

***Células Madre Tumoraes:
Identificación de nuevas
estrategias terapéuticas en el
cáncer***

***Cancer Stem Cells:
Identification of new therapeutic
strategies in cancer***

Tania Borrajo Rodríguez

Curso académico 2016-2017

ÍNDICE:

Abreviaturas:.....	2
Resumen:.....	3
Palabras clave:.....	3
Abstract:.....	3
Key words:.....	3
Introducción:.....	4
Objetivos:.....	5
1. Células madre tumorales y sus características:.....	6
1.1 Propiedades generales:.....	6
1.2 Relación entre células madre tumorales y células madre tisulares:.....	6
1.3 Diferencia entre células madre tumorales y células iniciadoras de tumor:.....	6
1.4 Perfil metabólico de las células madre tumorales.....	7
1.5 Relación entre las células madre tumorales y su nicho.....	9
2. Heterogeneidad tumoral:.....	11
2.1 Modelos de carcinogénesis:.....	11
2.2 Crecimiento tumoral:.....	13
2.3 Concepto de plasticidad:.....	14
3. Identificación y caracterización de células madre tumorales:.....	15
4. Problemática terapéutica:.....	19
4.1 Resistencia a terapias convencionales:.....	19
4.2 Recurrencia:.....	20
4.3 Metástasis:.....	21
5. Estrategias terapéuticas:.....	22
5.1 Modulación de la quiescencia celular:.....	22
5.2 Inhibición de transportadores ABC:.....	23
5.3 Inhibición de las vías de señalización:.....	24
5.4 Inmunoterapia:.....	26
5.5 Anticuerpos frente a marcadores CSC:.....	27
5.6 Modulación del nicho CSC.....	28
5.7 Nanomedicina.....	29
6. Conclusión:.....	34
7. Bibliografía:.....	35
Agradecimientos:.....	37

ABREVIATURAS:

ABC	Adenosine triphosphate-Binding Cassette
ALDH	Aldehido deshidrogenasa
ATP	Adenosín trifosfato
BAD	Bcl-2 Associated Death promotor
BsAb	Anticuerpo Biespecífico
CAFs	Fibroblastos Asociados a Cáncer
CIK	Cytokine-Induced Killer cells
CSC	Cancer Stem Cell
CTLs	Linfocitos T Citotóxicos
DLL4	Delta-Like 4 Ligand
EMT	Transición Epitelial-Mesenquimal
EpCAM	Molécula de Adhesión Celular Epitelial
HGF	Factor de Crecimiento de Hepatocitos
HIF	Factores Inducibles por Hipoxia
MDR1	Gen de Resistencia a Múltiples Fármacos
MDSCs	Células Supresoras Derivadas de Mieloide
MET	Transición Mesenquimal-Epitelial
MMPs	Metaloproteinasas de la Matriz
MSCs	Células Madre Mesenquimales
NF- κ B	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas
NKs	Natural Killer Cells
OCT-4	Octamer-binding transcription factor 4
PEDF	Factor Derivado del Epitelio Pigmentario
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
TAMs	Macrófagos Asociados a Cáncer
TANs	Neutrófilos Asociados a Cáncer
TGF- β	Factor de crecimiento Transformante β
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento Endotelial Vascular

RESUMEN:

El concepto de célula madre tumoral se ha relacionado, en los últimos años, con un aumento de la probabilidad de desarrollar resistencia a tratamientos antitumorales convencionales. A pesar de que este concepto no revela la ascendencia de células madre tisulares, sí define las principales propiedades que caracterizan a esta población celular, autorrenovación ilimitada y capacidad de diferenciación heterogénea. Estas propiedades, junto con el elevado potencial tumorigénico y la marcada plasticidad expresada por esta población tumoral, favorecen el desarrollo de tumores potencialmente agresivos y con capacidad metastásica. Por esta razón, la comprensión de los mecanismos que median las diferentes propiedades CSC ha sido esencial para el planteamiento de diferentes estrategias terapéuticas. En esta revisión se abordarán aquellas estrategias que actualmente se encuentran en desarrollo y que representan una promesa en la erradicación de células madre tumorales.

PALABRAS CLAVE: célula madre tumoral, resistencia, quiescencia, plasticidad, estrategias terapéuticas.

ABSTRACT:

In recent years, the concept of cancer stem cell has been related to an increased likelihood of developing resistance to conventional antitumor treatments. Although this concept does not reveal the ancestry of tissue stem cells, it defines the main properties that characterize this cell population, unlimited self-renewal and heterogeneous differentiation capacity. These properties, together with the high tumorigenic potential and the marked plasticity expressed by this tumor population, favor the development of potentially aggressive tumors with metastatic capacity. For this reason, the comprehension of the mechanisms that mediate the different CSC properties has been essential for the development of different therapeutic strategies. This review will address those strategies, currently under development, that represent a promise in the eradication of cancer stem cells.

KEY WORDS: cancer stem cell, resistance, quiescence, plasticity, therapeutic strategies.

INTRODUCCIÓN:

A pesar de los grandes avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, en los últimos años ha aumentado notablemente la prevalencia de dicha patología, considerándose causa primordial de morbilidad y mortalidad en casi todo el mundo. No obstante, no solo ha aumentado el diagnóstico primario de un tumor, sino también el número de pacientes que han desarrollado resistencia a tratamientos antitumorales convencionales y que, consecuentemente, experimentan una recaída tumoral. Son muchos los investigadores que atribuyen este fenómeno a la existencia de un pequeño grupo de células tumorales denominadas células madre tumorales [1].

El calificativo célula madre tumoral hace referencia a una pequeña población de células tumorales pluripotentes que presentan un comportamiento similar al de células madre normales en lo referente a su capacidad de diferenciación [2]. De hecho, la denominación célula madre tumoral surge como consecuencia de que estas células cumplen los criterios convencionales de una célula madre tisular: autorrenovación y capacidad de diferenciación heterogénea [3].

