

Bularreko Minbiziaren Zelula Amak

Olatz Leis

Hazkunde Zelularraren Erregulazioaren Laborategia
Inbiomed Fundazioa

Laburpena: Minbizi mota askotan zelula amen ezaugarriak dituzten zelula multzo bat deskribatu da azken urte hauetan. Zelula hauek, minbiziaren zelula amak (CSCs, Cancer Stem Cell) deiturikoeak, ikerkuntzan garrantzi handia hartu dute, minbizia sortu, mantendu, zabaldu eta birsortzearen arduradunak direlako; metastasien eta tratamenduen erresistentziaren arduradunak izanik. Ondorioz, erabat beharrezkoa suertatzen da zelula hauek ondo ezagutu eta aztertzea; diagnosi baliabide bezala erabili ahal izateko bai eta beraien aurka zuzenduriko sendagaiak sortzeko. Honela, tumorea erabat desagerarazi ahal izango dute, minbiziaren aurkako borroka irabaziaz.

Hitz Gakoak: Bularreko minbizia, Minbiziaren Zelula Amak, CD44, CD49f, EpCam, ALDH.

Abstract: In the last few years a small population of cells with stem cell features has been described for many cancers. These cells, called cancer stem cells (CSCs), are able to generate, expand and maintain the growth of the tumors. Furthermore, they are likely responsible for tumors relapses, metastatic expansion and chemotherapeutic resistance, therefore are attracting a lot of interest in cancer research as well as targets for therapeutic intervention. The major effort is the necessity to understand these CSCs in order to identify novel therapeutic and diagnostic targets, and design more efficacious therapeutic approaches against cancer.

Key words: Breast Cancer, Cancer Stem Cell, CD44, CD49f, EpCam, ALDH.

SARRERA

Bularreko minbizia da Euskal Autonomia Erkidegoko (EAE) emakumeek gehien pairatzen duten tumorea; batez beste, 1.175 diagnostiko izaten dira urtean, eta intzidentzia tasa berriz, 84,8 kasukoa da 100.000 biztanlekoa. EAEko emakumeetan heriotza gehien eragiten duen tumorea ere bada: batez beste 295 emakume hiltzen dira arrazoi honegatik urtean, hilkortasun tasa 17,3 kasukoa izanik 100.000 biztanleka.

Biziraupen erlatiboa bost urteetara % 87,4koa da. Garaiz antzematea faktore garrantzitsua da biziraupena areagotzeko; diagnosi goiztiarrarekin

tratamenduak eraginkorragoak eta ez hain oldarkorrek izaten dira eta gaitxo-en bizitza kalitatea hobetzen dute [1].

Bestalde Ameriketako Estatu Batuetan (AEBn) Minbiziaren Nazioarteko Institutuak (NCI) plazaratu duenez, minbiziaren hilkortasun tasa konstante mantendu da azken 60 urteetan zehar beste gaixotasun nagusiekin alderatuaz gero. Esate baterako, gaixotasun kardiobaskularren hilkortasun tasa % 50ean jaitsi da. Haurren Leuzemia, Hodgkin gaixotasuna eta beste minbizi batzuetan tratamenduen eraginez bizi-itxaropena asko hobetu da [2]. Bularreko minbiziaren kasuan aldiz, hilkortasun tasaren gorakada esanguratsua izan da azken urte hauetan (425.000 emakume 2010 urtean), [3] nahiz eta hobekuntza nabarmena izan den diagnosi goiztiar eta terapia hobeen garapenean [4].

Azken urte hauetan teoria bat indarberritu egin da tumoreak nola sortzen eta mantentzen diren eta gaur egungo tratamenduei nola burla egiten dieten azaltzeko [5]; minbiziaren zelula amen hipotesia hain zuzen (CSCs). Egun, minbiziaren aurka erabiltzen diren sendagaiak ez dira gai tumorea guztiz deusezteko; hori dela-eta, kasu askoetan ez da erabateko sendakera lortzen. Benetan lortzen dena tumorearen masa-jaitziera da epe motzean. Orain arteko kimioterapiak erdibitzen ari diren zelulak dituzte helburu bezala, eta horrela, tumoreko zelulak ez ezik, erdibitzen ari den edozein zelula akatzen dituzte.

