e 2 e elevada expressão de Notch 1, Notch 4 e Hes1. Adicionalmente, outros estudos revelaram que Notch1 induz diretamente o recetor do fator de crescimento vascular endotelial 3 (*vascular endotelial growth factor receptor 3 - VEGFR-3*) em células endoteliais, promovendo o desenvolvimento vascular, e, conseqüentemente, favorecendo a alimentação e o crescimento tumoral. (Rangel *et al.*, 2016)

Os componentes da via Notch podem ser potenciais alvos terapêuticos na redução do tamanho do tumor. A inibição desta via, sozinha ou em combinação com fármacos citostáticos convencionais, tem em vista atuar nas BCSC e conduzir ao tratamento do cancro da mama. Um estudo concluiu que a utilização de um shRNA (*short hairpin RNA*), uma pequena molécula de RNA utilizada para silenciar a expressão de genes-alvo, tendo como

alvo Notch1, inibe o crescimento de BCSC e confere sensibilidade ao paclitaxel, um fármaco citostático. Adicionalmente, vários autores estão focados na utilização de inibidores da γ -secretase (*gamma secretase inhibitors- GSI*) para inibir a via Notch. Dados recentes sugerem que o GSI MRK-0752 pode reduzir BCSC em biopsias de doentes em ensaios clínicos de fase I. Alguns destes fármacos estão já em ensaios clínicos de fase II. (Carrasco *et al.*, 2014; Schott *et al.*, 2013) No entanto, a combinação de GSI com outros tratamentos, incluindo citostáticos convencionais, pode ser necessária para maximizar a eficácia terapêutica. Dois novos anticorpos monoclonais, Brontictuzumab (OMP-52M51) e Tarextumab (OMP-59R5), que ligam e bloqueiam o recetor Notch, encontram-se atualmente em ensaios clínicos de fase Ia e fase 2, respetivamente, tendo sido demonstrado em modelos pré-clínicos que inibem o crescimento de CSC, promovem a diferenciação celular e bloqueiam a angiogénese. Assim, estes anticorpos monoclonais podem ser potenciais novos fármacos para o tratamento do cancro da mama. (OncoMed Pharmaceuticals, 2016)

Por fim, a via de sinalização Hedgehog é uma via essencial à manutenção de NSC e BCSC, estando envolvida nos mecanismos de autorrenovação. Existem três ligandos de Hedgehog descritos: Sonic, Desert e Indian; estes ativam o complexo recetor Patched e Smothened, iniciando o processo de sinalização. De seguida, Smothened ativa os fatores de transcrição da família Gli (Gli1 – 3) que são convertidos na forma ativadora da transcrição génica. Quando não há ativação de Gli por Smothened, estes fatores de transcrição funcionam como reguladores negativos de Hedgehog, pois atuam como repressores da transcrição. Após ativação, Gli sofre translocação para o núcleo onde induz a transcrição de genes-alvos como Nanog. A expressão de genes-alvo está envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, assim como nos mecanismos de autorrenovação e potencial estaminal celular. (Ajani *et al.*, 2015; Gangopadhyay *et al.*, 2013) A desregulação desta via de sinalização está associada ao processo tumoral e pode ocorrer tanto por mutações em componentes da via, como por elevada expressão dos seus ligandos. Assim, ocorre ativação aberrante da via, promovendo autorrenovação descontrolada das BCSC e, consequentemente, crescimento e manutenção do tumor. (Borah *et al.*, 2015)

Tal como as outras vias de sinalização referidas, todos os intermediários da via Hedgehog podem ser potenciais alvos para matar as BCSC. O primeiro inibidor da via a ser identificado foi a ciclopamina, que liga e inativa Smothened. No entanto, este fármaco apresentou baixa afinidade e baixa biodisponibilidade oral, pelo que foram sintetizados derivados mais potentes da ciclopamina. Estes derivados têm sido testados em ensaios pré-

clínicos, mas não há ainda dados sobre estes em BCSC. (Borah *et al.*, 2015; Carrasco *et al.*, 2014; Dawood *et al.*, 2014)

Todas estas vias de sinalização apresentam uma grande influência na formação e manutenção das BCSC, particularmente pela desregulação aberrante do mecanismo de autorrenovação e pela indução do processo de EMT. Assim, estas vias de sinalização e todos os seus componentes podem ser potenciais alvos para matar as BCSC. É imperativo que estudos posteriores tenham como objetivo perceber todos os mecanismos associados a estas vias, com vista à identificação de alvos terapêuticos e fármacos que neles atuem para aumentar a eficácia do tratamento do cancro da mama. (Filipova *et al.*, 2014)