Recientes estudios han demostrado que las células madre tumorales juegan un papel importante en procesos como el desarrollo tumoral, la proliferación celular y la diseminación metastásica, pudiendo incluso mostrar un potencial tumorigénico superior al resto de células tumorales [2]. Por ello, la detección temprana de esta población tumoral resulta esencial tanto para el diagnóstico y pronóstico de un determinado tumor, como para una predicción fiable de la eficacia terapéutica [1].

En los últimos años, el proceso de detección y caracterización de células madre tumorales ha sido abordado por numerosos estudios clínicos que buscan desarrollar nuevas terapias eficaces en el tratamiento del cáncer. Estas terapias tendrán como objetivo eliminar células madre tumorales y desplazarán a tratamientos convencionales como la quimioterapia o la radioterapia, caracterizadas tanto por presentar una elevada toxicidad como por carecer de especificidad, favoreciendo por ello la resistencia al tratamiento y una posterior recidiva tumoral [1].

OBJETIVOS:

En primer lugar, a lo largo de este trabajo se realizará una revisión bibliográfica que permita comprender, además del concepto de célula madre tumoral, las diferentes propiedades que definen a esta población y la diferenciación de las células madre tisulares y del resto de células que componen la masa tumoral.

Se analizará además la trascendencia del concepto de célula madre tumoral dentro del ámbito del cáncer, así como la repercusión clínica de la existencia de este tipo celular.

Finalmente, como objetivo clave en esta revisión se expondrán las diferentes estrategias terapéuticas desarrolladas con el fin de combatir la existencia de dicha población y la problemática que ello representa, así como un estudio detallado de sus objetivos y principales limitaciones terapéuticas.

1. CÉLULAS MADRE TUMORALES Y SUS CARACTERÍSTICAS:

1.1 PROPIEDADES GENERALES:

Las células madre tumorales se caracterizan funcionalmente por su capacidad de proliferación y diferenciación, así como por sufrir autorrenovación ilimitada, lo que posibilita el desarrollo de pequeñas poblaciones celulares capaces de iniciar o propagar un tumor [4].

Otras propiedades que permiten la identificación de este tipo celular son su notable resistencia a tratamientos convencionales y su elevado potencial metastásico, lo que favorece la progresión tumoral y el desarrollo de recurrencia. También destacan la elevada densidad de bombas eflujo que facilitan la expulsión de fármacos antitumorales de las células y la expresión de marcadores celulares específicos que permiten su identificación fenotípica [5].

Además, tras el desarrollo de varios estudios se ha llegado a la conclusión de que las células madre tumorales residen en pequeños nichos que se encuentran dentro del medioambiente tumoral. Su función es proteger a las células de las diferentes condiciones adversas que puedan darse en el ambiente del tumor y favorecer el mantenimiento de todas las propiedades anteriormente mencionadas [1].

1.2 RELACIÓN ENTRE CÉLULAS MADRE TUMORALES Y CÉLULAS MADRE TISULARES:

Diversos estudios han puesto de manifiesto que una célula madre tumoral no tiene por qué proceder de una célula madre convencional, pues el sello de célula madre únicamente hace referencia a criterios funcionales, no revela la ascendencia de una célula determinada. Por ello, aunque en ciertos casos estas células puedan proceder de células madre tisulares, cualquier célula que cumpla con los criterios funcionales de una célula madre puede ser el origen de una verdadera "Cancer Stem Cell" [3].

Cabe destacar que las células madre tumorales no presentan todas las características de una célula madre normal. Por ejemplo, la mayoría de las células madre tisulares experimentan un desarrollo jerárquico, es decir, características como el inmunofenotipo o la frecuencia se transmiten de padres a progenitores. Sin embargo, estas propiedades no permanecen constantes en dichas células y por ello deben ser estudiadas para cada paciente [3].

1.3 DIFERENCIA ENTRE CÉLULAS MADRE TUMORALES Y CÉLULAS INICIADORAS DE TUMOR:

Actualmente se encuentra en auge el debate de si las células madre tumorales pueden ser el origen de un tumor, o si por el contrario únicamente presentan la capacidad de metastatizar y perpetuar dicho tumor. Muchos investigadores se han posicionado sobre este tema y la mayoría afirma que una de las principales propiedades de las células madre tumorales es su capacidad de iniciar un tumor. Sin embargo, dos autores, Kiera Rycaj y Dean G., han publicado recientemente una revisión en la que sugieren la necesidad de

diferenciar estas células de aquellas que verdaderamente originan el tumor. Así, ambos investigadores diferencian dos tipos celulares y afirman que “una célula iniciadora de tumor es aquella célula que experimenta una mutación causante de cáncer, es decir, aquella que origina el tumor, mientras que una célula madre tumoral se encarga de mantener la propagación de dicho tumor” [6].

Asimismo, Kiera Rycaj y Dean G. explican de forma detallada dos ensayos que pueden llevarse a cabo a la hora de caracterizar estas células: un ensayo de trasplante de tumores y un ensayo de trazado de linaje. El primero identifica principalmente células madre tumorales ya que se centra en la evaluación de la autorrenovación y pluripotencia, mientras que el segundo se utiliza en mayor medida para determinar el potencial de una célula iniciadora de tumor.

Trasplante de tumores:

Este ensayo consiste en injertar poblaciones de células tumorales en ratones inmunocomprometidos; si se identifican células madre tumorales (células propagadoras del tumor) se preparan diluciones crecientes y se evalúa la frecuencia de este tipo celular mediante trasplante de dichas diluciones. En posteriores trasplantes en serie, estas células deben presentar un periodo de vida ilimitado siendo capaces por ello de mantener el tumor generación tras generación.

Trazado de linaje:

Para caracterizar el potencial de células iniciadoras de tumor, se marcan genéticamente células normales mediante el uso de moléculas fluorescentes y se introducen mutaciones en oncogenes y genes supresores del tumor. Si, consecuentemente, la célula sufre una transformación y da lugar a un tumor histológicamente similar al del paciente, ésta puede ser considerada la fuente principal de dicho tumor [6].