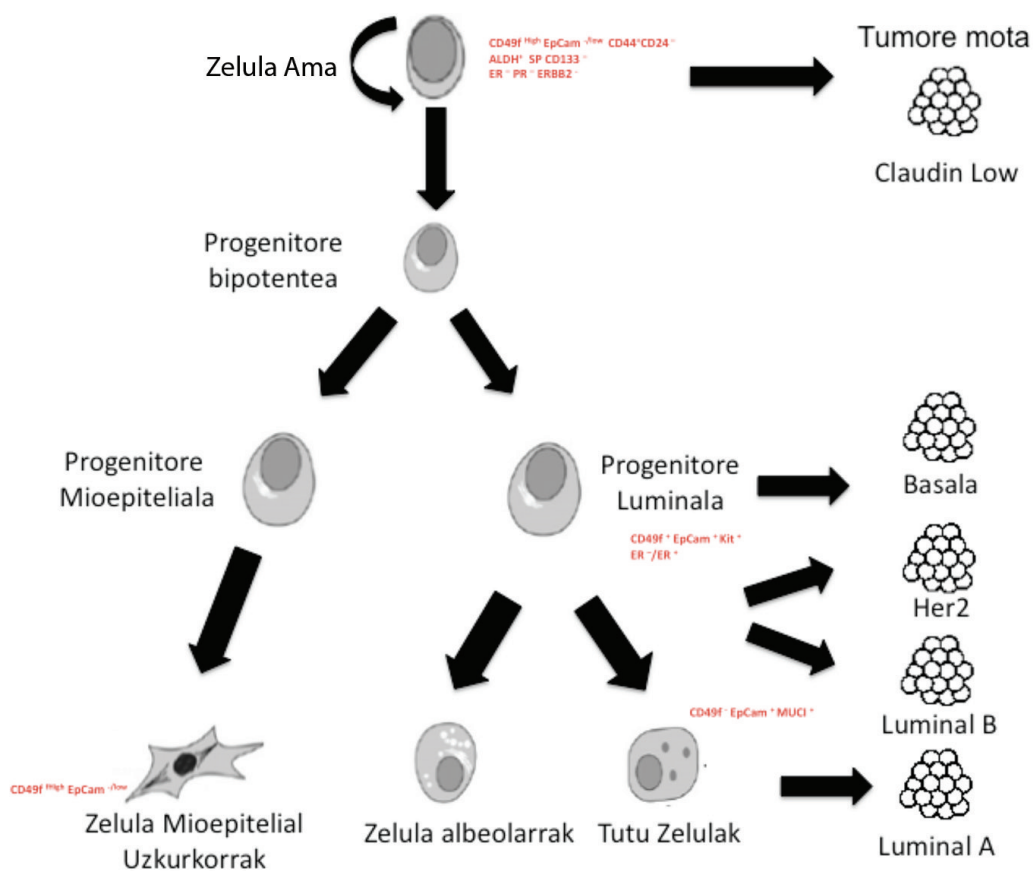
Minbiziaren zelula amak, hazkunde geldoa duten zelulak izanik, gai dira tratamendu hauei burla egiteko. Teoria honek gaur egungo sendagaien diseinu-aldaketa nabarmena ekarriko luke; Egungo kimioterapiak erdibitzen ari den zelula erasotzen du, baina sendabide berriak zelula amei soilik eragingo lieke, tumorea bere osoan erasotzeko [6].

BULARREKO ZELULA AMAK (BSCs) ETA BULARREKO MINBIZIAREN ZELULA AMAK (BCSCs)

Bular-guruina, ektodermotik sortzen da, esnea ekoiztea du funtzio nagusia, eta jaio ondoren garatzen den ehun dinamikoa da.

Aldaketa morfogenetiko handiak pairatzen ditu ehun honek pubertaro, haurdunaldi, edoskitze, inboluzio eta menopausian zehar [7]. Zelula-hierarkia baten inguruan mantentzen da ehuna. Bular-parenkima, desberdindutako 3 epitelio-zelula mota nagusiez osaturik dago (1. irudia): hodia osatzen duten hodi-zelula luminalak, esnea sortzen duten zelula luminal albeolarrak eta zelula luminal hauek eta mintz basalaren artean kokaturik dauden zelula mioepitelial uzkurkorak [8].