5.2 EMT e MET e suas implicações na heterogeneidade tumoral, na metastização e na resistência à terapêutica

O processo de EMT é um dos pontos-chave no que diz respeito às BCSC. Este é um processo dinâmico associado ao comportamento das BCSC, sendo um dos responsáveis pela heterogeneidade tumoral e também pela formação de metástases e resistência à terapêutica. A EMT é um processo que envolve múltiplos passos manifestados pela perda de junções celulares e reorganização do citoesqueleto, resultando na perda de polaridade epitelial e aquisição do fenótipo mesenquimal, com capacidade de migração, invasão e resistência à apoptose. A EMT é caracterizada por alterações celulares e moleculares, que consistem na perda da molécula de adesão epitelial E-caderina e de citoqueratinas, e ganho de moléculas associadas ao estado mesenquimal, tais como N-caderina, vimentina e fibronectina. Esta alteração fenotípica é induzida por sinais extracelulares, provenientes do microambiente, que, conseqüentemente, ativam diferentes famílias de fatores de transcrição, incluindo Snail, Slug, Twist, Zeb(1 - 2). O processo reverso ocorre na MET. (Luo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016)

A plasticidade celular induzida pelo processo de EMT torna-o um dos responsáveis pela heterogeneidade tumoral e por uma das hipóteses que tenta explicar a formação das BCSC. As BCSC não são uma população estática. A perda de controlo epigenético, característica do cancro, e os sinais provenientes do microambiente ativam vias de sinalização e fatores de transcrição associados à EMT, desencadeando o processo, e favorecendo a transição entre estados celulares diferenciado e estaminal. Alguns estudos em cancro da mama revelaram que as células que sofrem EMT adquirem propriedades estaminais, tais como capacidade de autorrenovação e de formação tumoral. A plasticidade

celular explica a formação de BCSC através de células progenitoras ou diferenciadas e a heterogeneidade celular existente no tumor. (Brookset *al.*, 2015; Smalley *et al.*, 2013)

Um estudo focado na relação entre a plasticidade celular e os marcadores expressos pelas BCSC concluiu que estas podem existir tanto no estado epitelial como mesenquimal, sendo as transições reguladas pelo microambiente e essenciais para o desenvolvimento e colonização eficaz de metástases. Fenotipicamente, as BCSC mesenquimais expressam CD44⁺/CD24^{-/low} e as BCSC epiteliais apresentam o marcador ALDH1. A população CD44⁺/CD24^{-/low} apresenta características subjacentes a EMT tais como: baixa expressão de E-caderina, elevados níveis de vimentina, encontrar-se em fase quiescente e localizar-se na margem invasiva do tumor. Contrariamente, a população ALDH1, apresenta elevada expressão de E-caderina e baixa expressão de vimentina, características da MET. Estas BCSC são proliferativas e encontram-se no interior do tumor, favorecendo o seu crescimento. (Liu *et al.*, 2014)

A interconversão epitelial-mesenquimal das BCSC está relacionada com o corrente modelo de formação de metástases que sugere que a EMT conduz a disseminação das células cancerosas e, consecutivamente, a MET favorece a colonização metastática. No cancro da mama, 90% das mortes são resultado da formação de metástases que se formam particularmente nos ossos, pulmões, fígado, cérebro e nódulos linfáticos. O processo de desenvolvimento metastático é complexo e envolve vários passos: as BCSC CD44⁺/CD24^{-/low} mesenquimais, com capacidade de mobilidade, invadem o tecido envolvente até chegarem à circulação sanguínea; aí elas sobrevivem, por se encontrarem em fase quiescente, e migram até órgãos distantes; após extravasão da circulação sanguínea, as BCSC formam micrometástases nos órgãos distantes; o microambiente metastático induz a MET e as BCSC transitam para o seu estado epitelial com capacidade de autorrenovação para formar as macrometástases. (Gao *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2015)

Para além do papel na formação de metástases, as BCSC estão também associadas à resistência à terapêutica convencional. Recentemente, foi demonstrada *in vivo* a relevância da EMT na resistência à quimioterapia. A resistência à quimioterapia deriva da presença de bombas de efluxo nas membranas das BCSC, nomeadamente a glicoproteína-P I, que efetuam o efluxo dos fármacos, evitando a sua acumulação intracelular e a ocorrência de efeitos tóxicos que as possam matar. Dados recentes revelaram que as BCSC CD44⁺/CD24^{-/low} que apresentam elevada expressão de glicoproteína-P I e exibem elevada capacidade de invasão, conferida pela EMT, estão associadas à resistência ao tratamento com doxorubicina.

