

CÉLULAS MADRE Y CÁNCER *

MARÍA CASCALES ANGOSTO

Académica de Número de la Real Academia de Doctores de España

1. INTRODUCCIÓN

La hipótesis de la existencia de las *células madre cancerosas* propone que los tumores surgen a partir de un pequeño grupo de células que poseen las propiedades de células madre adultas, tales como auto-renovación y capacidad de diferenciarse en tipos celulares múltiples. Estas células persisten en los tumores como una población diferente que causa la recaída de la enfermedad y la metástasis. Al parecer, son las únicas células capaces por ellas mismas de generar un tumor y por tanto las células madre cancerosas son quizá la fuente de todos los cánceres.

En lo profundo de cada tumor tiene su morada una pequeña cantidad de células madre aberrantes que mantienen el tejido maligno. Esto explica por qué los tumores se regeneran a menudo incluso después de ser destruidos, y trata de conseguir estrategias diferentes en el desarrollo de fármacos anti-cáncer, que han de ser seleccionados por su capacidad de destruir las células madre cancerosas y no por su capacidad de destruir cualquier célula del grueso del tumor.

Las células madre cancerosas se identificaron por primera vez en 1997, por John Dick y colaboradores de la Universidad de Toronto, en ciertos tipos de leucemia. Estos investigadores no pudieron detectarlas en tumores sólidos porque sólo poseían los medios para reconocer los marcadores de las células madre precursoras de células sanguíneas. Sin embargo, en 2003 Michael Clarke, en Stanford, las identificó en tumor mamario y demostró que una gran mayoría de células en este tumor eran incapaces de crecer por sí solas y que sólo una pequeña fracción de células de ese tumor eran capaces de desarrollar nuevos cánceres. Más tarde, en 2004, Peter Dirks, de la Universidad de Toronto, identificó células madre en tumores de cerebro humano, y poco después, Parker Gibbs, de la Universidad de Florida, las encontró en cáncer de hueso. La existencia de las células madre cancerosas es uno de los descubrimientos más importantes en los últimos años en la investigación del cáncer.

Hasta la fecha se duda de la procedencia de tales células madre cancerosas. Pueden proceder de células madre normales que han sufrido una mutación que perturba el control estricto de su autorenovación, o derivan de su inmediata progenie que

* Conferencia pronunciada en la Real Academia de Doctores de España el 9 de abril de 2008.

sufre algún cambio genético después del cual, en lugar de desarrollar células diferenciadas maduras, se desdiferencian y readquieren el poder de autorenovarse.

2. CÉLULAS MADRE Y SU RELACIÓN CON LA TUMORIGÉNESIS

El desarrollo de un organismo multicelular requiere la orquestación crítica de cascadas de eventos, tales como división de células madre y determinación de su destino, proliferación celular y migración a nichos específicos, diferenciación y apoptosis, etc. En el estado adulto, la división y diferenciación de un número pequeño de células, en tejidos sanos, asegura el continuo recambio y el funcionamiento óptimo. El cáncer se considera una enfermedad debida a la alteración de esta organización como consecuencia de la acumulación de eventos genéticos y epigenéticos a nivel germinal y somático, que ocasiona una proliferación y diferenciación disfuncional de células que comparten diversas características con las células madre. Esto ha conducido a los científicos a emitir dos hipótesis alternativas: *a*) que las células madre sean el objetivo de las mutaciones transformantes, o *b*) que la desdiferenciación de células terminales diferenciadas transformadas sea la causa de la aparición de las células madre cancerosas.

Hasta hace relativamente poco el cáncer era considerado una enfermedad cuya característica principal consistía en el desarrollo de una masa homogénea formada por células en rápida proliferación, y las terapias para combatir esta enfermedad se diseñaban para eliminar las células altamente proliferativas. Recientes estudios han demostrado que las células tumorales son heterogéneas con respecto a proliferación y diferenciación, y que la tasa proliferativa celular es un indicador pobre de su potencial tumorigénico. En diversos tumores, la capacidad de iniciar y mantener el crecimiento tumoral se ha encontrado que reside en una pequeña población de células denominadas **células madre cancerosas** (*cancer stem cells*). Al igual que las células madre normales, las células madre cancerosas tienen la capacidad de renovación y de generar la variedad de células proliferantes y diferenciadas que hacen el grueso del tumor. Muy importante es que las células madre cancerosas son relativamente quiescentes y no resultan afectadas por terapias dirigidas a células en rápida división. La elevada expresión de transportadores que expulsan los agentes quimioterapéuticos y la elevada capacidad de reparación del DNA, contribuyen también a la supervivencia de las células madre cancerosas ante la quimioterapia convencional.

El descubrimiento de células madre cancerosas en tumores sólidos ha cambiado la opinión de los científicos sobre la carcinogénesis. Una de las características de las células madre de la médula ósea que se requiere para la hematopoyesis normal, es su capacidad de auto-renovación. En el sistema hematopoyético existen tres poblaciones diferentes de progenitores multipotentes: células madre con una capacidad de auto-renovación a largo plazo, células madre con una capacidad de auto-renovación a corto plazo y células progenitoras multipotentes que no pueden renovarse, pero pueden diferenciarse en una variedad de linajes en la médula ósea. Los progenitores multipotentes y sus linajes derivados sufren divisiones rápidas, lo que les permite la repoblación de la médula. Se desconocen los factores que determinan la capacidad auto-renovadora de una célula y como las células cancerosas adquieren esta capacidad.

La capacidad regeneradora en cualquier órgano o tejido se desencadena por activación de células madre quiescentes que se localizan en nichos específicos. La activación

está mediada por señales recibidas a través de vías de señalización tales como Wnt, Hedgehog o Notch, seguida de una secuencia de eventos estrictamente regulados a nivel genético y epigenético y por el microambiente circundante. Como resultado de este proceso se establece una jerarquía bien definida que comienza a partir de la célula madre poco proliferativa (quiescente) y da lugar a la amplificación transitoria (TA) de precursores tempranos y tardíos con capacidad proliferativa elevada. Estos precursores generan progenitores comprometidos en el linaje y finalmente células diferenciadas terminales no proliferativas especializadas en la función del órgano (Figura 1).

La homeostasis tisular se consigue entre el número de células diferenciadas terminales y una nueva activación de la célula madre, de manera que se asegure el recambio celular necesario para el mantenimiento del equilibrio funcional dentro del órgano. La mayoría de los tejidos que se renuevan caen dentro de esta categoría. Cada vez que una célula madre se divide genera dos células hijas; una de ellas es una nueva célula madre y la otra es una célula comprometida con asimetría conseguida sobre una población base como también a nivel de divisiones celulares individuales. La asimetría de la población facilita la respuesta a las necesidades fisiológicas variables, por ejemplo, durante la cicatrización de las heridas. Las células en cada nivel de jerarquía responden de manera diferente a señales extrínsecas: específicamente cada tipo celular requiere diferentes señales para progresar al nivel siguiente. Esto implica la importancia del microambiente en la regulación de la supervivencia de la célula madre y en la protección de su composición genética, mientras que imparte la diversidad funcional de las células diferenciadas en el órgano.

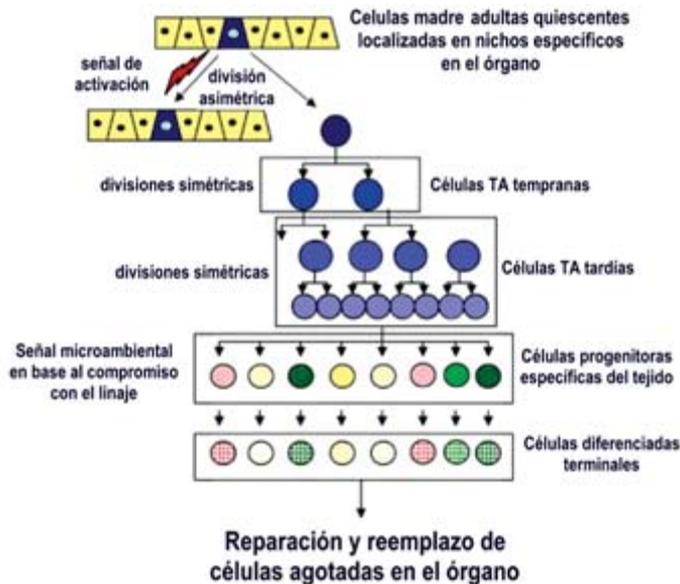


Figura 1. *Jerarquía de las células madre en la regeneración de un tejido normal. Una célula madre adulta quiescente, localizada en nichos específicos dentro del órgano, recibe una señal, se activa y sufre división asimétrica, generando una nueva célula madre y una célula amplificadora transitoria (TA) con descendencia de células TA tempranas y células TA tardías. En respuesta a una señal microambiental en base al compromiso del linaje, se generan células progenitoras específicas del tejido cuya descendencia serán las células diferenciadas terminales sin capacidad proliferativa (Bapat, 2007).*

En el sistema hematopoyético, así como en otros tejidos normales, las células madre tienen la capacidad de auto-renovarse, ser pluripotentes y mantenerse en estado quiescente en G0, la mayor parte de su tiempo. Así como las células madre pueden reparar su DNA, en el proceso de auto-renovación podrían acumular mutaciones adquiridas tras su exposición a agentes carcinógenos. Si los tumores surgen a partir de las células madre, la acumulación de estas mutaciones debe ser lo que se ha reconocido como el *proceso multiescalonado de la carcinogenesis*. Cabe preguntarse, ¿surgen las células madre cancerosas de células madre normales o surgen de células diferenciadas que adquieren capacidad de auto-renovarse? ¿Contribuye la resistencia innata de las células madre normales a la radiación y a las toxinas, al fracaso de algunas terapias del cáncer? ¿Cómo se puede aprovechar el conocimiento de las células madre para seleccionarlas específicamente y mejorar la terapia?