Zelula hauek hormonen eta lekuko estromaren seinaleen bitartez etengabeko hazkuntza, ezberdintzapen eta apoptosi prozesuak jasaten dituzte, honela ezberdintzapen egoera gailenera iristean hazkuntza gaitasuna galitzen dutelarik. Zelula hauek desagertzean, progenitore goiztiarragoek osatzen



1. irudia. Bularreko guruinaren zelulen hierarkia garapenean eta bular minbizi subtipo nagusiekin duten erlazioa.

dituzte eta progenitore hauen ordeaz, ezberdintzapen-egoera goiztiarrago batean dauden zelulak jartzen dira era berean.

Hierarkia honetan oinarritzen da bular-guruinaren garapena eta ezberdintze prozesu osoa, zelula ama erabat desberdintutako zeluletara iritsi artean [9].

Bularreko zelula amei buruzko lehen datuak 1996 urtekoak dira [10-12]. Honelako zelulen agerpena uztartuta dago erradiazio pean egon diren emakume nerabeen bularreko minbizia pairatzeko dagoen arriskua handitzearekin [13]. Izan ere, erradiazio pean egondako denbora zenbat eta handiagoa izan zelula amek mutazio gehiago pairatu ditzakete.

Gainera, ehun honen heterogeneitatea argi ikusi da laborategian bularreko epitelio-zelulekin eginiko klonogenitate-entseguetan [14]; honela, ikusi da zelula mota bat baina gehiago daudela hierarkia batean. Gizakietan zelula ama hauek ez dira gehiegi ezagutzen; hori dela-eta, azken urteetan talde ugari zelula hauek isolatu eta identifikatu nahian ari dira.

Alde batetik, 2007 urtean Ginestierrek azaldu zuen, zelula amen ezaugarriak dituzten bular-epitelioko zelulak, zirela aldehido deshidrogenasa 1 (ALDH1) izeneko entzima baten aktibitate gehien zuten zelulak [15]. Bestalde, mintzeko adierazle gisa CD49^{hi}EpCAM⁻ duen zelula multzo bat identifikatu da [16, 17] zelula ama bezala.

Zelula amen eredia zalantzan ere jarri da azken aldian; hori dela-eta, Cedric Blanpainen taldeak Bruselan, saguekin eginiko saiakeretan azaldu du homeostasiaren mantenua, zelula ama unipotenten bitartez gauzatzen dela jaio ondorengo bular guruinetan [18]. Enbrioi-garapenean eta haurdunaldian gertatzen da zelula ama bipotentek azaltzea. Datu hauek azaltzen dute badela zelula amen barnean hierarkia konplexu bat; alde batetik multipotentzia ezaugarritzat duten zelula amak eta bestetik ahalmen murriztutua duten zelula amak ere [19].

Minbizia osatzen duten zelula multzoaren artean, ehun osasuntsuan bezala, garapen-egoera desberdinetan dauden zelula multzo desberdinak daude [20]. Hainbat eredu daude minbiziaren zelula amen hipotesia azaltzeko; batzuek edozein zelula motatan (hierarkiaren barnean) ipintzen dute minbiziaren oinarria (Eredu klasiko edo estokastikoa). Eredu honetan edozein zelulak tumorea sor lezake, denbora aurrera doan heinean jasandako mutazioen ondorioz. Besteek aldiz, zelula mota bakar batean jartzen dute oinarria, eta zelula horrek baditu zelula amaren ezaugarriak, hala nola hazkuntza mugagabea eta autoberrikuntza (Hierarkien eredia) [6]. Baliteke bi hipotesi hauek elkarrekin gauzatzea minbizian, Leuzemia batzuen kasuan deskribatu den bezala [21].

Bular-guruin osasuntsuaren garapenean, zelula amen ezberdintzapen prozesuak hiru zelula mota nagusi sortzen ditu eta baliteke, bularreko minbizian ere antzeko ezberdintzapen prozesu bat gertatzea eta honek bularreko minbiziaren azpimota molekular desberdinak sortzea [22] (1. irudia).