A depleção de Twist nestas células bloqueou a EMT e reverteu parcialmente a resistência ao fármaco, sugerindo o papel da EMT na resistência à quimioterapia convencional. (Li *et al.*, 2009) Outro estudo que utilizou linhas celulares de cancro da mama, verificou que quando as BCSC adquiriam morfologia mesenquimal, com aumento da expressão de Snail, Vimentina e N-caderina, tornavam-se resistentes ao tamoxifeno. Vários autores estudaram o impacto da EMT e observaram a resistência a outros fármacos citostáticos, como paclitaxel, docetaxel e 5-fluorouracilo. (Wuet *al.*, 2016) A expressão do marcador ALDH1 foi também associada a mau prognóstico, sugerindo que as BCSC ALDH1 partilham propriedades com as BCSC CD44⁺/CD24^{-low} não só no que diz respeito à formação de metástases, como já referido, mas também à resistência à terapêutica. Um estudo clínico analisou a expressão de ALDH1 em amostras de cancro da mama de mulheres tratadas com quimioterapia sequencial de paclitaxel e epirubicina e revelou que a presença de ALDH1 estava significativamente associada à resistência à terapêutica e a elevada taxa de recorrência tumoral. Todos estes dados demonstram a ligação entre a plasticidade epitelial-mesenquimal e a resistência à terapêutica. (Luo *et al.*, 2015)

Como já discutido, a plasticidade epitelial-mesenquimal está intimamente relacionada com as BCSC, sendo responsável pela heterogeneidade celular, formação de metástases, resistência à terapêutica e recidiva tumoral. Assim, o uso de agentes que atuem no processo EMT pode ser uma estratégia promissora para o tratamento do cancro da mama, especialmente aquele que apresenta elevado potencial metastático. Evidência cumulativa indica que, para além do microambiente, algumas alterações epigenéticas e as alterações nos microRNAs, podem regular a EMT, e por essa razão, poderão servir como potenciais alvos farmacológicos para novas abordagens terapêuticas. (Wuet *al.*, 2016) Diversos estudos demonstraram que a família de microRNA-200 foi reconhecida como supressora de EMT por atuar nos fatores de transcrição ZEB1 e ZEB2, podendo por isso constituir um bom alvo terapêutico. (Kim *et al.*, 2011; Nam *et al.*, 2004) Outras estratégias incluem a inibição da atividade das DNA metiltransferases ou da modificação das histonas, pela 5'-aza-2'-desoxicitidina, que restaura a expressão de E-caderina e impede a formação de metástases. (Graff *et al.*, 2000; Graft *et al.*, 1995) Atualmente, a maioria dos fármacos já descobertos que atuam nos mecanismos epigenéticos apresentam propriedades de reversão da metilação do DNA e das modificações aberrantes das histonas em modelos *in vivo*. No entanto, a sua eficácia clínica encontra-se comprometida, uma vez que os agentes que revertem a metilação do DNA estão associados a toxicidade. (Wuet *al.*, 2016)

Outro obstáculo que dificulta o desenvolvimento de terapêuticas eficazes é o processo EMT-MET em si. O facto de a EMT ser um processo dinâmico que envolve estados intermédios torna difícil de atingir o estado pretendido. Para além disso, a inibição da EMT pode ser problemática se as células cancerosas já tiverem iniciado a disseminação do local primário para a formação de metástases, pois pode estimular o desenvolvimento da metástase pela indução da MET. (Luo *et al.*, 2015) Assim, é imperativo que estratégias terapêuticas futuras tenham em consideração que atuar apenas num dos estados de plasticidade não será suficiente, pois as células não atingidas poderão rapidamente regenerar as BCSC no estado alternativo. As alterações epigenéticas e o processo de EMT necessitam de melhor elucidação para o desenvolvimento de novos agentes que, isoladamente ou em combinação com quimioterapia convencional, possam prevenir eficazmente a ocorrência de EMT-MET e assim, impedir a heterogeneidade celular, bloquear a formação de metástases e prevenir a recorrência tumoral. (Luo *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016)

5.3. Papel do nicho na plasticidade das BCSC

As BCSC encontram-se num microambiente, designado por nicho, favorável à sua manutenção e proliferação, resultando na formação do tumor. O nicho das CSC é essencialmente composto por células do sistema imune, adipócitos, células endoteliais, matriz extracelular e fibroblastos associados ao tumor. Estas células produzem fatores de crescimento (*transforming growth factor- β* - TGF- β , *epidermal growth factor*– EGF, VEGF) e citocinas pro-inflamatórias [*Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) e interleucinas, como a IL-6 e a IL-8] que induzem um estado inflamatório que ativa a via de sinalização do NF- κ B e promove a proliferação celular e a resistência à apoptose. O crescimento tumoral diminui o acesso aos nutrientes e torna o nicho um ambiente de hipoxia que favorece a manutenção das BCSC em fase quiescente. Os sinais provenientes do nicho estão envolvidos na plasticidade celular, uma vez que induzem a EMT, e, conseqüentemente, no processo metastático. (Yoshida e Saya, 2016)

As células endoteliais são um importante componente do nicho. Estas células estão envolvidas na angiogénese que aumenta o fluxo sanguíneo do tumor e, conseqüentemente, fornece alguns nutrientes e oxigénio para o seu rápido crescimento. Evidências recentes demonstraram que estas células estão também associadas ao aumento da EMT nas BCSC. A co-cultura de células epiteliais da mama com células endoteliais

resultou num aumento das células CD44⁺/CD24⁻ com redução da expressão de E-caderina e aumento da N-caderina. (Sigurdsson *et al.*, 2011)