Las células madre normales en el organismo adulto son las responsables de la renovación y reparación del tejido dañado o envejecido. Se auto-renuevan sin perder su capacidad proliferativa, son inmortales y resistentes a la acción de fármacos. Pueden diferenciarse y formar tipos específicos de tejidos, debido a la influencia del microambiente que las rodea y a otros factores. Las células madre cancerosas son, en muchos aspectos, similares a las células madre normales. Se ha demostrado que las células tumorales son heterogéneas que comprenden pocas células tumorales iniciadas y abundantes células tumorales no iniciadas. Las células tumorales iniciadas —células madre tumorales— se auto-renuevan, proliferan indefinidamente, son resistentes a fármacos, y expresan marcadores típicos de células madre.

Hasta la fecha, se ha comprobado la existencia de células madre cancerosas en la leucemia mieloide aguda y crónica, cáncer de mama, tumores de cerebro, cáncer de pulmón y tumores gastrointestinales. El modelo de células madre cancerosas es consistente también con algunas observaciones clínicas. Aunque la quimioterapia convencional destruye la mayoría de las células de un tumor, las células madre cancerosas permanecen viables. A pesar del pequeño número de tales células, éstas deben ser la causa de la recurrencia tumoral, a veces muchos años después del tratamiento «con éxito» del tumor primario. El crecimiento de la metástasis en distintas áreas del organismo y su heterogeneidad celular puede ser la consecuencia de la diferenciación y/o desdiferenciación y división asimétrica de las células madre cancerosas.

La heterogeneidad tumoral y las características compartidas de las células madre normales y las células cancerosas ha llevado a considerar el concepto de células madre cancerosas. No obstante, ha sido un desafío la obtención de evidencia firme empírica que apoye que las células madre tumorales sean el verdadero origen del cáncer. Las células madre embrionarias dependen de un grupo de proteínas policombo (PcG) que reprimen reversiblemente los genes que dan lugar a factores de transcripción requeridos para la diferenciación. Se ha emitido la hipótesis de que la metilación del DNA en el promotor de estos genes reprimidos puede eliminar el fenotipo de célula madre e iniciar la expansión clonal anormal que predispone al cáncer. Recientemente se han identificado genes que son dianas para la represión transcripcional en células madre embrionarias humanas.

3. CÉLULAS MADRE TUMORALES Y ORIGEN DEL CÁNCER

La alteración de la homeostasis del tejido normal, a pesar de la existencia de controles a varios niveles, por transformación de las células madre adultas, por maduración de las células progenitoras y/o porque las células diferenciadas adquieren la capacidad de re-entrar en el ciclo celular y sufrir proliferación incontrolada, son las causas que han de ser consideradas para la generación de células madre tumorales. La adquisición de características tales como auto-renovación, organización en una jerarquía específica, resistencia a la apoptosis y a fármacos y la migración celular, contribuyen a la plétora de características de las células madre que sugieren la implicación de éstas durante el proceso de la progresión tumoral. La evidencia de la existencia de células madre cancerosas surge del conocimiento de que sólo una pequeña fracción de células tumorales (0,2-1%) están dotadas con capacidad regeneradora de tumores. Es imperativo comprender los mecanismos desencadenantes del tumor para definir los objetivos específicos para nuevos avances terapéuticos.

Células con cualidades de células madre se han identificado en procesos malignos de origen hematopoyético y en tumores sólidos. La existencia de tal población implica que la célula madre representa la célula origen del tumor, como se muestra en la Figura 2. Se puede predecir que tales células madre cancerosas representan sólo una pequeña fracción de un tumor, que es la que posee la capacidad de regenerar un tumor, pero la mayoría de las células del tumor carecen de esta capacidad regenerativa. Por ejemplo, la mayor parte de las células tumorales cuando se cultivan en agar o se inyectan a ratones, no producen colonias. De igual manera, estudios en leucemia mielógena crónica han demostrado que sólo del 0,1-1% de todas las células tienen actividad iniciadora de leucemia. Estas células iniciadoras de leucemia tienen muchos marcadores y propiedades de las células madre hematopoyéticas normales. Por tanto, se cree que la leucemia surge a partir de una célula madre que se transforma y da lugar a una gran población de clones que proliferan, pero que no pueden auto-renovarse o diferenciarse totalmente. Poblaciones similares de células con capacidad de auto-renovación, tales como aquéllas que acarrearán la traslocación cromosómica t(9;22)(q34;q11), que forma el gen de fusión *bcr-abl*, han sido identificadas en pacientes con leucemia linfocítica crónica y leucemia mielógena crónica (CML).

La demostración de la existencia de células pluripotentes en tumores sólidos procede de observaciones clínicas con teratocarcinomas humanos, experimentos en los cuales aparecen en la masa tumoral tejidos diferenciados como músculo y hueso, y de observaciones que demuestran que las células de teratocarcinoma de ratón pueden producir un ratón normal. En lugar de los marcadores hematopoyéticos, las células madre identificadas a partir de tumores sólidos expresan marcadores específicos del órgano. En ocho de nueve muestras de cáncer de mama, por ejemplo, se encontró una población de células madre tumorigénicas que expresaba el único perfil marcador de superficie celular CD44⁺CD24^{-/low}Lin⁻. Esta población se enriqueció 50-100 veces con células capaces de formar tumores en ratón. Los tumores resultantes poseían la heterogeneidad fenotípica encontrada en la población original del tumor, células tumorigénicas y no tumorigénicas. En otros estudios, la sobreexpresión de la familia de genes WNT, reguladores importantes del desarrollo celular normal, condujo a la expansión del reservorio de células madre mamarias y a la susceptibilidad al cáncer. Finalmente, células madre con una capacidad de auto-renovarse y sufrir diferenciación pluripotencial se han aislado de tumores del sistema nervioso central en humanos.

Las células madre normales generan células progenitoras multipotentes, progenitoras comprometidas y células diferenciadas maduras. Las mutaciones en las células madre dan lugar a una célula madre con proliferación aberrante y origina una lesión premaligna. Mutaciones adicionales conducen a la adquisición de mayor capacidad proliferativa, disminución de la apoptosis, evasión del sistema inmune y mayor expansión del compartimento de células madre que es típico de tumores malignos (Figura 2).

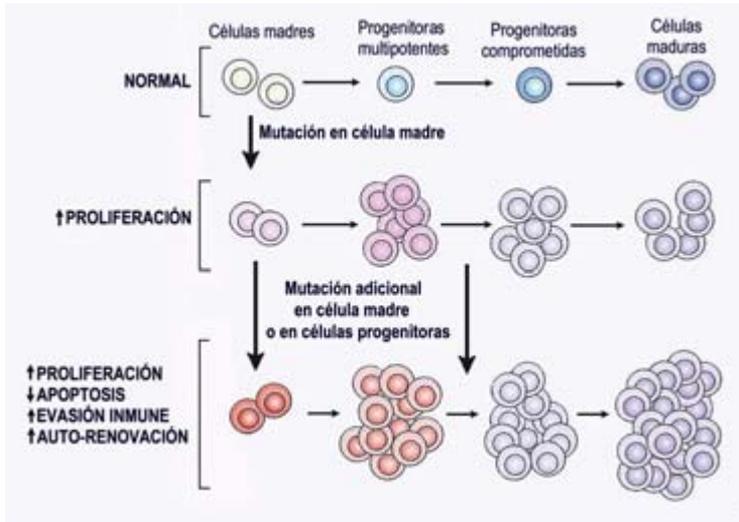


Figura 2. **Células madre cancerosas y progresión tumoral.** Las células madre normales dan origen a células progenitoras multipotentes, células progenitoras comprometidas y células maduras diferenciadas. Las mutaciones en una célula madre origina una célula madre con proliferación aberrante que va a ser precursora de una lesión premaligna. Mutaciones adicionales en las células madre o en células progenitoras conllevan la adquisición de mayor capacidad proliferativa, disminución de la apoptosis, evasión del sistema inmune, mayor auto-renovación y expansión del compartimento de células madre, típico de tumores malignos (Dean, Fojo y Bates, 2005, modificado).