En resumen, como las células madre tumorales presentan la capacidad de regenerar un tumor, muchos autores continúan utilizando el término célula madre tumoral como sinónimo de célula iniciadora de tumor. No obstante, Kiera Rycaj y Dean G. exponen que no todas las células con capacidad de generar células diferenciadas dentro del ambiente tumoral tienen que ser capaces de iniciar un tumor, y presentan la necesidad de acotar el término célula iniciadora a aquellas que realmente a partir de una única célula sean capaces de originar una población tumoral.

1.4 PERFIL METABÓLICO DE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES:

Hoy en día existen grandes discrepancias en cuanto al metabolismo de las células madre tumorales, pues mientras varios expertos apoyan la idea de un perfil glucolítico, crecientes evidencias señalan a la respiración mitocondrial como principal fuente de energía en este tipo celular [7].

En condiciones idóneas, donde el aporte de oxígeno es el adecuado, las células recurren a la fosforilación oxidativa para obtener ATP (adenosín trifosfato), vía de mayor rentabilidad energética (cabe recordar que en la fosforilación oxidativa se obtienen 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa mientras que en la glucólisis una molécula de glucosa únicamente proporciona dos moléculas de ATP). Sin embargo, las células tumorales se caracterizan por presentar preferentemente un metabolismo glucolítico que, a concentraciones elevadas de glucosa, resulta más eficiente que la respiración mitocondrial.

Asimismo, las células madre somáticas presentan un potencial glucolítico mayor que las células diferenciadas, cuya principal fuente de ATP es la respiración mitocondrial. De hecho, numerosos estudios indican que el proceso de *stemness* (adquisición de las propiedades que caracterizan a una célula madre, autorrenovación y pluripotencia) es precedido por un cambio en el perfil metabólico celular. Además, varios estudios han demostrado que las células madre presentan una menor densidad y actividad mitocondrial que su descendencia, lo que resulta en una menor concentración de especies reactivas de oxígeno y, consecuentemente, en una mayor capacidad de autorrenovación [7].

La escasez de estudios sobre las características metabólicas de las células madre tumorales impide asegurar que estas células opten también preferentemente por un metabolismo glucolítico. No obstante, sí hay evidencias de que concentraciones elevadas de glucosa en el ambiente tumoral fomentan la adquisición de un fenotipo CSC (del inglés *Cancer Stem Cell*). Además, varios estudios han relacionado una reducida densidad mitocondrial con el desarrollo de metástasis.

En contraposición, varios expertos sugieren que la fuente principal de energía en las células madre tumorales es la respiración mitocondrial, coincidiendo únicamente en que estas células presentan mayores concentraciones de ATP que el resto de células tumorales. En este caso, el fenotipo CSC se relacionaría con una mayor densidad mitocondrial y, en consecuencia, con concentraciones elevadas de especies reactivas de oxígeno. No obstante, dichos niveles continuarían siendo menores en la población CSC, lo que unido a una mayor capacidad antioxidante de estas células, fomentaría significativamente su potencial tumorigénico.

Estas discrepancias pueden tener su origen en la capacidad de las células madre tumorales de adaptar su metabolismo en función del ambiente tumoral y su fenotipo, ya que por ejemplo no presenta los mismos requerimientos metabólicos una célula en estado quiescente que en estado proliferativo. Consecuentemente, para la erradicación de la población CSC sería necesario interrumpir tanto la vía glucolítica como la vía mitocondrial [7].

1.5 RELACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES Y SU NICHU:

La región donde residen las células madre tumorales dentro del medioambiente tumoral recibe el nombre de nicho. Éste está constituido por células que, mediante la secreción de diferentes factores, promueven la autorrenovación y plasticidad de las células madre tumorales, favoreciendo el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis [8]. A continuación se explica detalladamente cada uno de los componentes que forman el nicho CSC (véase Figura 1).

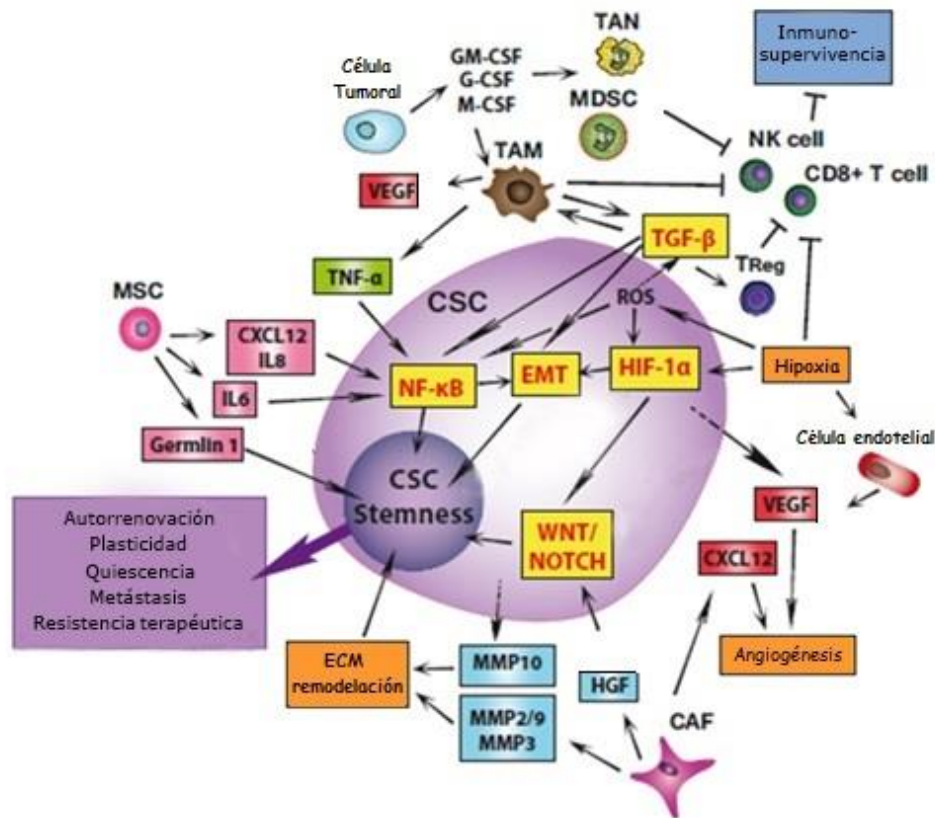


Figura 1. Esquema adaptado de Plaks V. et al. [8] donde se representa la compleja relación establecida entre las células madre tumorales y los diferentes componentes del nicho CSC.