Os fibroblastos são um tipo celular encontrado em todos os tecidos, cuja principal função é a formação da matriz extracelular. Estas células encontram-se também no microambiente tumoral onde são capazes de alterar a matriz extracelular e segregar compostos angiogénicos, quimiocinas e citocinas, promovendo o crescimento tumoral. Os fibroblastos segregam TGF- β que induz a EMT e algumas propriedades das BCSC. (Luo *et al.*, 2015)

A manutenção da inflamação crónica no microambiente tumoral é benéfica para as BCSC e é conseguida pela libertação de citocinas inflamatórias. A IL-6 ativa a via de sinalização da STAT3 através da ligação ao complexo recetor IL-6R - gp130, que ativa as cinases de tirosina *Janus Kinases* (JAK) que por sua vez ativam STAT3, desencadeando a expansão das BCSC. A interleucina IL-8 é um ligando de CXCR1, um recetor com elevada expressão nas BCSC. Quando ativado pela IL-8, promove a inibição da apoptose. Dados recentes evidenciam que RANKL apresenta também um papel importante nas BCSC, uma vez que induz a EMT e aumenta a população de BCSC CD44⁺/CD24^{low}, assim como promove a formação de metástases. (Guo, 2014; Wei e Lewis, 2015)

O fator de crescimento TGF- β desencadeia o processo EMT-MET, facilitando a formação de metástases, no cancro da mama. O seu recetor está expresso nas BCSC CD44⁺, resultando numa aparência mesenquimal. No entanto, em células que já sofreram a EMT, o TGF- β é capaz de induzir a MET. Assim, este fator de crescimento está associado à formação de metástases pela indução sequencial de EMT e MET. (Wei e Lewis, 2015)

O microambiente está ativamente envolvido no comportamento das BCSC, nomeadamente nos mecanismos de plasticidade e proliferação. Existe uma constante sinalização bidirecional entre o microambiente e as BCSC que favorece a carcinogénese e o desenvolvimento metastático. Por estas razões, também os componentes do nicho e os compostos por eles libertados devem ser tidos em consideração como potenciais alvos terapêuticos. A via de sinalização STAT3 pode ser inibida por inibidores de JAKs, como é o caso do ruxolitinib. Este fármaco encontra-se atualmente em fase II de ensaios clínicos (NCT02066532), em combinação com trastuzumab, para o cancro da mama. Está também em curso um estudo que avalia o efeito do anticorpo monoclonal inibidor do recetor da IL-6, o tocilizumab, em combinação com trastuzumab. Outro fármaco que demonstrou capacidade de inibição de STAT3 foi o agente antimalárico e inibidor lisossomal, cloroquina.

(Brookset *al.*, 2015; Wei e Lewis, 2015) Relativamente à interleucina IL-8, estudos pré-clínicos demonstraram que a reparixina bloqueia o recetor CXCR1, atingindo seletivamente as BCSC e prevenindo a formação tumoral. Este agente foi recentemente avaliado num ensaio clínico de fase I (NCT02001974) em combinação com paclitaxel. Os resultados deste ensaio não se encontram ainda disponíveis. (Bozorgiet *al.*, 2015; Brookset *al.*, 2015)

6. Mecanismos de resistência das BCSC à quimioterapia convencional

Apesar dos avanços recentes no desenvolvimento de agentes anti-neoplásicos, a resistência à terapêutica convencional representa um dos maiores obstáculos à eficácia do tratamento do cancro da mama. A resistência à terapêutica é estabelecida por diversos mecanismos genéticos ou epigenéticos que induzem bloqueio da apoptose, indução da reparação de DNA ou até efluxo de compostos estranhos à célula. Dos vários processos celulares associados à resistência à terapêutica, os mais significativos são inerentes às propriedades das BCSC e incluem os transportadores de efluxo da família ABC, a rápida capacidade de reparação de DNA, a resistência ao stress oxidativo e a atividade aldeído desidrogenase, como se representa esquematicamente na figura 2. (Bozorgiet *al.*, 2015; Dittmer e Leyh, 2015)