Hainbat lanek azaltzen dutenez ordea, tumore basalak progenitore luminaletik datoz [17, 23]; beraz, transformazioa jasaten duen jatorrizko zelula, minbiziaren zelula ama (CSC) bilakatzen dena, bular guruineko garapenean zehar edozein izan liteke, beharrezkoak dituen gertaera onkogenikoak jasan ondoren.

MINBIZIAREN ZELULA AMAK BULARREAN

Bularreko minbiziaren zelula amak EpCAM⁺, CD44⁺ CD24^{-/low} mintz adierazleen bitartez deskribatuak izan ziren lehen aldiz [24]. Adierazle hauek positiboak ziren 200 zelula nahikoa ziren NOD/SCID saguetan tumoreak adierazle hauek ez zituzten zelulak aldiz, ez ziren gai izan tumore bat osatzeko nahiz eta 100 aldiz zelula gehiago xiringatu animalian. Zelula multzo

honekin egindako lan asko argitaratu dira; zelula-hazkundearekin eta animalia ereduaren bitartez erakutsi da minbiziaren zelula amek, ezaugarri hauek dituztenek behintzat, egungo terapien aurkako erresistentzia handia dutela. Bularreko minbizian, *Li* eta bere taldeak [25] deskribatu zuten gaur egungo kimioterapiak minbizia aurreratua zuten gaixoetan CD44⁺ CD24^{-/low} zelula kopurua handiagotzen zuela, bai eta *mamosfera* izeneko egiturak sortzeko ahalmena ere. *Tanei* eta bere taldeak [26] ildo beretik azaldu zuten ALDH1 jarduera duten zelula kopurua handiagotzen dela gaur egungo tratamenduekin. Beraz, urteetan zehar adierazle hauek tumorea hasteko gai ziren zelulak isolatzeko erabili izan ohi dira; baina, egun ez dago argi adierazle hauek klinikari duten garrantzia [27, 28]. Adierazle hauek gaixoen egoerarekin batu nahi izan direnean emaitzak ez dira erabatekoak izan, ez baita loturarik aurkitu adierazle eta gaixoaren diagnosi edo prognosiaren artean [29]. Emaitza hauek argi uzten dute minbiziaren zelula amak ongi definitzeko gelditzen den lana beraien erabilera klinikara hedatu aurretik.

Minbiziaren zelula amek lozorrotuta egoteko ahalmena dute eta beraien kopurua oso baxua denez, ezinezkoa gertatzen da beraien detekzio hutsa proliferazioa abian jartzen duen gertakari bat izan artean. Erabat garrantzizkoa da zelula hauek bereizten jakitea eta zelula hauek sortzeko gertatzen diren molekula-mekanismoak ulertzea minbiziaren zelula amak klinikari eguneroko diagnosian erabili ahal izateko. Honela, gaixotasuna lehenago aurkitu eta metastasiak sortzeko ahalmena deuseztu ahal izango baita. Aurrerapauso izugarria izango litzateke hauen ezagutza sendagaien hobekuntzan; egungo sendagaiak (egungo kimioterapia eta erradioterapiak) beste zelulak erasotzearekin bat, sendagai berriek zelula mota hauek eraso ahal izango lituzketelako. Honela, tumorea erabat desargertuaraziaz gaixotasunarekin behin betirako amaitu ahal izango da, eta gaitzaren kronifikazioa gaindituko da.

ZELULA AMAK ISOLATZEKO PROZEDURAK

Egun minbiziaren zelula amak isolatzeko lau tresna nagusi daude erabilgarri laborategietan:

1. Mintz-adierazle desberdinen bitartez Fluxuzko Zitometria erabiliaz isolatzen dira minbiziaren zelula amak.
2. Hainbat koloratzailek zelulatik kanporatzeko gaitasuna dute zelula amak (side population bezala ezagutzen dena, SP) Hoechst 33342 koloratzaileak adibidez [30].
Egungo sendabideekiko erresistentziaren adierazle izan daiteke ezaugarri hau.
3. Esfera antzeko egitura moduan hazteko ahalmena dute, serum gabeko hazkundean [31]
4. ALDH entzima-jarduera azaltzen dute minbiziaren zelula amek [32].