El origen exacto de las células madre pluripotentes en tumores puede variar. Pueden surgir de la transformación maligna de una célula madre normal que ha acumulado agresiones oncogénicas a lo largo del tiempo. Alternativamente, la célula original del tumor puede ser una célula más diferenciada que desarrolla la capacidad de auto-renovación continua, adquiriendo así las propiedades de una célula madre. La distinción entre estas dos posibilidades es difícil. Se ha demostrado recientemente, en estudios de la progresión de CML, que otras células que no son células madre pueden adquirir la capacidad de auto-renovarse. La fase crónica de la enfermedad ocurre cuando una célula madre adquiere la expresión de la proteína de fusión BCR-ABL, lo que conduce a un incremento en la proliferación de las células dentro del reservorio del progenitor granulocito-macrófago y su posterior progenia. Se ha sugerido que la progresión a BLAST CRISIS «crisis explosiva» en pacientes con CML, seguida de eventos adicionales genéticos o epigenéticos, confiere a las células progenitoras la capacidad de auto-renovación, haciéndolas indistinguibles de una célula madre leucémica. Se necesitan más pruebas para confirmar que una progresión de este tipo ocurre a nivel del reservorio progenitor, pero la propuesta del compartimento de células madre, no definido rígidamente, es atractivo y sugiere un grado de plasticidad en el cáncer.

Las células madre cancerosas (con capacidad de auto-renovación inherente o adquirida), dan origen a células que no se renuevan a largo plazo, pero retienen una capacidad finita para dividirse. En la fisiología normal, esto se denominaría «diferenciación», ya que la célula adquiere rasgos específicos de su enclave en el tejido, pero en el cáncer, las células carecen de la capacidad de sufrir la diferenciación a células fenotípicamente maduras. Diferenciación limitada ocurre a menudo y da origen a las diferencias histopatológicas bien conocidas entre tumores. De hecho, cuanto más allá vaya la célula cancerosa por esta vía, más diferenciada se volverá y más parecida a la célula normal, según su menor velocidad de crecimiento. Donde encajan los tan denominados tumores desdiferenciados es incierto, pero es posible que la auto-renovación sea una propiedad que represente un elevado orden de diferenciación.

Por tanto, las células madre tumorales comparten muchas propiedades con las células madre normales. Se acepta, en general, que las células madre normales muestran propiedades que les proporcionan larga vida, tales como relativa quiescencia, resistencia a fármacos mediante la expresión de varios transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), activa capacidad de reparación del DNA y resistencia a la apoptosis. De esto se deduce que las células madre tumorales siguen el comportamiento de las normales y poseen estos mecanismos de resistencia. El paradigma de la resistencia originado en el fenotipo de la célula madre puede estimular nuevas estrategias para el desarrollo de la terapia anticáncer.

4. CÉLULAS MADRE Y PROGRESIÓN TUMORAL

No está aún totalmente esclarecido el papel de las células madre en el recambio tisular normal. Se sabe incluso menos del papel que juegan las células madre en los procesos malignos. El concepto de la existencia de células madre que funcionan en los tumores tiene su base en varias observaciones. Los tumores están compuestos por una mezcla heterogénea de células tumorales que se encuentran en diversos grados de diferenciación, muy similar a lo que ocurre en la estructura de un órgano. A partir de estudios en tumores *in vivo* e *in vitro* se ha llegado a la observación de que sólo una pequeña fracción de células en un tumor posee capacidad de auto-renovarse. Se puede por tanto, argumentar, que mientras que todas las células de un tumor sean iguales, en un determinado momento, sólo una pequeña fracción de células se encuentra en un estado apropiado o sometido a estímulos externos para formar un nuevo tumor. Alternativamente, puede razonarse que existe una población de células predeterminada, con fenotipo de «células madre cancerosas», capacitadas para perpetuar el tumor, mientras que otras células del mismo tumor son incapaces de auto-renovarse. Para comprobar esto último, se requiere el aislamiento prospectivo de esta población. Esto fue realizado por el grupo de John Dick, que demostró que las células capaces de establecer un fenotipo humano AML (*acute myeloid leukaemia*) en un ratón recipiendario, fueron aisladas de una fracción celular que contenía células madre hematopoyéticas, definidas como fenotipo CD34+ CD38-. Posteriormente estas células se pasaron de un animal a otro manteniendo el fenotipo AML, lo que confirmó la propiedad de auto-renovación. Así se demostró por primera vez que existen células en el tumor que tienen propiedades similares a las de las células madre, por ejemplo, capacidad de reconstituir el tumor cuando se trasplantan en un recipiendario apropiado (diferenciación) a través de varias rondas de trasplante (auto-renovación).

De la misma manera se ha llegado a la identificación de subpoblaciones de células tumorales con propiedades de células madre en tumores de mama, gliomas, melanomas, cáncer de próstata y osteosarcoma. Estas observaciones han conducido a la hipótesis de las «células madre cancerosas» que postula que dentro de un tumor, una pequeña proporción de células con ilimitada capacidad proliferativa, conduce el crecimiento tumoral (Figura 3A). Este modelo encaja con la observación de que la mayoría de los cánceres comprenden una población heterogénea de células que han sufrido variados grados de diferenciación. También en línea con esta observación está el hecho que las terapias convencionales que se dirigen a células activas en división, pueden reducir el grueso del tumor, pero no previenen su posterior crecimiento, posiblemente porque la terapia convencional no destruye las células madre cancerosas (Figura 3B). Por tanto se puede concluir que existen paralelismos entre las células madre cancerosas y las células madre normales como también entre los órganos normales y los tumores.

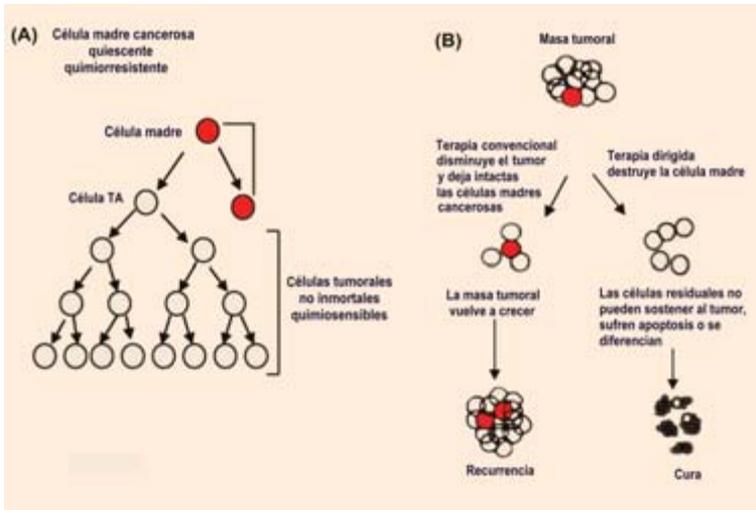


Figura 3. **Impacto de las células madre cancerosas sobre el crecimiento tumoral y la respuesta a la terapia.** (A) Un subgrupo de células en un tumor tiene la capacidad de replicarse y sostener el crecimiento tumoral. Estas células madre cancerosas se dividen generando una célula hija idéntica inmortal (círculo rojo) y células transitorias amplificadoras (TA, círculo blanco). Son las células TA las responsables del grueso de la proliferación celular y es el tipo sensible a la terapia cancerosa. (B) Resultado posible de las células madre cancerosas versus la terapia convencional que no las afecta (Haughton et al., 2007, modificado).

El paradigma de las células madre tumorales implica la coexistencia, en una sola célula, de funciones contradictorias, tales como auto-renovación y diferenciación. Estas propiedades deben ser rigurosamente demostradas a nivel de una sola célula *in vivo* para que esa célula pueda ser considerada una verdadera célula madre. Además, las células madre deben ser capaces de recrear o mantener tejidos *in vivo* a nivel de una sola célula y hacer esto en trasplantes secuenciales. En cánceres tales como leucemia, cáncer de mama y tumores de cerebro, se han encontrado ciertos subgrupos de células tumorales capaces de recrear *in vivo* el tumor en toda su complejidad. De todas maneras se discute todavía la idea de célula madre tumoral y aunque la idea es sólida no es aún definitiva. A partir de tejidos adultos, el concepto y características de las células madre ha sido mejor definido: relativa quiescencia, relativa resistencia a estímulos de

factores de crecimiento, transportadores activos ABC de tipos específicos (ABCG2), capacidad para enraizamiento eficiente y perfiles de expresión que incluyen bajos niveles de factores de transcripción restringidos a programas de diferenciación. Cada célula puede auto-renovarse y a la vez proporcionar progenia diferenciada de linajes múltiples, pero la cinética de repoblación tiene que ser diferente en el comienzo y en el final. Hope *et al.*, han demostrado cinéticas similares en las poblaciones celulares capaces de trasplantar el fenotipo leucémico y concluyen que el reservorio de células madre leucémicas refleja una organización de células repobladoras a corto plazo, a largo plazo e incluso quiescentes a largo plazo. Estas células aparecieron en el mismo paciente, así que no es probable que reflejen un único grupo de células resultantes de un solo evento transformante. En cambio estas células pueden estar organizadas como población de células madre normales, con células repobladoras a largo plazo y con células repobladoras a corto plazo, derivadas de las repobladoras a largo plazo, pero también es posible que estas células fueran una población descendiente de una célula transformada. En el último grupo, la relación entre clones es «histórica», ya que los clones pueden no estar organizados jerárquicamente (Figura 4). Este modelo guarda el tradicional concepto del cáncer con unidades auto replicadoras (Figura 4A). Sin embargo, se ha encontrado que algunos clones, repobladores a largo plazo, conducen a clones repobladores en receptores secundarios, lo que sugiere una ordenada descendencia coherente con la organización jerárquica esperada si la célula madre tumoral sigue el paradigma de las células madre normales (Figura 4B).