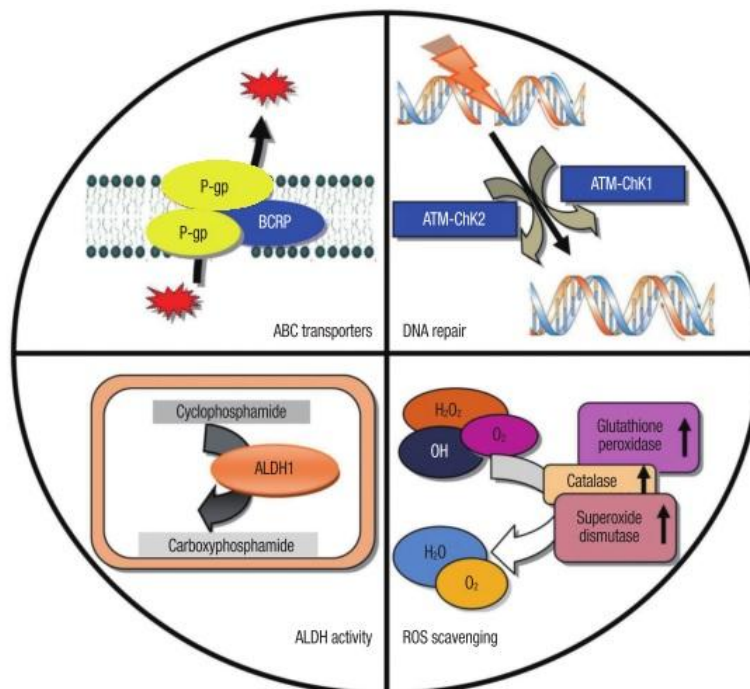


Figura 2—Esquema dos mecanismos associados à resistência das BCSC à terapêutica. Os mecanismos mais significativos que conferem às BCSC resistência à terapêutica convencional são: o transporte de efluxo por proteínas transmembranares ABC: P-gp, BCRP; reparação de danos no DNA através da ativação das vias ATR-Chk1 e ATM-Chk2; atividade da aldeído desidrogenase (ALDH); e neutralização de ROS através das enzimas catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase. Adaptado de Bozorgi et al., 2015.

A família de transportadores membranares ABC está envolvida no transporte de efluxo de compostos estranhos ou tóxicos às células, garantido a homeostasia e sobrevivência celular na presença de condições adversas. Ao nível tumoral, estes transportadores estão associados à resistência a múltiplos fármacos (*multidrug resistance* – MDR), apresentando dois transportadores principais: glicoproteína P (*P-glycoprotein* – P-gp) e a proteína de resistência do cancro da mama (*breast cancer resistance protein* – BCRP), que se encontram sobreexpressos. Assim, os fármacos citotóxicos são expelidos para o exterior da célula, sem exercerem a sua ação (Figura 2). (Bozorgiet al., 2015; Moitra, 2015) Alguns estudos revelaram que Ko143, um análogo da toxina fúngica fumitremorgina C, poderá diminuir a atividade do transportador BCRP. (Lecerf-Schmidt et al., 2013) No entanto, dados recentes indicam que o fármaco Ko143 apresenta baixa especificidade *in vitro* e *in vivo* para este transportador. (Weidner et al., 2015) Os transportadores ABC podem ser potenciais alvos terapêuticos para resolver o problema da resistência à terapêutica, por isso, é importante continuar a investigação de novos fármacos neste sentido.

Os tratamentos convencionais do cancro, como a radioterapia e quimioterapia, danificam o DNA através da inibição da sua síntese, inibição da ação da topoisomerase, formação de ligações cruzadas de DNA, e ainda pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (*reactive oxygen species* – ROS). As BCSC apresentam um mecanismo de reparação de DNA que lhes permite corrigir rapidamente os danos provocados pela terapêutica. As vias de sinalização ATR-Chk1 e ATM-Chk2, exemplos desses mecanismos, são ativadas por cortes em cadeia dupla e em cadeia simples de DNA, respetivamente (Figura 2). A reparação do DNA ocorre por inibição do ciclo celular. A ativação da via ATM-Chk2 foi associada à radiorresistência das BCSC, sendo um possível alvo a atingir. O fármaco KU55933 é um potente inibidor de ATM e pode aumentar a radiosensibilidade das BCSC. (Bozorgiet al., 2015)

O uso de radiação ionizante para a terapêutica anticancerígena induz um aumento na produção de ROS que pode ser letal para as células. No entanto, as BCSC têm a capacidade de neutralizar esse aumento através da regulação de compostos que estabelecem um equilíbrio entre a produção e a depleção de ROS. Nas BCSC, os genes que codificam proteínas envolvidas na neutralização de ROS, como a catalase, a glutathione peroxidase, a superóxido dismutase e a tioredoxina, apresentam elevada expressão, o que as protege contra os efeitos genotóxicos das ROS (Figura 2). (Bozorgiet *al.*, 2015) Dados referentes ao composto butionina sulfoximina (*buthionine sulfoximine* – BSO) indicam que quando usado no tratamento das BCSC, diminui a radiorresistência através da inibição da enzima glutamato-cisteína ligase, envolvida na síntese da glutathione. (Diehn *et al.*, 2009)