Beharrezkoa da minbiziaren zelula ama bezala onartua izateko zelula batek ondorengo ezaugarriak betetzea:

1. Zelula ama totipotente bezala ezagutzen diren zeluletako adierazleentzat positibotasuna azaltzea. «Stemness» deritzaie, Ala nola Sox2 [33], Oct4, eta Nanog. Honela hierarkiaren beste zelula guztiak emateko gaitasuna azaltzen baita.
2. *Side Population* SP koloratzailea zelulatik kanporatzeko gaitasuna duten zelula multzo baten parte izatea, adierazle bidez ere.
3. Esfera egiturak sortzeko gaitasuna izatea.
4. Sagu inmudodeprimituetan minbizia sortzeko gaitasuna izatea.

Azken hau da benetako *in vivo* proba zelula batek tumorea birsortzeko gaitasuna duela erakusteko [34]. Beste animalia ereduak ere erabili ohi dira zelula amaren gaitasuna erakusteko, *zebrafish* eredu adibidez [35].

Zelula amak laborategiko prozedura hauek erabiliaz isolatzen dira eta beste zelulekin dituzten desberdintasunak aztertzen dira genomika eta proteomika- erabiliaz. Zelula amak isolatzeko entsegu hauek guztiak hazkundera ohituriko minbiziaren zelula-lerroetan egin ohi dira lehenik, hauek ere zelula amen ezaugarriak dituzten zelula multzo bat dutela deskribatu baita [36].

Baina lagin mota hauek ez dute gizakien fisiologian gertatzen dena erabat isladatzen zelula-hazkundera ohituta egonik ez dute tumorearen egoera naturala erabat isladatzen. Hori dela-eta, beharrezkoa suertatzen da zelula-hazkundera lorturiko emaitzak gaixoen laginetan baieztatzea. Gizaki-laginen erabilgarritasuna ez da handia eta gainera ez da erraza hauen hazkundera mantentzea. Lorturiko emaitzak minbizi motarekin edo gaixoen datuekin alderatzen dira, estatistika-analisi bidez, nolabaiteko erlazioa azaldu daitekeen aurkitzeko asmoz, bai prognosi zein diagnosi ikuspuntutik.

Azken urteetan garrantzi handia hartzen ari da gaixoen odolean zelula amen adierazleak aurkitzea, metodo hau ez baita hain mingarria gaixoen-tzak [37]. Gutxi gorabehera 150 entsegu kliniko daude abian, odolean minbiziaren zelula amen adierazleak aurkitzeko; hori dugu eredu honek duen bultzadaren isla.

MINBIZIAREN ZELULA AMAK KLINIKAN

Egun minbiziaren aurka erabiltzen diren sendagaiek erakutsi duten eraginkortasun eza dela-eta, beharrezkoa gertatzen da tumoreen erabateko deusezte lortuko duen sendagaien ikerkuntzan sakontzea. Azken urteetan, hainbat ikertzailek deskribatu izan dute kimioterapia arruntak zelula amen kopurua areagotzen dutela; alde batetik, ikusi dute CD44⁺CD24⁻ zelula ko-

purua handiagotzen dela, bai eta mamosferak *in vitro* sortzeko gaitasuna ere oso aurreratuak dauden bularreko minbizietan [25]. Beste batzuek diote ALDH1erako positibotasuna handiagotzen dela [26]. Honek argi uzten du gaur egungo sendagaiak ez direla gai minbizia enborretik erasotzeko, minbizia birsortzeko gai diren zelula kopurua handiagotzen den heinean.

Gainera hazkuntza, desberdintze eta apoptosi prozesuetan parte hartzen duten hainbat seinalizazio prozesu aldatuak daude zelula ametan: WNT, β -catenina, PTEN, TGF- β , Hedgehog, Notch eta Bmi-1 besteak beste [38]. Honek argi azaltzen du zelula multzo honek duen hazkuntza-gaitasuna eta heriotzaren aurrean duten abantaila. Molekula hauek blokeatzen dituzten hainbat agentek saiakera preklinikoetan ahalmena azaldu dute, gaur egun entsegu klinikoetara iritsi direlarik [39]. Orain artean ikusitakoak argi uzten du seinalizazio prozesu hauek guztiek bitartekari komun asko dituztela, eta beraz, egin beharreko tratamendu ereduak beraien arteko konbinazio bat izan beharko luketeela. Seinalizazio bide batek beste desberdin batetan izan ditzakeen ondorioak kontutan hartuaz.