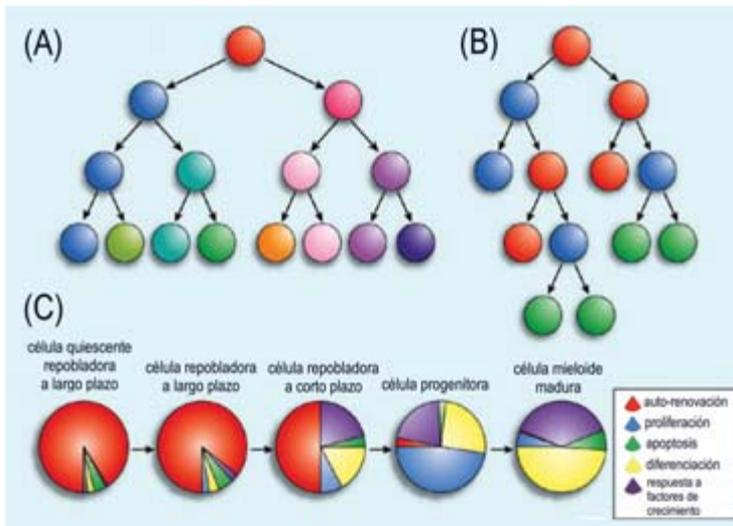


Figura 4. **El paradigma de las células madre para el cáncer añade orden a un proceso anárquico.** (A) Las células madre generan células hijas con genotipos frecuentemente mutados no relacionados con otros y capaces de generar múltiples descendientes, algunos con mutaciones adicionales. El resultado último es un «enjambre» de células con diferentes genotipos. (B) Las células madre tumorales (círculos en rojo) generan una célula hija idéntica a la madre y otra célula diferente más diferenciada (círculo azul), lo cual va a resultar últimamente en una colección de células de fenotipos variados, organizadas jerárquicamente. (C) El estado de las células cambia de manera ordenada a medida que las células transitan desde una célula madre como fenotipo. La alteración del orden de este proceso por imposición o capacitación de las características similares a las células madre en células más diferenciadas o maduras puede permitir que una célula madre tumoral surja a partir de una célula no originalmente célula madre (Scadden 2004, con modificaciones).

Si las células madre cancerosas son como las células madre normales, puede sugerirse que los cánceres derivan de las células madre. Es necesario hacer una distinción entre la célula madre cancerosa y la célula madre del cáncer. Los resultados, anteriormente mencionados, sugieren que una célula madre muy temprana fue probablemente el tipo de célula transformada en los individuos estudiados y la célula madre que fue transformada en leucémica retenía alguna capacidad para generar descendencia más madura, y así surgió la célula madre cancerosa. La célula en la cual se originó el cáncer no tuvo que ser necesariamente una célula madre, probablemente las células más maduras fueron las que adquirieron funciones similares a las células madre. Varias características cambian cuando la célula madre se diferencia (Figura 4C). El decrecimiento relativo, en la capacidad auto-renovadora, puede alterarse en la célula transformada si se alteran los genes que regulan la auto-renovación. El acoplamiento de estos con otros cambios que afectan a la proliferación, apoptosis o la respuesta a las señales de los factores de crecimiento, contribuye a que una célula más madura funcione como una célula madre, dependiendo de cómo estén desordenadas esas características para que surja un proceso maligno. Es por tanto improbable, que el cáncer sea una enfermedad uniforme de las células madre. En algunos casos, las células carentes de este carácter pueden adquirir las características hereditarias de células madre, con lo que se crean, *de novo*, células madre del cáncer.

5. NICHOS VASCULARES Y CÉLULAS MADRE TUMORALES

De lo anteriormente comentado se deduce que existen ya evidencias convincentes de que el grueso de las células malignas en los tumores se genera por una pequeña fracción de células auto-renovables, multipotentes, e iniciadoras de tumores que se denominan células madre tumorales. Las células madre de los diversos tejidos existen en nichos protectores compuestos por un número de células con diversos grados de diferenciación. Estas células maduras proporcionan contactos celulares y secretan factores que mantienen a las células madre en un estado quiescente. De esta manera las células madre cancerosas o tumorales surgen de las células madre normales que han adquirido mutaciones que les permite escapar al control de los nichos. Alternativamente, la alteración de los factores extrínsecos en el nicho puede llevar a proliferación aberrante de las células madres y a la tumorigénesis.

Si las células madre tumorales dependen del microambiente aberrante en el nicho, estos nichos representan objetivos importantes para el tratamiento del cáncer. Los nichos, además de regular la proliferación celular y el destino de las células, juegan un papel protector, a modo de escudo, frente a las agresiones ambientales entre las que se encuentra la quimioterapia. Por eso, la resistencia de las células madre tumorales a las terapias convencionales puede ayudar a explicar por qué tales terapias fracasan tan a menudo. Aunque destruyen el grueso del tumor, no pueden, sin embargo, prevenir la supervivencia de las células madre tumorales que, pasado el tiempo, volverán a regenerar el tumor. El tratamiento efectivo del cáncer requerirá dirigir la terapia a las mismas células madre tumorales o a los nichos donde se albergan. Pero, ¿cuáles son las señales que regulan la supervivencia y función de estas células?

Un medio de identificar los reguladores de las células madre cancerosas es observar las analogías con las células madre normales. Recientes trabajos de Calabresse *et al.*, han encontrado que una característica importante de las células madre neurales

(NSC), es que se encuentran concentradas en regiones ricas en vasos sanguíneos, denominados *nichos vasculares*, a los que antes se ha aludido. Estos nichos protegen las NSC de los estímulos apoptóticos y les permite mantener su propio equilibrio entre la auto-renovación y la diferenciación. Las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos secretan factores que promueven la supervivencia y auto-renovación de las células madre y se cree que son un componente clave de los nichos NCS.

Las células madre cancerosas en tumores cerebrales, al igual que las NSC, residen en nichos vasculares, la alteración de estos nichos puede ser la clave para eliminarlas. Se ha demostrado que las células que expresan marcadores de células madre cancerosas representan una fracción muy pequeña del tejido tumoral que se localiza cerca de los capilares en el interior del tumor. Se ha observado que estas células se asocian rápida y selectivamente, en cultivo, con células endoteliales, mientras que otras células del tumor no lo hacen. Cuando se cultivaron las células endoteliales con las células madre cancerosas se elevó, en estas últimas, su capacidad de auto-renovación. Esta interacción de los dos tipos de células supuso la formación de tumores de mayor tamaño cuando ambos tipos de células se trasplantaron en conjunto. Además los tumores establecidos en presencia de células endoteliales contenían 25 veces más células madre cancerosas que cuando se trasplantaron estas últimas aisladas.

Recientes evidencias sugieren que la relación entre las células madre cancerosas y el nicho vascular ha de ser bidireccional, y así como el nicho puede soportar el crecimiento y renovación de las células madre cancerosas, éstas han de contribuir al mantenimiento del nicho. Las células madre cancerosas de gliomas secretan elevados niveles de VEGF, que incrementan la migración de las células endoteliales. Esta relación recíproca suscita la pregunta de cómo el nicho se genera: ¿son atraídas las células madre cancerosas hacia los vasos sanguíneos preexistentes o son las células madre cancerosas las que crean una red vascular para sostenerlas? En cualquier caso la interdependencia de las células madre cancerosas y las células endoteliales hacen que el nicho vascular sea un objetivo importante para la terapia.