A ALDH é uma família enzimática envolvida na oxidação de aldeídos intracelulares em ácidos carboxílicos, como o ácido retinóico ou o ácido γ -aminobutírico (GABA). A ALDH1 apresenta elevada expressão nas BCSC e, como já referido, é utilizada como marcador destas células. No entanto, esta família enzimática está também associada à resistência à terapêutica: promove a oxidação de ciclofosfamida, um agente citotóxico antineoplásico, em carboxifosfamida, o seu metabolito inativo (Figura 2); induz resistência ao paclitaxel e epirubicina usados em quimioterapia; remove radicais de oxigénio e está envolvida indiretamente na produção de um composto intracelular antioxidante, o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), induzindo resistência à radioterapia. Uma vez que estão desenvolvidos os métodos para a identificar, resta continuar a investigação com vista ao desenvolvimento de fármacos que atuem na ALDH e promovam a sensibilização à terapêutica. (Bozorgiet *al.*, 2015; Ma e Allan, 2011; Schawarz-Cruz y Celis *et al.*, 2016)

6.1 Papel do nicho na resistência à terapêutica

Os estímulos libertados pelo nicho, para além de influenciarem as propriedades das BCSC, favorecem também a resistência à terapêutica. Um antigo estudo desenvolvido em 1990 demonstrou que as células cancerosas do cancro da mama que não eram suscetíveis aos fármacos citostáticos *in vivo* perdiam a sua resistência quando isoladas do seu nicho. (Teicher *et al.*, 1990) Atualmente existe evidência de que alguns compostos libertados pelo nicho, nomeadamente as interleucinas, são responsáveis pela resistência aos agentes antineoplásicos. Por exemplo, a ativação da via STAT3 pela IL-6 resulta na resistência à terapêutica com trastuzumab e aumento das BCSC em cancro da mama do subtipo com

sobreexpressão de HER2.(Korkaya *et al.*, 2012)No subtipo basal o tratamento com paclitaxel induziu o aumento da atividade de TGF- β e da expressão de IL-8 que, conseqüentemente, aumentou o número de BCSC.(Bhola *et al.*, 2013) Como já referido no ponto 5.3, estes compostos produzidos pelas células do microambiente são potenciais alvos de fármacos que se encontram em desenvolvimento para o tratamento do cancro da mama.

Outra condição do nicho que influencia a falha da terapêutica nas células cancerosas é a tensão de oxigénio. O crescimento tumoral resulta num fluxo sanguíneo insuficiente dentro do tumor que dificulta o acesso aos nutrientes e ao oxigénio, e conseqüentemente diminui a quantidade de fármacos que o atinge. Por outro lado, o nicho apresenta-se como um ambiente de hipoxia que induz as BCSC a permanecerem no estado quiescente, capaz de escapar à terapêutica convencional, uma vez que esta atua em células em divisão. A condição de hipoxia ativa os fatores induzíveis por hipoxia (*hypoxia inducible factor* – HIF): HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α , que regulam a expressão de genes envolvidos em funções biológicas como angiogénese, sobrevivência celular em hipoxia e diminuição da apoptose, resultando na adaptação tumoral ao ambiente de baixos níveis de oxigénio. Estes fatores encontram-se também envolvidos na regulação das BCSC e da EMT. Observações recentes sugeriram que o bloqueio da expressão de HIF, por exemplo por shRNA, pode anular a indução do fenótipo das BCSC em resposta à hipoxia e, adicionalmente, melhorar a resposta aos fármacos citostáticos. Apesar de todos estes avanços, ainda há um longo caminho a percorrer de modo a elucidar o exato papel do nicho na resistência à terapêutica no cancro da mama. Após a sua clara elucidação, será mais fácil o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.(Bozorgiet *al.*, 2015; Dittmer e Leyh, 2015; Gao *et al.*, 2016)

7. Conclusões e perspectivas futuras

As BCSC apresentam-se como o ponto-chave no desenvolvimento e manutenção do cancro da mama, assim como no processo metastático, na resistência à terapêutica e na recorrência tumoral. Vários estímulos do microambiente libertam sinais responsáveis pela ativação das vias de sinalização celular e do processo de EMT que, conseqüentemente, promovem a plasticidade celular e a heterogeneidade tumoral, através da regulação das propriedades das BCSC. Para além disso, alguns mecanismos inerentes às BCSC, como o transporte de efluxo pelas proteínas transmembranares ABC, a atividade ALDH, a rápida

reparação de danos no DNA e a resistência ao stress oxidativo, e as características do microambiente tumoral, favorecem a resistência à terapêutica convencional.

A investigação desenvolvida ao longo dos últimos tempos desvendou os mecanismos associados ao papel das BCSC no cancro da mama e, adicionalmente, possibilitou a identificação de potenciais alvos e fármacos a ter em consideração em novas estratégias terapêuticas. Estudos recentes identificaram as principais vias de sinalização Wnt, Notch e Hedgehog, o processo EMT e os componentes libertados pelo microambiente, incluindo fatores de transcrição e citocinas, como potenciais alvos a ter em consideração para o tratamento do cancro. No entanto, apesar dos avanços no que concerne às CSC, o conhecimento disponível sobre o assunto é ainda limitado. Para além disso, o conhecimento sobre diferentes mecanismos capazes de desencadear a resistência à terapêutica veio consolidar a necessidade de combinação de diferentes estratégias para inibição simultânea de múltiplas moléculas, com vista à sensibilização tumoral à terapêutica.