1. Fibroblastos Asociados a Cáncer:

Diferentes factores secretados por células madre tumorales favorecen la conversión de fibroblastos normales a fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). A diferencia de los fibroblastos normales, los CAFs se caracterizan por la secreción de moléculas como la citoquina CXCL12 y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mediadores capaces de promover la angiogénesis. Además, también secretan el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor que estimula la stemness mediante la activación de las vías de señalización WNT y NOTCH.

2. Células Madre Mesenquimales:

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células estromales que intervienen en los procesos de proliferación, metástasis y angiogénesis, y favorecen un estado de inmunosupresión. Se caracterizan por la secreción de CXCL12, IL6 e IL8, que promueven el mantenimiento de las propiedades CSC mediante la regulación positiva del mecanismo NF- κ B (Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas).

La proteína morfogénica ósea es un factor de crecimiento que determina, junto con las vías de señalización Notch, Wnt y Hedgehog, el estado de diferenciación celular. Las células madre mesenquimales promueven la progresión tumoral al secretar el antagonista de la proteína morfogénica ósea Gremlin 1 y favorecer, por tanto, un estado de dediferenciación [8].

3. Células Inflamatorias:

Una de las principales características del nicho CSC es su capacidad de evadir la respuesta inmune. Mediante la inmunosupresión de NKs (del inglés Natural Killer cells) y linfocitos TCD8⁺, numerosas células inflamatorias contribuyen a la proliferación tumoral. Las células tumorales adyacentes a las células madre tumorales secretan factores estimulantes de colonias con el fin de movilizar macrófagos asociados a cáncer (TAMs), neutrófilos asociados a cáncer (TANs) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSCs). Estas células permiten una inmunosupresión eficaz al secretar mediadores como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), capaz de reclutar linfocitos T reguladores e inhibir su función.

Asimismo, por secreción del TGF- β y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), los macrófagos asociados a cáncer pueden estimular la transición epitelial-mesenquimal dependiente de las vías de señalización NF- κ B o TGF- β , y favorecer, consecuentemente, la invasión y migración de las células madre tumorales [8].

4. Hipoxia y Angiogénesis:

La hipoxia contribuye a la inmunosupresión provocada por las células inflamatorias al dificultar la proliferación y activación de linfocitos TCD8⁺. Asimismo, en condiciones hipóxicas aumentan los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de favorecer la progresión tumoral por estimulación de la vía TGF- β : el factor de crecimiento transformante- β induce un estado de dediferenciación celular que favorece en gran medida la supervivencia de las células madre tumorales.

Las condiciones hipóxicas también favorecen la angiogénesis tumoral al promover que las células madre tumorales (vía HIF-1 α) y las células endoteliales aumenten, marcadamente, la secreción de VEGF [8].

5. Matriz extracelular:

La matriz extracelular simula una barrera física que contribuye a mantener la integridad del nicho CSC y protege a las células madre tumorales de la acción de diferentes agentes quimioterápicos. En su interior alberga diversos mediadores celulares capaces de inducir los procesos de angiogénesis y metástasis. Su liberación es llevada a cabo durante el proceso de degradación y remodelación de la matriz por diferentes metaloproteinasas de la matriz (MMPs) producidas por células madre tumorales y fibroblastos asociados a cáncer [8].

2. HETEROGENEIDAD TUMORAL:

2.1 MODELOS DE CARCINOGENÉISIS:

En los últimos años se ha defendido que la heterogeneidad funcional y fenotípica característica de la mayoría de los tumores puede fomentar tanto el desarrollo tumoral como la resistencia terapéutica. Es importante tener en cuenta que dicha heterogeneidad puede ser potenciada por diversos factores, entre los que es posible destacar las mutaciones y alteraciones epigenéticas y las diferentes señales procedentes del ambiente tumoral [9].

Recientemente, con el fin de explicar el origen de la heterogeneidad tumoral, han surgido dos modelos de carcinogénesis, el modelo jerárquico y el modelo de evolución clonal [8]. A continuación, se presentan las bases de cada uno de ellos, haciendo hincapié, principalmente, en las células encargadas de formar el tumor.

1. Modelo jerárquico:

Como bien indica su nombre, este modelo se basa en una organización jerárquica celular y defiende que únicamente un pequeño grupo de las células que componen el tumor es el responsable de la heterogeneidad tumoral. Así, las células madre tumorales serían las responsables de la carcinogénesis, pues solo este tipo celular sería capaz de iniciar y promover un desarrollo tumoral agresivo [8]. No obstante, las células madre tumorales pueden presentar diferente origen, en función de lo que se diferencian dos vías tumorigénicas (véase Figura 2):

- Por un lado una célula madre somática puede sufrir una desregulación metabólica y convertirse en una célula madre tumoral, célula con capacidad de autorrenovación ilimitada y capaz de originar una población potencialmente tumorigénica.

- Por otro lado, linajes de células madre normales o células madre tumorales pueden adquirir propiedades CSC y favorecer, por tanto, el desarrollo de tumores potencialmente agresivos.