Egun sendabide bat onartua izateko klinikan erabiltzen den neurria tumorearen masa osoaren jaitsiera da. Minbiziaren ama zelulei zuzenduriko sendabideek ez dute aldiz tumorearen tamaina izugarri jaitsiko, baina birsortze-ahalmena deuseztu egingo da. Beraz, gaur egun erabili ohi den tresneria egokitu eta birsortzeari garrantzi gehiago eman beharko litzaioke sendabide bat onartzerakoan.

ONDORIOA

Azken urteotan minbiziaren aurkako borrokan pauso handiak eman diren arren, egun kasu askoetan oraindik ez da lortu minbizia nola sortu eta hedatzen den jakitea.

Argi dago badagoela zelula multzo bat egungo tratamenduei ihes egiteko gai dena; minbiziaren zelula ama deritze horrelakoeri (CSCs). Minbiziaren zelula amak minbizia sortzearen, mantentzearen eta zabaltzearen erantzuleak dira beraz.

Zelula hauek beste zeluletatik desberdintzeko aukera emango diguten adierazleak behar dira beraien aurkako sendagaiak sortzeko. Horretarako, lehenik eta behin zelula hauek nondik datozen aztertu behar da. Honetarako, beharrezkoa da garapen arruntean zelula amak zeintzuk diren eta beraien desberdintze prozesua nola gertatzen den jakitea.

Garapen arruntean ezberdintzapen prozesua nola gertatzen den ulertzea erabat beharrezkoa da minbiziaren zelula ametan nola isladatzen den aztertzeko. Bi prozesuak bereizten dituzten molekuletan egon baitaiteke sendabidea. Minbiziaren zelula amak sortzen dituzten mekanismoak ulertzea eta

isolatzeko erabil daitezkeen adierazleak aurkitzea ezinbestekoa da beraien aurka zuzendutako sendagaiak sortzeko eta hauek egungo tratamenduekin konbinatuaz gero tumorearen zelula guztiak deuseztu ahal izateko.

ESKERRAK

Hazkunde Zelularren Erregulazioaren Laborategia Kutxa Gizarte Ekintzaren diru laguntzaz eta Gipuzkoako Foru aldundiaren diru laguntzaz babestua dago besteak beste.

BIBLIOGRAFIA

- [1] OSASUN ETA KONTSUMO SAILA 2010. *El Cáncer en el País Vasco*. Ed. Nagusia, E.J.A.Z., Gasteiz.
- [2] LEAF C. 2004. «Why we're losing the war on cancer (and how to win it)». *Fortune* **149**: 76-82, 84-76, 88 passim.
- [3] FOROUZANFAR M.H., FOREMAN K.J., DELOSSANTOS A.M., LOZANO R., LOPEZ A.D., MURRAY C.J., NAGHAVI M. «Breast and cervical cancer in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis». *Lancet* **378**: 1461-1484.
- [4] BERRY D.A., CRONIN K.A., PLEVritis S.K., FRYBACK D.G., CLARKE L., ZELEN M., MANDELBLATT J.S., YAKOVLEV A.Y., HABBEMA J.D., FEUER E.J. 2005. «Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer». *N Engl J Med* **353**: 1784-1792.
- [5] CLARKE M.F. 2006. «Cancer stem cells-perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells». *Cancer Research*.
- [6] BOSCH-BARRERA J. 2007. «Células madre y cáncer: dilucidando el origen de la célula madre tumoral». *Rev Med Univ Navarra* **51**: 14-17.
- [7] RUSSO J., RUSSO I.H. 2004. «Development of the human breast». *Maturitas* **49**: 2-15.
- [8] HENNIGHAUSEN L., ROBINSON G.W. 2005. «Information networks in the mammary gland». *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 715-725.
- [9] LUO J., YIN X., MA T., LU J. «Stem cells in normal mammary gland and breast cancer». *Am J Med Sci* **339**: 366-370.
- [10] DENG G., LU Y., ZLOTNIKOV G., THOR A.D. SMITH, H.S. 1996. «Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas». *Science* **274**: 2057-2059.
- [11] LAKHANI S.R., SLACK D.N., HAMOUDI R.A., COLLINS N., STRATTON M.R., SLOANE J.P. 1996. «Detection of allelic imbalance indicates that a proportion of mammary hyperplasia of usual type are clonal, neoplastic proliferations». *Lab Invest* **74**: 129-135.