El uso de terapia antiangiogénica no es nuevo, pero mientras numerosos estudios han sugerido que previniendo el crecimiento de nuevos vasos se inhibiría el tumor, el mecanismo utilizado por esta terapia permanece en debate. Se ha sugerido que un mecanismo mediante el cual los agentes antiangiogénicos pueden actuar es alterando el nicho vascular necesario para la auto-renovación de las células madre cancerosas. La idea de que la terapia antiangiogénica tenga como objetivo las células madre tumorales tiene importantes implicaciones para evaluar y optimizar el uso de fármacos antiangiogénicos en cáncer. Así, por ejemplo, se ha observado que los agentes antiangiogénicos tienen un efecto notable sobre la autorenovación de las células madre tumorales, pero tienen poco o carecen de efecto sobre la proliferación y/o apoptosis de la mayoría de las otras células del tumor. Esto demuestra, en parte, que en la evaluación de las terapias antiangiogénicas, no es suficiente esperar una rápida regresión del tumor. Más bien sería necesario examinar cuidadosamente la morfología y propiedades funcionales de las células tumorales para determinar si un agente particular ejerce algún efecto.

En general, las terapias que se dirigen a las células madre cancerosas pueden tener propiedades únicas si se comparan con las terapias dirigidas al grueso del tumor. Asumiendo que las células madre cancerosas representen sólo una pequeña propor-

ción del tumor completo, destruirlas puede tener poco impacto a corto plazo en el tamaño del tumor completo. Sin embargo, a largo plazo se puede esperar que el tumor se agote y marchite porque ha perdido la capacidad de auto-renovarse. En este sentido, puede ser crítico combinar la terapia dirigida hacia las células madre cancerosas con agentes convencionales que destruyan el tumor. De hecho, las combinaciones de fármacos antiangiogénicos con la quimioterapia convencional son más eficientes que cualquier modo de terapia por sí solo. El desafío es encontrar las combinaciones apropiadas de agentes terapéuticos para conseguir deshacer el grueso del tumor y eliminar las células madre cancerosas.

6. TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS EN CÉLULAS MADRE

Las células madre tienen muchas propiedades que las separan de las células diferenciadas maduras. Además de su capacidad para autorenovarse y diferenciarse, son quiescentes ya que se dividen poco. Requieren también ambientes específicos que incluyen otras células, estroma y factores de crecimiento para su supervivencia. Una propiedad importante de las células madre es que expresan considerables niveles de transportadores de fármacos específicos ABC. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas expresan elevados niveles de ABCG2, pero el gen que codifica este transportador deja de expresarse en la mayoría de las células sanguíneas comprometidas diferenciadas y maduras. Los dos genes que codifican transportadores ABC que han sido más estudiados en células madre son el *abcb1*, que codifica la P-glicoproteína, y el *abcg2*. Junto con el *abcc1* representan los tres genes principales de *multiresistencia a fármacos* que han sido identificados en células tumorales. Las proteínas codificadas por estos genes, miembros de la superfamilia ABC, son promiscuas de compuestos hidrofílicos e hidrofóbicos (Tabla 1), ejercen un papel importante en la fisiología del transporte normal de fármacos a través de placenta e intestino y son

TABLA 1. *Transportadores ABC implicados en multiresistencia a fármacos*

<i>Gen</i>	<i>Proteína</i>	<i>Fármacos quimioterapéuticos expulsados por el transportador</i>
abca2	ABCA2	Estramúsina
abcb1	PGP/MDR	Colchicina, doxorubicina, etoposido, vinblastina, paclitaxel
abcc1	MRP1	Doxirubicina, daunorubicina, vincristina, etopósido, colchicina, camptotecinas, metotrexato
abcc2	MRP2	Vinblastina, cisplatino, doxorubicina, metotrexato
abcc3	MRP3	Metotrexato, etoposido
abcc4	MRP4	6-mercaptopurina, 6-tioguanina y metabolitos, metotrexato
abcc5	MRP5	6-mercaptopurina, 6-tioguanina y metabolitos
abcc6	MRP6	Etoposido
abcc11	MRP8	5-fluouracilo
abcg2	MXR/BCRPI	Mitoxantrona, topotecan, doxorubicina, daunorubicina, daunorubicina, irinotecan, imatinib, metotrexato

ABC, ATP binding cassette; BCRP, proteína de resistencia en cáncer mamario (*breast cancer resistance protein*); MDR, *multidrug resistance*; MRP, *multidrug resistance associated protein*; MXR, *mitoxantrona resistance protein*,

componentes importantes de las barreras hematoencefálica y hematotesticular. Utilizando la hidrólisis del ATP, estos transportadores expulsan activamente los fármacos de las células, lo que sirve para protegerlas de los agentes citotóxicos. Ratones deficientes en los genes *abcg2*, *abcb1* o *abcc1* son viables, fértiles y tienen compartimentos de células madre normales. Esto indica que ninguno de estos genes se requiere para el crecimiento o mantenimiento de las células madre. Sin embargo, los ratones *knockout* son más sensibles a los efectos de fármacos, tales como vinblastina, ivermectina, topotecan y mitoxantrona, lo cual es coherente con el papel de protección ejercido por los transportadores ABC frente a efectos tóxicos de fármacos y toxinas.

6.1. Células SP en tumores y líneas celulares

La capacidad transportadora de fármacos de las células madre, que les confiere los transportadores ABC, es un marcador importante cuando se trata de aislar y analizar las células madre hematopoyéticas. La mayoría de las células acumulan fluorocromos, tales como Hoechst 33342 y rodamina 123, pero las células madre no, ya que estos compuestos son expulsados de las células por ABCG2 y ABCB1, respectivamente. Como estas células no acumulan fluorocromos, pueden ser seleccionadas y recolectadas en función de los bajos niveles de fluorescencia Hoechst 33342 o rodamina 123, que incorporan, por lo que se las denomina «células apagadas» (*dull cells*) o «población lateral» (*side population, SP*). El término población lateral se acuñó porque durante los análisis por citometría de flujo se visualizaban, como población negativa a la tinción por el fluorocromo, a un lado de la mayoría de células (Figura 5). Una gran fracción de células madre hematopoyéticas se encuentra en la

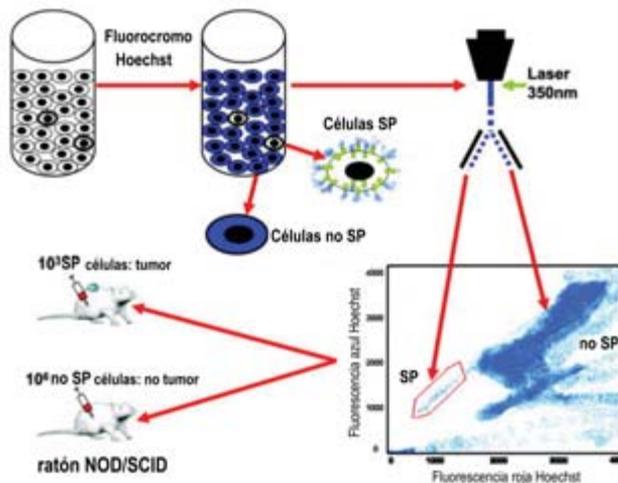


Figura 5. **Protocolo experimental para detectar las células SP.** Las células se tratan con el fluorocromo Hoechst 33342 y se separan por citometría de flujo; aquella proporción pequeña de células que es capaz de repeler el fluorocromo presenta un perfil de fluorescencia diferente debido a su baja incorporación del fluorocromo. Esta es la fracción SP. Esta propiedad se basa, en parte a su elevada expresión de ABCB1 (MDR1). El trasplante subcutáneo de 10^3 células SP originó tumores, mientras que el trasplante de 10^6 de células no SP no tuvo capacidad de generar tumores (Forbes y Alison, 2006, modificado).

fracción SP y cuando estas células aisladas de ratón se trasplantaron en ratones con la médula ósea destruida por irradiación, un pequeño número de ellas fue capaz de reconstituir dicha médula, demostrando así su capacidad pluripotente. Las células SP pueden aislarse de muchos tejidos: cerebro, mama, pulmón, corazón, páncreas, testículos, piel e hígado, y representan células madre específicas de linaje. La tinción con Hoechst-33342 de células de médula ósea obtenidas a partir de ratones carentes de ABCG2 no detectó células SP, no porque las SP estuvieran ausentes, sino porque no expresaban ABCG2, lo que permitió que todas acumularan el fluorocromo Hoechst y emitieran fluorescencia.