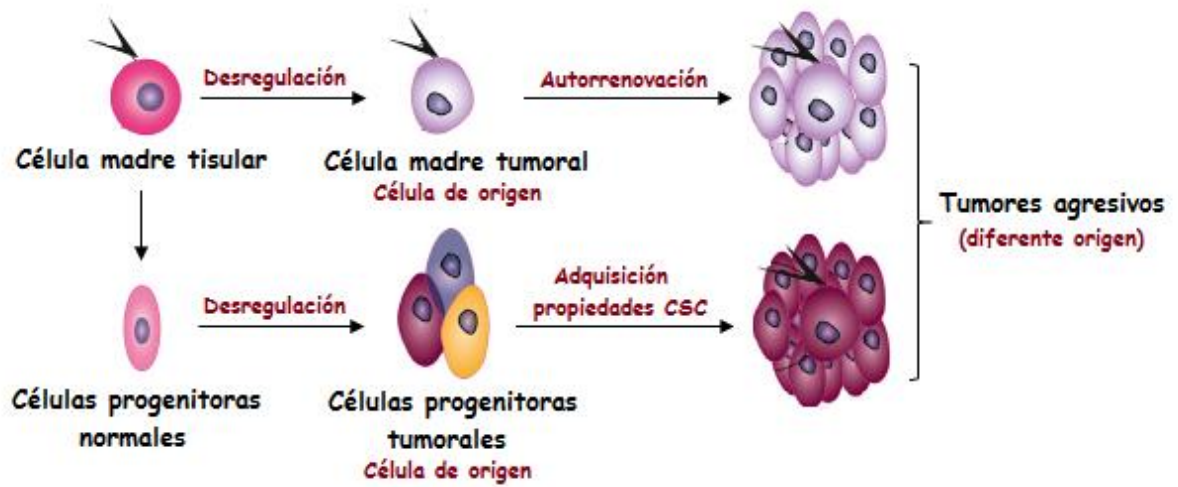


Figura 2. Representación del modelo jerárquico de carcinogénesis. Esquema adaptado de Plaks V. *et al.* [8]

Entonces, según este modelo y teniendo en cuenta el origen de ambas vías, sólo la erradicación de la población CSC podría proporcionar una regresión tumoral completa.

2. Modelo de evolución clonal:

A diferencia del modelo anterior, este modelo asume la carcinogénesis como resultado de la adquisición de diferentes mutaciones oncogénicas que promueven una evolución clonal (véase Figura 3).

Tras adquirir una mutación en los genes que regulan el ciclo celular, células epiteliales normales sufren un proceso de hiperproliferación. Este proceso favorece, tras el desarrollo de nuevas mutaciones oncogénicas, la obtención de clones tumorales capaces de originar tumores potencialmente agresivos. En este caso, cada una de las células que componen el tumor presentaría un potencial tumorigénico similar.

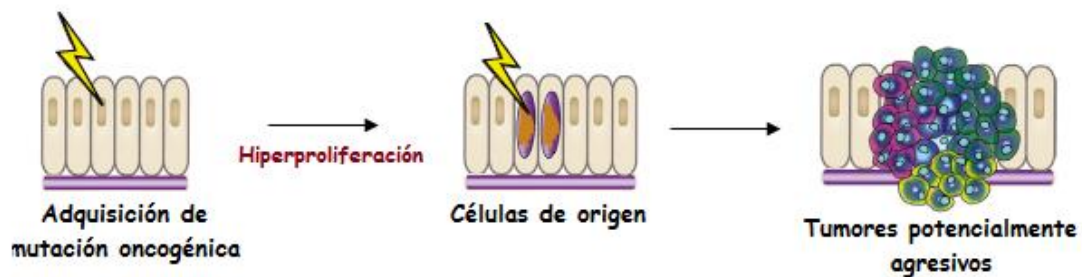


Figura 3. Representación del modelo de evolución clonal de carcinogénesis. Esquema adaptado de Plaks V. *et al.* [8]

Entonces, mientras que el modelo jerárquico considera como células de origen a las células madre tumorales, el modelo de evolución clonal asume que cualquier célula tumoral puede ser capaz de iniciar y sostener un proceso tumoral. No obstante, ambos modelos no son exclusivos y en la mayoría de los tumores coexisten los dos procesos. Es más, ciertas mutaciones pueden proporcionar propiedades CSC y por ello el concepto de plasticidad, explicado más adelante, puede ser el nexo de unión entre ambas teorías [8].

2.2 CRECIMIENTO TUMORAL:

En la Figura 4 se representan los diferentes modelos de desarrollo y diferenciación de células madre tumorales. Estos modelos explican las múltiples posibilidades de propagación tumoral y consecuentemente la elevada heterogeneidad observada [2].

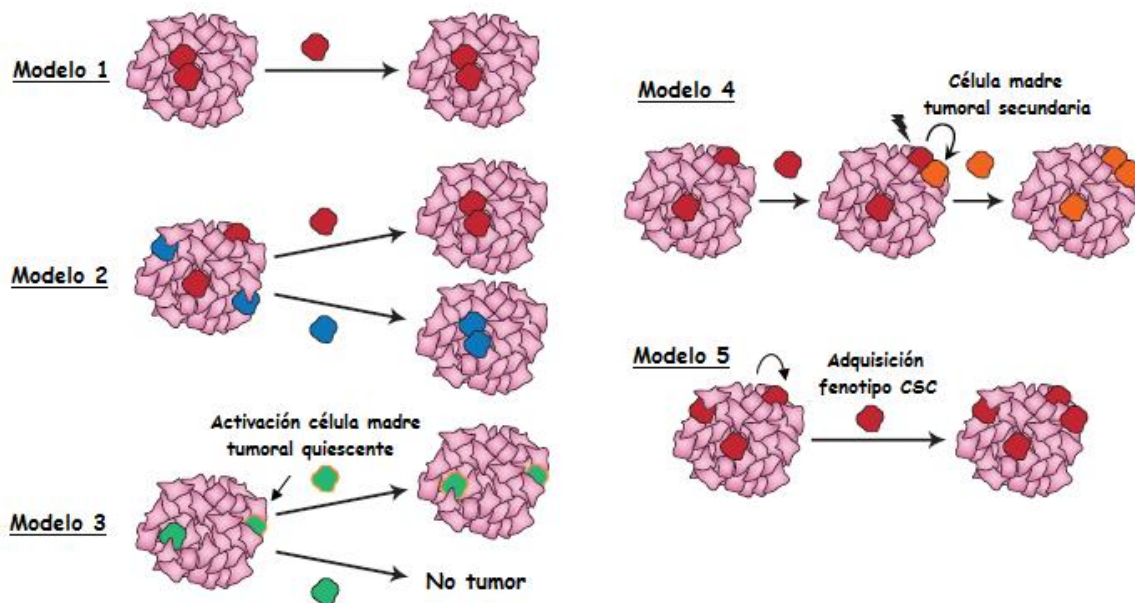


Figura 4. Posibles modelos de propagación tumoral. Esquema adaptado de Jenny C. Chang [2].