- [12] TSAI Y.C., LU Y., NICHOLS P.W., ZLOTNIKOV G., JONES P.A., SMITH H.S. 1996. «Contiguous patches of normal human mammary epithelium derived from a single stem cell: implications for breast carcinogenesis». *Cancer Res* **56**: 402-404.
- [13] LAND C.E., MCGREGOR D.H. 1979. «Breast cancer incidence among atomic bomb survivors: implications for radiobiologic risk at low doses». *J Natl Cancer Inst* **62**: 17-21.
- [14] STINGL J., EAVES C.J., ZANDIEH I., EMERMAN J.T. 2001. «Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue». *Breast Cancer Res Treat* **67**: 93-109.
- [15] GINESTIER C., HUR M.H., CHARAFE-JAUFFRET E., MONVILLE F., DUTCHER J., BROWN M., JACQUEMIER J., VIENS P., KLEER C.G., LIU S., SCHOTT A., HAYES D., BIRNBAUM D., WICHA M.S., DONTU G. 2007. «ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome». *Cell Stem Cell* **1**: 555-567.
- [16] EIREW P., STINGL J., RAOUF A., TURASHVILI G., APARICIO S., EMERMAN J.T., EAVES C.J. 2008. «A method for quantifying normal human mammary epithelial stem cells with in vivo regenerative ability». *Nat Med* **14**: 1384-1389.
- [17] LIM E., VAILLANT F., WU D., FORREST N.C., PAL B., HART A.H., ASSELIN-LABAT M.L., GYORKI D.E., WARD T., PARTANEN A., FELEPPA F., HUSCHTSCHA L.I., THORNE H.J., FOX S.B., YAN M., FRENCH J.D., BROWN M.A., SMYTH G.K., VISVADER J.E., LINDEMAN G.J. 2009. «Aberrant luminal progenitors as the candidate target population for basal tumor development in BRCA1 mutation carriers». *Nat Med* **15**: 907-913.
- [18] VAN KEYMEULEN A., ROCHA A.S., OUSSET M., BECK B., BOUVENCOURT G., ROCK J., SHARMA N., DEKONINCK S., BLANPAIN C. 2011. «Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance». *Nature* **479**: 189-193.
- [19] VISVADER J.E., LINDEMAN G.J. 2011. «The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland». *Embo J* **30**: 4858-4859.
- [20] DALERBA P., CHO R.W., CLARKE M.F. 2007. «Cancer stem cells: models and concepts». *Annu Rev Med* **58**: 267-284.
- [21] BARABE F., KENNEDY J.A., HOPE K.J., DICK J.E. 2007. «Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice». *Science* **316**: 600-604.
- [22] SORLIE T., TIBSHIRANI R., PARKER J., HASTIE T., MARRON J.S., NOBEL A., DENG S., JOHNSEN H., PESICH R., GEISLER S., DEMETER J., PEROU C.M., LONNING P.E., BROWN P.O., BORRESENDALE A.L., BOTSTEIN D. 2003. «Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets». *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8418-8423.
- [23] MOLYNEUX G., GEYER F.C., MAGNAY F.A., MCCARTHY A., KENDRICK H., NATRAJAN R., MACKAY A., GRIGORIADIS A., TUTT A.,