Una vez demostrado que las células madre se encuentran de manera predominante en la fracción SP, es posible seleccionarlas y purificarlas a partir de poblaciones de células o tejidos. Se identificaron células SP en 15 de 23 muestras de neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón y líneas celulares de glioblastoma. Además, el análisis de varias líneas celulares que habían sido mantenidas en cultivo durante largos períodos de tiempo, demostró la existencia de una pequeña población de células SP. En la línea celular C6 de glioma de rata, se separó una población SP de una población no SP. Mediante el uso de factores de crecimiento, se han mantenido estas células en cultivo y se ha demostrado que sólo las células SP generaron ambas poblaciones y produjeron células con marcadores tanto neuronales como gliales que fueron tumorigénicos en ratón. Esto ha proporcionado clara evidencia de que en esta línea celular la población SP refleja una población con capacidad de autorenovación y maduración (diferenciación) limitada. Sin embargo, este procedimiento de aislamiento es imperfecto ya que el compartimento SP está compuesto de células madre y células sin esta característica y algunas células madre no se encuentran en la fracción SP. Por ejemplo, algunas células no madre a menudo expresan los genes *abcg2* y *abcb1* y en estudios histopatológicos en tumores diferenciados, se han descrito expresiones elevadas del transportador ABCB1. Además, en un rango de líneas celulares, los agentes diferenciadores inducen la expresión de ABCB1, inhiben el crecimiento celular e incrementan la expresión de marcadores de la maduración

Existen otras limitaciones cuando se usan líneas celulares tumorales cultivadas *in vitro* para estudiar la biología de las células madre y la resistencia a fármacos. Aunque las células SP y las células con propiedades de células madre se han descrito en líneas celulares cultivadas, es difícil reconciliar que sólo una pequeña fracción de células posee características de células madre con tiempo rápido de división en cultivo. Puede ser que un pequeño compartimento de células madre con capacidad de auto-renovación perpetua, pero quiescentes, exista junto a otro compartimento más grande con células proliferativas que tienen una capacidad finita de proliferar antes de sufrir una posible parada en la división celular o la muerte por apoptosis. Estos paradigmas pueden explicar la baja eficiencia de la mayoría de líneas celulares para formar clones, su ineficiencia para formar colonias en agar y su limitada tumorigenicidad. Sin embargo, ninguno de estos modelos puede explicar como las células madre permanecen siendo una fracción constante de la población total.

Cualquier propuesta requiere que las células madre se dividan lentamente y se ha de reconocer que en una línea celular derivada de un tumor sólido el número de células que sufre apoptosis es relativamente pequeño. Una posibilidad es que exista un intercambio de células entre un compartimento proliferativo y el reservorio de células madre. Es probable que tal intercambio ocurra, ya que la línea celular se origina a partir de una célula madre con una ventaja proliferativa.

6.2. Resistencia a fármacos en células cancerosas

Las células cancerosas pueden adquirir resistencia a la quimioterapia por una serie de mecanismos, tales como la mutación o la sobreexpresión del gen que codifica la proteína transportadora, inactivación del fármaco o eliminación del fármaco por la célula. De hecho, los tumores recurrentes, después de una respuesta inicial a la quimioterapia, son multiresistentes a fármacos. En el aspecto convencional de la resistencia a fármacos, una de las diversas clases de células en la población tumoral adquiere cambios genéticos que confieren resistencia (Figura 6A). Estas células poseen una ventaja selectiva que les permite sobrevivir a la población de células tumorales después de la quimioterapia. En base al concepto de células madre tumorales, un modelo alternativo plantea que las células madre cancerosas son naturalmente resistentes a la quimioterapia mediante su quiescencia, capacidad de reparar su DNA y la expresión de transportadores ABC (Figura 6B). Como resultado, al menos alguna de las células madre tumorales puede sobrevivir a la quimioterapia y sostener el crecimiento del tumor. En un tercer modelo de resistencia adquirida, las variantes multiresistentes de la célula madre tumoral, o de su descendencia, producen una población de células tumorales resistentes, que pueden ser detectadas en muchos pacientes que muestran recurrencia de sus tumores después de la quimioterapia (Figura 6C). Los mismos mecanismos que permiten a las células madre acumular mutaciones con el tiempo, que producen las mismas consecuencias a largo plazo que la irradiación o los carcinógenos, permitirían a las células madre tumorales acumular mutaciones que confieren resistencia a fármacos a sus descendientes desarrollados anormalmente. Como ejemplo, las alteraciones genéticas, tales como aquéllas que activan la expresión del transportador ABCB1 en células de leucemia y linfoma humanos, se pueden haber originado en la célula madre. En un modelo de resistencia intrínseca las células madre y las células variables diferenciadas son inherentemente resistentes, por lo cual, la terapia tiene poco o ningún efecto (Figura 6D). Un ejemplo de esto último es un cáncer intrínsecamente resistente, como es el cáncer de células renales en el cual ABCB1 se expresa en todas las células y contribuye a la tolerancia a la quimioterapia. En este caso, el fenotipo de resistencia de las células madre tumorales persiste en los progenitores comprometidos que se desarrollan anormalmente, que constituyen el reservorio proliferativo de las células cancerosas.

De esta manera, en el modelo de resistencia a fármacos de células madre cancerosas, los tumores han incorporado una población de células pluripotentes resistentes a fármacos, que puede sobrevivir a la quimioterapia y crecer de nuevo. Otra vez puede encontrarse un paralelismo entre las células madre normales en la recuperación conducida por las células madre de los tejidos normales después de la quimioterapia. La rápida reincidencia observada en algunos tumores después de un ciclo de quimioterapia tiene un paralelo en el tejido normal en la repoblación de la médula ósea por células madre hematopoyéticas normales y la recuperación de la mucosa del tracto gastrointestinal, ambas suceden dentro de las tres semanas del ciclo quimioterapéutico. De igual manera, recurrencias tumorales que ocurren meses o años después de la respuesta a la quimioterapia pueden ser comparadas con la recuperación más lenta que se observa en los folículos pilosos.

La hipótesis que propone que las propiedades intrínsecas de las células madre por sí solas proporcionan la base de la resistencia a fármacos, aunque atractiva desde el punto de vista terapéutico, puede resultar demasiado simple. Estudios recientes de

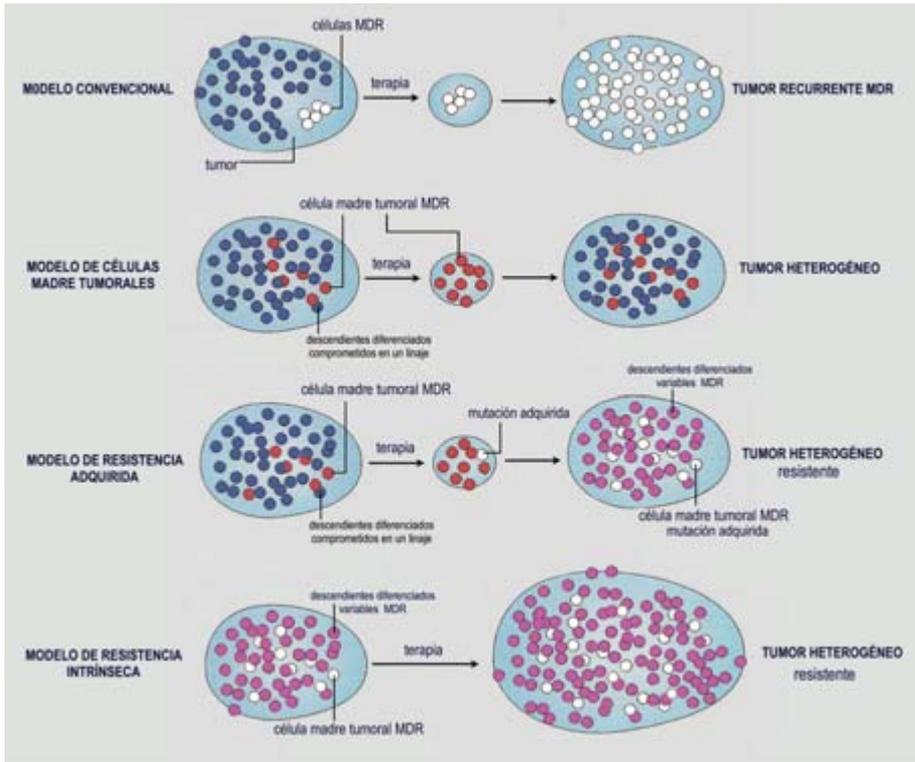


Figura 6. **Modelos de multiresistencia a fármacos de los tumores.** (A) En el modelo **convencional** de resistencia a fármacos de la célula tumoral, pocas células con alteraciones genéticas que otorgan la multi-resistencia a fármacos (MDR) forman un clon resistente a fármacos (círculos blancos). Después de la quimioterapia, estas células resistentes sobreviven y proliferan, formando un tumor recurrente que está compuesto de descendientes del clon resistente a fármacos. (B) En el modelo de **células madre tumorales**, la resistencia a fármacos está mediada por esas células madre (círculos rojos). En este modelo los tumores contienen una pequeña población de células madre tumorales (círculos rojos) y sus descendientes diferenciados, que están comprometidos en un linaje particular (círculos azules). Después de la quimioterapia, las células comprometidas mueren, pero las células madre tumorales, que expresan transportadores de fármacos, sobreviven. Estas células repueblan el tumor, dando lugar a un tumor heterogéneo compuesto de células madre tumorales y descendientes comprometidos pero diferenciados de manera variable. (C) En el modelo de células madre de **resistencia adquirida**, las células madre tumorales (círculos rojos), que expresan transportadores de fármacos, sobreviven a la terapia, mientras que las diferenciadas comprometidas pero diferenciadas variables mueren. Las mutaciones en las células madre tumorales supervivientes (círculos blancos) y sus descendientes (círculos rosa) pueden surgir, por mecanismos tales como mutaciones puntuales, activación o amplificación génica, que les confiere un fenotipo resistente a fármacos. Como en el modelo (A), las células madre con mutaciones adquiridas pueden estar presentes en la población antes de la terapia. (D) En el modelo de **resistencia intrínseca**, tanto las células madre (círculos blancos) como las diferenciadas variables (rosa) son inherentemente resistentes a fármacos, así que las terapias tendrán poco o ningún efecto, dando como resultado el crecimiento tumoral (Dean, Fojo y Bates, 2005, modificado).