É imperativa a necessidade de continuação da investigação nesta área no futuro. Alguns autores referiram recentemente algumas estratégias que poderão ser promissoras no tratamento do cancro. É de salientar a aplicação de abordagens de imunoterapia, através do uso de agentes imunomoduladores que atuem nas características imunossupressoras induzidas pelo nicho, bem como de terapia génica, através da utilização de células estaminais modificadas por engenharia genética que funcionam como veículo de transporte e libertação de genes terapêuticos, atuando efetivamente no local do tumor primário e das metástases.(Kim *et al.*, 2015; Nahas *et al.*, 2015)

A continuidade da investigação dos mecanismos que regulam as BCSC, com vista à sua perfeita elucidação, permitirá a identificação de alvos moleculares específicos cuja modulação quer com fármacos convencionais, isto é, pequenas moléculas, quer com biofármacos e/ou terapia celular associada ou não à terapia génica, poderá levar a uma maior eficácia terapêutica, de modo que a cura do cancro da mama seja alcançável.

8. Referências bibliográficas

- AJANI, J. A. *et al.* - Cancer stem cells: the promise and the potential. **Semin Oncol.** 42:2 (2015) S3–S17.
- AL-HAJJ, M. *et al.* - Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100:7 (2003) 3983–3988.
- AMERICAN CANCER SOCIETY - **Cancer facts & figures 2016** [Em linha], atual. 2016. [Acedido em 10 set. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2016/>>.
- BHOLA, N. E. *et al.* - TGF- β inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. **J Clin Invest.** 123:3 (2013) 1348–1358.
- BONNET, D.; DICK, J. E. - Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat Med.** 3:7 (1997) 730–737.
- BORAH, A. *et al.* - Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. **Oncogenesis.** 4:2015) 1–11.
- BOZORGI, A. *et al.* - New Findings on Breast Cancer Stem Cells: A Review. **J Breast Cancer.** 18:4 (2015) 303–312.
- BROOKS, M. D. *et al.* - Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. **Cell Stem Cell.** 17 (2015) 260–271.
- BURRELL, R. A. *et al.* - The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. **Nature.** 501 (2013) 338–345.
- CARRASCO, E. *et al.* - Cancer stem cells and their implication in breast cancer. **Eur J Clin Invest.** 44:7 (2014) 678–687.
- CLARKE, M. F. *et al.* - Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. **Cancer Res.** 66:19 (2006) 9339–9344.
- DAWOOD, S. *et al.* - Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. **Oncology (Williston Park).** 28:12 (2014) 1–11.
- DIEHN, M. *et al.* - Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells. **Nature.** 458:7239 (2009) 780–783.
- DITTMER, J.; LEYH, B. - The impact of tumor stroma on drug response in breast

- cancer. **Seminars in Cancer Biology**. 31 (2015) 3–15.
- FILIPOVA, A. *et al.* - Breast cancer and cancer stem cells: a mini-review. **Tumori**. 100 (2014) 363–369.
 - GANGOPADHYAY, S. *et al.* - Breast Cancer Stem Cells: A Novel Therapeutic Target. **Clin Breast Cancer**. 13:1 (2013) 7–15.
 - GAO, T. *et al.* - The mechanism between epithelial mesenchymal transition in breast cancer and hypoxia microenvironment. **Biomed Pharmacother**. 80 (2016) 393–405.
 - GENG, S. *et al.* - Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. **Cancer Lett**. 349 (2014) 1–7.
 - GINESTIER, C. *et al.* - ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. **Cell Stem Cell**. 1:5 (2007) 555–567.
 - GRAFF, J. R. *et al.* - Methylation Patterns of the E-cadherin 5' CpG Island Are Unstable and Reflect the Dynamic , Heterogeneous Loss of E-cadherin Expression during Metastatic Progression. **J Biol Chem**. 275:4 (2000) 2727–2732.
 - GRAFT, J. R. *et al.* - E-Cadherin Expression Is Silenced by DNA Hypermethylation in Human Breast and Prostate Carcinomas. **Cancer Res**. 55:22 (1995) 5195–5199.
 - GUO, W. - Concise Review: Breast Cancer Stem Cells: Regulatory Networks, Stem Cell Niches, and Disease Relevance. **Stem Cells Transl Med**. 3 (2014) 942–948.
 - JAWORSKA, D. *et al.* - Prostate Cancer Stem Cells: Research Advances. **Int J Mol Sci**. 16 (2015) 27433–27449.
 - KAUR, S. *et al.* - Cancer stem cells: An insight and future perspective. **J Cancer Res Ther**. 10:4 (2014) 846–852.
 - KIM, T. *et al.* - p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. **J Exp Med**. 208:5 (2011) 875–883.
 - KIM, Y. *et al.* - Gene therapy strategies using engineered stem cells for treating gynecologic and breast cancer patients (Review). **Oncol Rep**. 33 (2015) 2107–2112.
 - KORKAYA, H. *et al.* - Activation of an IL-6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancers by expanding the cancer stem cell population. **Mol Cell**. 47:4 (2012) 570–584.
 - LECERF-SCHMIDT, F. *et al.* - ABCG2: recent discovery of potent and highly selective inhibitors. **Future Med Chem**. 5:9 (2013) 1037–1045.