- Modelo 1: Una única célula madre tumoral puede diferenciarse y originar tumor.
- Modelo 2: Varias células madre tumorales pueden residir en el medioambiente tumoral y cada una de ellas dar lugar a tumores independientes.
- Modelo 3: La activación de células madre tumorales que se encuentren en estado latente puede promover la entrada de estas células al ciclo celular y originar una recaída tumoral.
- Modelo 4: La emergencia de una célula madre tumoral secundaria debido a una mutación o modificación epigenética puede suponer un desarrollo tumoral más rápido y agresivo.
- Modelo 5: Células tumorales normales pueden adquirir un fenotipo CSC en respuesta a diversas señales intrínsecas o medioambientales.

2.3 CONCEPTO DE PLASTICIDAD:

Durante un tiempo, la población CSC fue definida como una población única y estable, y la reciente heterogeneidad documentada ha llevado a muchos investigadores a replantearse la existencia de este tipo celular. No obstante, numerosos estudios han demostrado que esta heterogeneidad es fruto de la elevada plasticidad que presentan las células tumorales en su conjunto, representando un estado transitorio que puede ser inducido o disuadido por influencia de diversos factores [10, 1].

Uno de los principales factores que contribuyen a la plasticidad de la población CSC es la cambiante tumorigenicidad que presentan las células tumorales en función del grado de diferenciación. Así, resulta necesario aclarar que las células tumorales fenotípicamente diferenciadas poseen un potencial tumorigénico mucho mayor que aquellas que presentan un escaso nivel de diferenciación.

Entonces, para comprender a qué hace referencia el término plasticidad, resulta importante tener en cuenta dos principios básicos. En primer lugar, que las células madre tumorales son células con un bajo grado de diferenciación que mantienen en el tiempo la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, y, en segundo lugar, que una alteración en los mecanismos que median la diferenciación de células tumorales normales puede provocar su desdiferenciación y la consecuente adquisición de propiedades CSC [10].

En estadios tempranos de tumores en desarrollo o en aquellos ya clínicamente establecidos que no han sido tratados con terapias antitumorales, las células madre tumorales presentan la capacidad de proliferar y dar lugar espontáneamente a progenitores tumorales, los cuales, a su vez, pueden diferenciarse a distintos tipos celulares sin expresar propiedades CSC. Así, en este tipo de tumores, las células madre tumorales constituirían un pequeño grupo celular, habiendo una mayor densidad de células tumorales diferenciadas, caracterizadas funcionalmente por presentar una escasa o nula capacidad de regenerar el tumor. Cabe mencionar que, en los tumores que no han sufrido alteración alguna, la probabilidad de que células diferenciadas experimenten un proceso de desdiferenciación y den lugar a células madre tumorales es francamente baja.

Por otro lado, como bien se conoce, los tumores pueden escapar al control de los diferentes mecanismos que regulan la diferenciación celular y aumentar, en consecuencia, la plasticidad intrínseca de las células madre tumorales. Esta plasticidad intrínseca se traduce, en ocasiones, en un proceso de mimetismo molecular mediante el cual, células madre tumorales pueden transformarse en células funcionalmente similares a células endoteliales y restablecer, consecuentemente, el flujo sanguíneo tumoral [10].

Aunque claramente la diferenciación espontánea y la desregulación de los mecanismos de diferenciación pueden contribuir en gran medida a la plasticidad de las células madre tumorales, numerosos estudios han

puesto de manifiesto que aquellos procesos que más ampliamente median la plasticidad, tienen lugar, preferentemente, bajo condiciones inducidas. Entre estos procesos es posible destacar, por su elevada frecuencia, los diversos cambios que acompañan al desarrollo del tumor y el empleo de diferentes terapias antitumorales.

Durante la progresión tumoral, las condiciones hipóxicas, la acción de diversos tipos de células y mediadores celulares y la frecuente transición epitelial-mesenquimal, pueden promover la desdiferenciación de células tumorales y la consecuente adquisición de propiedades CSC [10].

La transición epitelial-mesenquimal (EMT) hace referencia a un proceso por el cual células epiteliales adquieren un fenotipo mesenquimal, fenotipo relacionado con una mayor resistencia a la apoptosis y una elevada capacidad de migración e invasión. La adquisición de estas propiedades es lo que se conoce como “stemness” y por ello cualquier fenómeno que promueva una EMT puede facilitar que células tumorales adquieran propiedades CSC (progresión tumoral, recurrencia, metástasis y resistencia terapéutica) [2]. En cuanto a la influencia de la hipoxia y los diferentes tipos celulares sobre la plasticidad de células madre tumorales, anteriormente se explicó con detenimiento el concepto de “nicho CSC” y su consecuente repercusión sobre el proceso de “stemness”.

Finalmente, numerosos estudios han demostrado que las terapias antitumorales actualmente utilizadas pueden aumentar la densidad de células madre tumorales al inducir el proceso de desdiferenciación en células tumorales normales y la consecuente adquisición de un fenotipo CSC [10].

La repercusión clínica de este fenómeno se basa en que si el comportamiento de la población CSC fuese estable, la erradicación de dicha población permitiría la destrucción completa de la masa tumoral, consiguiendo por ello una terapéutica eficaz. Sin embargo, la elevada plasticidad de las células madre tumorales ha dado lugar a un incremento en la resistencia terapéutica y al reclutamiento de células cada vez más tumorigénicas [3]. No obstante, crecientes evidencias muestran la posibilidad de combatir la heterogeneidad y plasticidad de la población CSC apuntando tanto a células madre tumorales como a aquellas células que presenten un elevado grado de diferenciación y que bajo determinadas condiciones puedan adquirir propiedades CSC [10].