resistencia a imatinib (Glivec), en pacientes con leucemia, proporcionan un ejemplo de cómo el eflujo mediado por el transportador ABC en células madre puede facilitar, pero no ser el único responsable de la adquisición de mecanismos de resistencia a fármacos. Se ha demostrado recientemente que el imatinib es a la vez sustrato e

inhibidor de ABCG2, haciéndose susceptible a su propio eflujo en una célula madre que expresa este transportador. Los estudios iniciales que identifican las células leucémicas resistentes al imatinib, describen mutaciones adquiridas en el dominio quinasa de ABL en pacientes con CML o con leucemia linfoblástica aguda asociada con t(9;22)(q34;q11). Estos descubrimientos indican que la expresión de transportadores de fármacos por la célula madre tumoral puede proporcionar algún nivel de resistencia a fármacos, pero una mutación adquirida en ABL, puede conferir aún niveles mas elevados de esa resistencia.

Estas mutaciones pueden haber surgido durante la terapia, pero no se ha excluido su existencia previa a la administración del imatinib, ya que mutaciones anteriores que confieren resistencia a imatinib se han descrito también en un subgrupo de pacientes. Estos hallazgos son reminiscentes de la hipótesis de Goldie-Coldmans, quien propuso hace más de veinte años, que un pequeño porcentaje de células, en una población que esconde mutaciones intrínsecas, confiere resistencia a fármacos. La hipótesis de Goldie-Coldman teorizaría que la célula que adquiere la mutación es la célula madre.

La expresión de transportadores ABC puede volver a las células madre resistentes a los fármacos, pero éste no es el único determinante de resistencia, ya que la capacidad de reparación del DNA de la célula y la renuencia a entrar en apoptosis pueden ser iguales o más importantes. Las células madre, como células no proliferativas, cabría esperar que fueran inherentemente refractarias a fármacos que se dirigen al ciclo celular en células en rápida división. Considerando que la quiescencia es un mecanismo importante de resistencia en células madre, han de desarrollarse agentes que sean efectivos en células no proliferativas. Por ejemplo, estudios con imatinib han mostrado que el bloqueo de células positivas BCR-ABL en el tránsito G1/S *in vitro* no tuvo impacto significativo sobre la capacidad del imatinib de inducir la apoptosis, lo que indica que el imatinib es efectivo sobre células no proliferantes.

6.3. Superando la resistencia a fármacos

Considerando lo anteriormente expuesto, se piensa que si se inhiben los transportadores principales de los fármacos quimioterapéuticos, se podría evitar la resistencia a fármacos y así eliminar el tumor. Es mucho el esfuerzo dedicado a encontrar inhibidores de los transportadores ABC. La primera generación de compuestos incluye agentes identificados como inhibidores ABCB1, tales como el verapamilo y la ciclosporina, que se utilizan en clínica para otros padecimientos. Estos inhibidores se combinaron con una serie de regímenes quimioterapéuticos para muchos cánceres. Como el resultado no era convincente, se intentaron posteriores pruebas clínicas con una segunda generación de inhibidores, tales como PSC 833 y VX-710. El resultado de estas pruebas fue completamente negativo, fracasando en algunos casos debido a la interacción farmacocinética entre el agente quimioterapéutico y el inhibidor ABCB1. Estos estudios pueden haber fracasado debido a la presencia de transportadores adicionales, tales como ABCC1 y ABCG2, que no resultaron dianas del inhibidor. A pesar de estos fracasos, estudios correlativos muestran que el transporte por ABCB1 puede ser inhibido. Evaluando la actividad de eflujo con el radionuclido de imagen ^{99m}Tc-Sestamibi, se ha confirmado que algunos tumores humanos tienen actividad ABCB1 que puede ser suprimida con VX 710, PSC 833 y tariquidar (XR9576). El

incremento en la retención de ^{99m}Tc -Sestamibi en el tumor completo después del tratamiento con tariquidar, indica que el fenotipo que expresa el transportador de las células madre tumorales, persiste en los progenitores comprometidos desarrollados anormalmente que comprenden el reservorio proliferativo de las células cancerosas.

Dado que las células madre tumorales expresan transportadores de fármacos que las hacen resistentes a muchos agentes quimioterapéuticos, las estrategias frente al cáncer han de incluir esfuerzos que tengan como objetivo estas células considerando sus propiedades especiales. Los estudios clínicos han intentado superar la resistencia a fármacos mediante terapias combinatorias en las cuales un fármaco citotóxico se administra a la vez que un inhibidor del transportador ABC. En un nuevo paradigma, los inhibidores del transporte deben ser considerados como «agentes sensibilizadores de las células madre tumorales» que han de permitir que sean destruidas las células más resistentes a los fármacos. Los escépticos pueden argumentar que los inhibidores de ABCB1 han mostrado muy poca efectividad en las pruebas clínicas. Sin embargo, se puede replicar que las pruebas clínicas con estos inhibidores no se han dirigido a las células madre cancerosas. Más bien se ha determinado la tasa de respuesta evaluando la reducción en tamaño de los tumores que expresan un transportador de fármacos particular, generalmente el ABCB1. Si las células madre son los principales mediadores de la resistencia a fármacos, los inhibidores de ABC no reducirán la carga tumoral inmediatamente, sino que su eficacia debe ser observada en puntos finales alternativos, tales como frecuencia o tiempo de recaída. Un escéptico también explicaría que estos efectos seguramente han sido ya descritos en pruebas clínicas realizadas tiempo atrás y los inhibidores de ABCB1 no han destruido las células madre cancerosas. Sin embargo, es posible que el fármaco citotóxico o el inhibidor de ABC probado fuera ineficiente en su misión de destruir las células madre tumorales. Un inhibidor del transporte de fármacos ha de resultar más beneficioso cuando esté combinado con un agente anticáncer que tenga como objetivo a las células madre, tal como el imatinib, cuyo objetivo son las células madre leucémicas que acarrean la proteína de fusión BCR-ABL.

Otra razón potencial es que las pruebas clínicas que implican a inhibidores del transporte de fármacos no han tenido éxito y fue un transportador erróneo el inhibido. La mayoría de los estudios que evalúan células con fenotipo SP han demostrado que las células madre sobreexpresan ABCG2, en vez de ABCB1, que ha sido el transportador objetivo en la mayoría de estudios clínicos. Para evaluar apropiadamente la última posibilidad, es importante encontrar un inhibidor específico para ABCG2. El compuesto fumitremorgina C (FTC) es un producto natural que inhibe específicamente ABCG2. Sin embargo, este compuesto es tóxico para las células y para el ratón, por lo que no es apropiado para ser utilizado en clínica. Se han obtenido derivados sintetizados por procedimientos químicos del FTC, tal como el Ko143 y algunos de ellos han mostrado elevada especificidad y toxicidad baja. En ratón, estos compuestos sensibilizan a las células tumorales del ratón a los fármacos. Estudios con Ko143 han observado también que la inhibición del ABCG2 permite mayor absorción de ciertos fármacos a través del intestino. Además, el compuesto GF120918 es un inhibidor de ABCB1 que también inhibe ABCG2 *in vitro* y aparentemente *in vivo*.

Se requiere la identificación de inhibidores potentes, específicos y no tóxicos de ABCB1, ABCG2 y ABCC1, antes de que se determinen los efectos totales de bloqueo de estos transportadores. No obstante, esto ha de ser difícil de conseguir, *in vivo*, sin

la destrucción de las células madre normales —especialmente de las hematopoyéticas— que dependen de la expresión de los transportadores de fármacos para sobrevivir a la terapia. La repoblación de los tejidos llevada a cabo por las células madre no sólo media el crecimiento de los tumores, sino que también media el crecimiento de los tejidos normales en el adulto, incluyendo la médula ósea el tracto gastrointestinal y los folículos pilosos. La existencia de una *ventana terapéutica* que permita la destrucción de las células madre cancerosas, pero no las normales, es algo que permanece aún sin determinar.