- LI, Q. *et al.* - TwistI-Mediated Adriamycin-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Relates to Multidrug Resistance and Invasive Potential in Breast Cancer Cells. **Clin Cancer Res.** 15:8 (2009) 2657–2665.
- LIU, S. *et al.* - Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. **Stem Cell Reports.** 2 (2014) 78–91.
- LUO, M. *et al.* - Epithelial-mesenchymal plasticity of breast cancer stem cells: implications for metastasis and therapeutic resistance. **Curr Pharm Des.** 21:10 (2015) 1301–1310.
- MA, I.; ALLAN, A. L. - The Role of Human Aldehyde Dehydrogenase in Normal and Cancer Stem Cells. **Stem Cell Rev and Rep.** 7 (2011) 292–306.
- MOHAMMADI-YEGANEH, S. *et al.* - MicroRNA-340 inhibits the migration, invasion, and metastasis of breast cancer cells by targeting Wnt pathway. **Tumor Biol.** (2016) 1-8.
- MOITRA, K. - Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. **BioMed Res Int.** (2015) 1–8.
- NAHAS, G. R. *et al.* - A perspective of immunotherapy for breast cancer: Lessons learned and forward directions for all cancers. **Breast Cancer (Auckl).** 9:S2 (2015) 35–43.
- NAM, J.*et al.* - 5-Aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. **Clin Exp Metastasis.** 21:1 (2004) 49–56.
- ONCOMED PHARMACEUTICALS - **Development pipeline** [Em linha], atual. 2016. [Acedido em 11 set. 2016]. Disponível em WWW:<URL:http://www.oncomed.com/Pipeline.html>.
- RANGEL, M. C.*et al.* - Developmental signaling pathways regulating mammary stem cells and contributing to the etiology of triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** (2016) 1–16.
- SCHAWARZ-CRUZ Y CELIS, A.*et al.* - Advances in the knowledge of breast cancer stem cells. A review. **Histol Histopathol.** 31:6 (2016) 601–612.
- SCHOTT, A. F. *et al.* - Preclinical and Clinical Studies of Gamma Secretase Inhibitors with Docetaxel on Human Breast Tumors. **Clin Cancer Res.** 19:6 (2013) 1512–1524.
- SELL, S. - Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Crit Rev Oncol**

- Hematol.** 51:1 (2004) 1–28.
- SIGURDSSON, V. *et al.* - Endothelial Induced EMT in Breast Epithelial Cells with Stem Cell Properties. **PLoS One.** 6:9 (2011) 1–11.
 - SMALLEY, M. *et al.* - Breast cancer stem cells: Obstacles to therapy. **Cancer Lett.** 338 (2013) 57–62.
 - SOUZA, V.; SCHENKA, A. - Cancer Stem and Progenitor-Like Cells as Pharmacological Targets in Breast Cancer Treatment. **Breast Cancer (Auckl).** 9:S2 (2015) 45–55.
 - SREEKUMAR, A. *et al.* - The mammary stem cell hierarchy: A looking glass into heterogeneous breast cancer landscapes. **Endocr Relat Cancer.** 22:6 (2015) T161–T176.
 - TEICHER, B. A. *et al.* - Tumor Resistance to Alkylating Agents Conferred by Mechanisms Operative Only in Vivo. **Science.** 247:4949 (1990) 1457–1461.
 - VELASCO-VELAZQUEZ, M. A. *et al.* - Breast cancer stem cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 44 (2012) 573–577.
 - WEI, W.; LEWIS, M. T. - Identifying and targeting tumor-initiating cells in the treatment of breast cancer. **Endocr Relat Cancer.** 22:3 (2015) R135–R155.
 - WEIDNER, L. D. *et al.* - The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. **J Pharmacol Exp Ther.** 354 (2015) 384–393.
 - WHITE, A.; LOWRY, W. - Defining the role for adult stem cells as cancer cells of origin. **Trends Cell Biol.** 25:1 (2015) 11–20.
 - WORLD HEALTH ORGANIZATION - **Cancer Fact sheet N 297 - World Health Organization (WHO)** [Em linha], atual. 2011. [Acedido a 19 fev. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>.
 - WU, Y. *et al.* - Epithelial-Mesenchymal Transition and Breast Cancer. **J Clin Med.** 5:13 (2016) 1–18.
 - YAO, T. *et al.* - Cervical cancer stem cells. **Cell prolifer.** 48 (2015) 611–625.
 - YOSHIDA, G.; SAYA, H. - Therapeutic strategies targeting cancer stem cells. **Cancer Sci.** 107:1 (2016) 5–11.