3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE TUMORALES:

Con el fin de aislar e identificar células madre tumorales se llevan a cabo diferentes estudios basados en la determinación de las propiedades que caracterizan a esta población celular. Así, para una caracterización fenotípica, se determinan fundamentalmente marcadores de superficie celular mediante la técnica de citometría de flujo, lo que permite identificar células madre tumorales con gran fiabilidad. No obstante,

para una completa caracterización es necesario realizar ensayos funcionales como la identificación de la denominada “Side Population”, el ensayo de formación de esferas y el análisis de la actividad ALDH. Aun así, el ensayo funcional estándar para la caracterización de una población CSC es la xenotrasplante en ratones inmunocomprometidos.

Cada uno de estos ensayos presenta varias desventajas asociadas al desarrollo experimental, y por ello una combinación de varios métodos sería el proceso más fiable a la hora de identificar células madre tumorales [10].

Identificación de marcadores CSC:

El fenotipo CSC ha sido asociado a la expresión de diferentes marcadores de superficie, cuya frecuencia y combinación ha permitido el aislamiento de células madre tumorales en distintos tipos de tumores [10]. La primera evidencia de este fenómeno surgió durante el estudio de células de leucemia mieloide aguda, donde el fenotipo CD34⁺/CD38⁻ se correlacionó con la existencia de células propagadoras del tumor. Desde entonces, varios marcadores (véase Tabla 1) han sido identificados en diferentes tipos de neoplasias, permitiendo el aislamiento y caracterización de la correspondiente población tumoral. Entre estos marcadores es posible destacar, tanto por su frecuencia como relevancia, la glicoproteína transmembrana CD44, sobreexpresada en tumores de mama, cabeza y cuello, colon y próstata. Se trata de un receptor de la matriz extracelular que se ha relacionado con el desarrollo de metástasis y el aumento de la agresividad tumoral. Otros marcadores son identificados tanto en células madre tumorales como en sus análogos tisulares. Así, por ejemplo, el marcador CD133 es expresado tanto en células progenitoras neuronales como en cáncer de cerebro y diversos sarcomas [11].

Tabla 1. Marcadores CSC en diferentes tipos de tumores.

Fenotipo CSC	Tumor
CD34 ⁺ /CD38 ⁻	Leucemia Mieloide Aguda [2]
CD44 ⁺ /CD133 ⁺	Cáncer de colon [5]
CD44 ⁺ /CD133 ⁺	Cáncer de próstata [10]
CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} /ESA ⁺	Cáncer de mama [5]
EpCAM ⁺ CD13/CD45-CD90	Cáncer de hígado [12, 5]
CD20 ⁺	Melanoma [12]
CD117 ⁺ /CD90 ⁺ /EpCAM	Cáncer de pulmón [5]
CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺	Cáncer de páncreas [5]
CD44 ⁺	Cáncer de cabeza y cuello [5]
CD133 ⁺	Sarcomas [10]

No obstante, la expresión de estos marcadores no sigue un patrón específico sino que es altamente dependiente del grado de diferenciación y fenotipo celular. Consecuentemente, emerge una gran

heterogeneidad intratumoral, resultando necesario, además de realizar una caracterización fenotípica, llevar a cabo una validación funcional [11].

Identificación de genes CSC:

Antes de llevar a cabo una validación funcional, es posible completar la caracterización fenotípica mediante la identificación de diferentes genes y factores de transcripción asociados al proceso de stemness. Así, por ejemplo, el mantenimiento de la capacidad de diferenciación de células madre se ha relacionado con la expresión de las moléculas de señalización OCT-4 (del inglés *Octamer-binding Transcription factor 4*), Nanog y Sox2. No obstante, estos genes son expresados tanto en células madre tumorales como en su descendencia, estando por ello más relacionados probablemente con una transformación tumorigénica que con el proceso de stemness. Aun así, una expresión elevada de estos genes ha sido vinculada a la presencia de células madre tumorales en diferentes tipos de tumores, entre los que se encuentran los tumores de pulmón, próstata y ovario [11].

Análisis de “Side Population”:

La “Side Population” se define como una población de células desdiferenciadas capaces de expulsar el colorante Hoechst 33342 desde el interior celular al espacio extracelular [10, 13]. Se ha demostrado que estas células expresan marcadores CSC y su identificación puede llevarse a cabo mediante el empleo de un citómetro de flujo. Así, tras la exposición de un grupo de células a la fluorescencia del colorante Hoechst, aquellas que presenten la capacidad de expulsar dicho colorante podrán ser identificadas como una población negativa en el cuadrante izquierdo del análisis (véase Figura 5). Este fenómeno se relaciona con la presencia de bombas eflujo, y más concretamente con el transportador ABCG2 [14, 13].

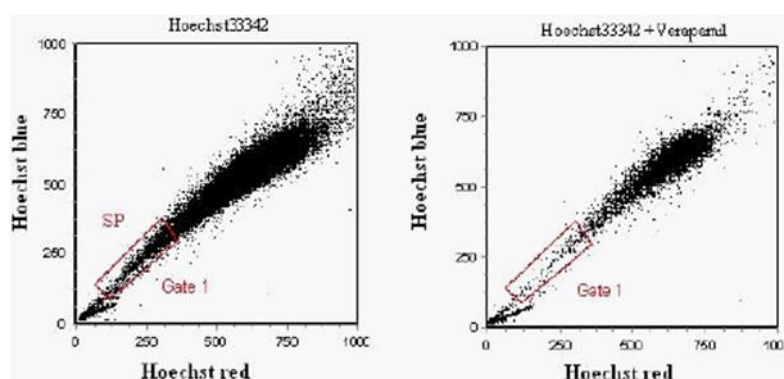


Figura 5. Análisis por citometría de flujo de la “Side Population”. Comparación entre la expulsión del colorante Hoechst 33342 por el transportador ABCG2 en condiciones normales y tras la administración del inhibidor de bombas eflujo verapamilo [11].