7. OPORTUNIDADES TERAPÉUTICAS

No se puede negar el atractivo que tiene el problema de la resistencia a la quimioterapia en términos de existencia de una población de células madre relativamente quiescente armada con múltiples transportadores de fármacos. Pero, ¿cómo encaja este modelo en el contexto del problema clínico de la resistencia a la quimioterapia? Desgraciadamente, para la mayoría de los cánceres resistentes a los fármacos, incluyendo los cánceres de riñón, páncreas y colon, el problema no es que unas pocas células sobrevivan, sino más bien que sólo unas pocas células mueran en respuesta a la quimioterapia.

Existen hoy en día sobrados medios para conseguir que muchas de estas preguntas tengan respuesta, ya que por el momento se cuenta con excelentes métodos para aislar y crecer células madre. Los análisis iniciales de expresión génica en estas células revelan que son muchos los genes que están sobreexpresados o subexpresados. El aislamiento de las células madre a partir de diferentes tipos de tumores ha de permitir la determinación de la similitud o las diferencias de los perfiles moleculares entre las diferentes células madre. Esto puede conducir a la mejora de los medios de diagnóstico para detectar lesiones premalignas y tumores, como también terapias dirigidas (anticuerpos) hacia a las células madre tumorales.

Se han generado ratones deficientes en los genes *abcb1-*, *abcg2-* y *abcc1-*, y todos fueron viables. Si los transportadores codificados por estos genes fuesen necesarios para la protección de las células madre, los ratones que carecen de estos genes tendrían mayor susceptibilidad a la tumorigenesis producida por ciertos agentes químicos mutagénicos. Tales estudios pueden llevar al desarrollo de nuevos modelos de cáncer. Para valorar mejor el papel de los transportadores ABCG2 y ABCB1 en la quimioterapia, es posible estudiar los tumores que se desarrollan en ratones que carecen de los genes que codifican estos transportadores. Esto permitirá el aislamiento de células madre cancerosas carentes de estos transportadores y la prueba directa de la capacidad de fármacos actuales y futuros para destruirlas.

Inhibidores ABCG2. La administración de inhibidores de ABCG2, anterior o durante la quimioterapia, puede ayudar a eliminar las células madre tumorales. Dos compuestos: GF120918 y tariquidar, que inhiben a ABCG2 y ABCB1 se han aprobado ya para estudios clínicos. Otros inhibidores de ABCG2 se encuentran en pleno desarrollo.

Anticuerpos ABCG2. Anticuerpos frente a ABCG2 o frente a otros marcadores celulares han de ser útiles para destruir las células madre tumorales y pueden ser utilizados también en los diagnósticos para detectar tumores, visualizar metástasis o controlar la respuesta a la terapia.

Inhibidores de células madre. La renovación y supervivencia de las células madre requiere mecanismos de señalización por un amplio rango de moléculas a través de sus receptores específicos de membrana. Un inhibidor potencial de las células madre es la ciclopamina, compuesto que inhibe la señalización promovida por el ligando Hedgehog al unirse a los receptores «Patched» y «Smoothed». La inhibición de tales receptores y moléculas señalizadoras puede inhibir de manera preferente a las células madre tumorales.

Inmunoterapia. Varios protocolos clínicos utilizan la activación de las células inmunes del paciente frente a sus propias células cancerosas, o el trasplante de células madre de la médula ósea de un donante para destruir sus células tumorales. Las células madre tumorales de un paciente pueden ser irradiadas letalmente y utilizadas para inmunizar a otro paciente o para activar las células inmunes del propio donante frente a las células madre tumorales.

8. ABREVIATURAS

ABC, *ATP binding cassette*; ABCA2, proteína codificada por el gen *abca2*; ABL, proteína quinasa codificada por el gen *abl*, (Abelson); BCR, proteína codificada por *bcl*, el gen de región de fractura (*Breakpoint Cluster Region*); *bcr-abl*, gen de fusión en el cromosoma Filadelfia que aparece en la leucemia mieloide crónica; BCRP, proteína de resistencia en cáncer de mama; CML, leucemia mielógena crónica; MDR, multiresistencia a fármacos (*multi-drug resistance*); MRP, proteína asociada a la multiresistencia a fármacos; PGP/MDR1, P-glicoproteína; PcG, proteínas Polycomb que reprimen reversiblemente los genes de diferenciación PRC2, *polycomb repressive complexes*; SP, población lateral (*side population*).

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Al-Haij, M.; Becker, M. W.; Wicha, M.; Weissman, I., y Clarke, M. F. (2004): «Therapeutic implications of cancer stem cells». *Curr Opin Genet Dev* 14, 43-47.
2. Andrews, P. W. (2002): «From teratocarcinomas to embryonic stem cells». *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 405-417.
3. Asakura, A., y Rudnicki, M. A. (2002): «Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation». *Exp Hematol* 30, 1339-1345.
4. Bapat, S. A. (2007): «Evolution of cancer stem cells». *Seminars in Cancer Biol* 17, 204-213.
5. Boticario, C., y Cascales, M. (2008): «Células madre tumorales», en *Innovaciones en cáncer*, págs. 185-214. UNED. Madrid.
6. Calabrese, C.; Poppleton, H.; Kocak, M., y Hogg, T. L., *et al.* (2007): «A perivascular niche for brain tumor stem cells». *Cancer Cell* 11, 68-82.
7. Dean, M.; Fojo, T. y Bates, S. (2005): «Tumor stem cells and drug resistance». *Nature Rev Cancer* 5, 275-284.
8. Dick, J. E. (1996): «Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice». *Semin Immunol* 8, 197-206.
9. Forbes, S. J., y Alison, M. R. (2006): «Side population (SP) cells: Taking center stage in regeneration and liver cancer?» *Hepatology* 44, 23-26.

10. Gottesman, M. M.; Fojo, T., y Bates, S. E. (2002): «Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters». *Nature Rev Cancer* 2, 48-58.
11. Hope, K. J.; Jin, L., y Dick, J. E. (2004): «Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity». *Nature Immunol* 5, 738-743.
12. Houghton, P. J.; Germain, G. S.; Harwood, F. C., y Schuelz, D. L. *et al.* (2004): «Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 *in vitro*». *Cancer Res* 64, 2333-2337.
13. Houghton, J.; Morozov, A.; Smirnova, I., y Wang, T. C. (2007): «Stem cell and cancer». *Seminars in Cancer Biol* 17, 191-203.
14. Kucia, M., y Ratajzak, M. Z. (2006): «Stem cells as a two edge sword- from regeneration to tumor formation». *J Physiol Pharmacol* 57, 5-16.
15. Mintz, B., y Illmensee, K. (1975): «Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells». *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3585-3589.
16. Morrison, S. J., y Spradling, A. C. (2008): «Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life». *Cell* 132, 598-611.
17. Nowell, P. C. (1976): «The clonal evolution of tumor cell populations». *Science* 194, 33-28.
18. Ramírez-Castillejo, C.; Sánchez-Sánchez, F., y Andreu-Agullo, C., *et al.* (2006): «Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal». *Nat Neurosci* 9, 331-339.
19. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M., y Weissman, I. L. (2001): «Stem cells, cancer and cancer stem cells». *Nature* 414, 105-111.
20. Romano, G. (2005): «The role of adult stem cells in carcinogenesis». *Drug News Perspect* 18, 555-559.
21. Sato, N.; Leopold, P. L., y Crystal, R. G. (2001): «Effect of adenovirus-mediated expression of sonic hedgehog gene on hair regrowth in mice with chemotherapy-induced alopecia». *J Natl Cancer Inst* 93, 1858-1854 S.
22. Shen, Q.; Goderie, S. K.; Jin, L., *et al.* (2004): «Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells». *Science* 304, 1338-1340.
23. Scadden, D. T. (2004): «Cancer stem cells refined». *Nature Immunol* 5, 701-703.
24. Sell, S. (2004): «Stem cell origin of cancer and differentiation therapy». *Crit. Rev. Oncol Hematol* 51, 1-28.
25. Soltysova, A.; Altarenova, V., y Altaner, C. (2005): «Cancer stem cells». *Neoplasma* 52, 435-440.
26. Vak-Lingbeek, M. E.; Bruggeman, S. W. M., y van Louizen, M. (2004): «Stem cell and cancer, the polycomb connection». *Cell* 118, 409-418.
27. Weissman, I. L.; Anderson, D. J., y Gage, F. (2001): «Stem and progenitor cells. Origins, phenotypes, lineage commitments and transdifferentiation». *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 387-403.
28. Vermeulen, L.; Sprick, M. R.; Kemper, K.; Stassi, G., y Medema, J. P. (2008): «Cancer stem cells - old concepts, new insights». *Cell Death and Differ*, 1-12.
29. Widschwerdter, M., *et al.* (2007): «Epigenetic stem cell signature in cancer». *Nature Genet* 39, 157-158.
30. Yang, Z.-J., y Wechsler-Reya, R. T. (2007): «Hit Em Where they live: targeting the cancer stem cells niche». *Cancer Cell* 11, 3-5.
31. Zhou, S.; Schuetz, J. D.; Bunting, K. D., y Colapietro, A. M. (2001): «The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype». *Nature Med* 7, 1028-1034.