- ASHWORTH A., REIS-FILHO J.S., SMALLEY M.J. «BRCA1 basal-like breast cancers originate from luminal epithelial progenitors and not from basal stem cells». *Cell Stem Cell* **7**: 403-417.
- [24] AL-HAJJ M., WICHA M.S., BENITO-HERNANDEZ A., MORRISON S.J., CLARKE M.F. 2003. «Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells». *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3983-3988.
- [25] LI X., LEWIS M.T., HUANG J., GUTIERREZ C., OSBORNE C.K., WU M.F., HILSENBECK S.G., PAVLICK A., ZHANG X., CHAMNESS G.C., WONG H., ROSEN J., CHANG J.C. 2008. «Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy». *J Natl Cancer Inst* **100**: 672-679.
- [26] TANEI T., MORIMOTO K., SHIMAZU K., KIM S.J., TANJI Y., TAGUCHI T., TAMAKI Y., NOGUCHI S. 2009. «Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers». *Clin Cancer Res* **15**: 4234-4241.
- [27] LIU H., PATEL M.R., PRESCHER J.A., PATSIALOU A., QIAN D., LIN J., WEN S., CHANG Y.F., BACHMANN M.H., SHIMONO Y., DALERBA P., ADORNO M., LOBO N., BUENO J., DIRBAS F.M., GOSWAMI S., SOMLO G., CONDEELIS J., CONTAG C.H., GAMBHIR S.S., CLARKE M.F. 2010. «Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models». *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 18115-18120.
- [28] MEYER M.J., FLEMING J.M., LIN A.F., HUSSNAIN S.A., GINSBURG E., VONDERHAAR B.K. 2010. «CD44^{pos}CD49f^{hi}CD133/2^{hi} defines xenograft-initiating cells in estrogen receptor-negative breast cancer». *Cancer Res* **70**: 4624-4633.
- [29] ABRAHAM B.K., FRITZ P., McCLELLAN M., HAUPTVOGEL P., ATHELOGOU M., BRAUCH H. 2005. «Prevalence of CD44⁺/CD24⁻/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis». *Clin Cancer Res* **11**: 1154-1159.
- [30] FUKUDA K., SAIKAWA Y., OHASHI M., KUMAGAI K., KITAJIMA M., OKANO H., MATSUZAKI Y., KITAGAWA Y. 2009. «Tumor initiating potential of side population cells in human gastric cancer». *Int J Oncol* **34**: 1201-1207.
- [31] REYNOLDS B.A., WEISS S. 1992. «Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system». *Science* **255**: 1707-1710.
- [32] MA I., ALLAN A.L. «The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells». *Stem Cell Rev* **7**: 292-306.
- [33] LEIS O., EGUIARA A., LOPEZ-ARRIBILLAGA E., ALBERDI M.J., HERNANDEZ-GARCIA S., ELORRIAGA K., PANDIELLA A., REZOLA R., MARTIN A.G. 2012. «Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells». *Oncogene* **31**: 1354-1365.

- [34] ROMERO-CAMARERO I., BARAJAS-DIEGO M., CASTELLANOS-MARTIN A., GARCIA-MARTIN A., VARELA G., ABAD M., LUDENA M.D., PEREZ-LOSADA J., SANCHEZ-GARCIA I. «New models towards assessing anti-cancer therapeutics». *Histol Histopathol* **27**: 157-170.
- [35] EGUIARA A., HOLGADO O., BELOQUI I., ABALDE L., SANCHEZ Y., CALLOL C., MARTIN A.G. «Xenografts in zebrafish embryos as a rapid functional assay for breast cancer stem-like cell identification». *Cell Cycle* **10**: 3751-3757.
- [36] PONTI D., COSTA A., ZAFFARONI N., PRATESI G., PETRANGOLINI G., CORADINI D., PILOTTI S., PIEROTTI M.A., DAIDONE M.G. 2005. «Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties». *Cancer Res* **65**: 5506-5511.
- [37] LEIS O., LOPEZ-MATO M., MARTIN A.G. 2012. «Circulating Tumor Stem Cells as Biomarkers for Cancer Progression». *Recent Patents on Biomarkers* **2**: 36-53.
- [38] POLYAK K., HAHN W.C. 2006. «Roots and stems: stem cells in cancer». *Nat Med* **12**: 296-300.
- [39] SANCHEZ Y., MARTIN A.G. 2011. «Recent developments in targeting breast cancer stem cells» *Current Patents in Regenerative Medicine* **1** 1-18.