Análisis de la actividad ALDH:

Con el fin de prevenir el estrés oxidativo y favorecer la supervivencia celular, la aldehído deshidrogenasa (ALDH) media la oxidación intracelular de aldehidos a ácidos carboxílicos, fenómeno que proporciona resistencia a quimioterápicos como la ciclofosfamida [15]. Elevada actividad ALDH ha sido relacionada con la presencia de células madre tumorales en cáncer de mama, colon y pulmón [11].

Ensayo de formación de esferas:

Las células madre tumorales se caracterizan principalmente por su capacidad de autorrenovación ilimitada, lo que les permite generar colonias en forma de esfera de manera más eficiente que sus análogos tisulares. Este fenómeno puede ser evaluado mediante el ensayo de formación de esferas, consistente en colocar una única célula en medio libre de suero y analizar la colonia formada mediante su tinción con cristal violeta (véase Figura 6). Normalmente, las colonias de células madre tumorales son más grandes en tamaño y número que las colonias derivadas de no-CSC.



Figura 6. Visualización de un ensayo de formación de esferas mediante tinción con cristal violeta [11].

Antes de realizar el ensayo de formación de esferas es esencial asegurar que cada colonia sea producto de una única célula, lo que se consigue realizando una dilución adecuada de la población tumoral obtenida. Además, los resultados de este ensayo pueden estar influenciados por diversos factores, destacando la presencia de células madre tumorales quiescentes que no muestren capacidad de autorrenovación [11].

Evaluación de la tumorigenicidad:

El trasplante de tumores en serie en ratones inmunocomprometidos está actualmente considerado como el ensayo estándar para la identificación de células madre tumorales. Dicho ensayo se basa en la capacidad que presentan estas células de generar un tumor histológicamente similar al de origen, y en una frecuencia mucho mayor que el resto de células tumorales. No obstante, sus resultados están marcadamente influenciados por la relación entre el número de células y la frecuencia tumoral, así como por el grado de

inmunodeficiencia de los ratones. Además, el lugar de inyección también podría resultar esencial a la hora de favorecer la iniciación del proceso tumoral [11].

4. PROBLEMÁTICA TERAPÉUTICA:

4.1 RESISTENCIA A TERAPIAS CONVENCIONALES:

Una característica importante de las células madre tumorales es su capacidad de resistir tratamientos convencionales, como la quimioterapia y la radioterapia, especialmente en pacientes con un diagnóstico tardío. Estos tratamientos convencionales están dirigidos a eliminar únicamente células tumorales tisulares, lo que explica que una extirpación completa del tumor no resulte en un aumento de la supervivencia del paciente [2].

Numerosos factores pueden contribuir a la resistencia de las células madre tumorales. Un ejemplo de ello es la existencia de niveles elevados de citoquinas y factores de crecimiento que, como ya se mencionó, pueden promover una transición epitelial-mesenquimal y favorecer, consecuentemente, la plasticidad celular. Además, la eficacia de los tratamientos convencionales reside en su capacidad de destruir células con un elevado grado proliferativo, es decir, células que presenten una elevada velocidad de división, mientras que las células madre tumorales se caracterizan por presentar un ciclo celular lento y permanecer, durante largos estadios, en fase G₀ (estado no proliferativo) [2, 16]. Otros mecanismos como la expulsión de agentes antitumorales a través de bombas eflujo y la activación de mecanismos antiapoptóticos pueden igualmente estar implicados.

Transportadores eflujo:

La sobreexpresión de transportadores ABC (del inglés *Adenosine triphosphate-Binding Cassette*) por células madre tumorales es el origen de numerosos tumores quimiorresistentes. Estos transportadores se encargan de la expulsión de fármacos citostáticos desde el interior de las células tumorales hacia el ambiente extracelular, favoreciendo por ello la supervivencia celular. A pesar de ser una familia constituida por numerosos miembros, en las células madre tumorales destacan por su elevada densidad los transportadores ABCG2, ABCB1/glicoproteína P/MDR1 y ABCC1 [14].

La expresión del transportador ABCB1 se correlaciona con el 50% de los tumores quimiorresistentes y el transportador ABCG2, debido a su elevada especificidad de sustrato, puede mediar la resistencia a quimioterápicos estructuralmente tan diferentes como la doxorubicina, la mitoxantrona, el metotrexato y los inhibidores de la tirosin-quinasa [14]. Estos transportadores dependen ampliamente de la producción de ATP y por ello la desregulación del metabolismo glucolítico puede inhibir su actividad [5].

Mecanismos antiapoptóticos:

Una característica destacada de las células madre tumorales es su capacidad de evasión de la apoptosis, lo que también repercute directamente en la resistencia al tratamiento antitumoral. El intento de comprender los mecanismos por los que las células madre tumorales son resistentes a este fenómeno, ha llevado al desarrollo de numerosos estudios.

Se ha demostrado que las células madre tumorales sobreexpresan una serie de moléculas antiapoptóticas, y un ejemplo de ello es la expresión del regulador metabólico BAD (del inglés *Bcl-2 associated death promotor*). Esta proteína presenta actividad pro-apoptótica y es capaz de formar un complejo con la glucoquinasa. La formación de dicho complejo inhibe la capacidad pro-apoptótica del regulador, mientras que su disociación promueve la iniciación de la apoptosis. Entonces, favorecer la disociación de dicho complejo mediante una desregulación metabólica, podría reducir en gran medida la resistencia de las células a la apoptosis y aumentar, marcadamente, su susceptibilidad a tratamientos convencionales [5].

4.2 RECURRENCIA:

La capacidad de las células madre tumorales de permanecer en fase G_0 se denomina quiescencia. Este fenómeno permite que las células que se encuentran en un estado de reposo puedan ser activadas en respuesta a estímulos fisiológicos, permitiendo que abandonen la fase G_0 y entren en el ciclo celular, favoreciendo de esta forma el desarrollo de células altamente proliferativas (véase Figura 7). Es decir, la quiescencia es un estado reversible que protege a las células de los agentes antiproliferativos y que puede, consecuentemente, contribuir de manera importante a la progresión tumoral y a la recurrencia [17].

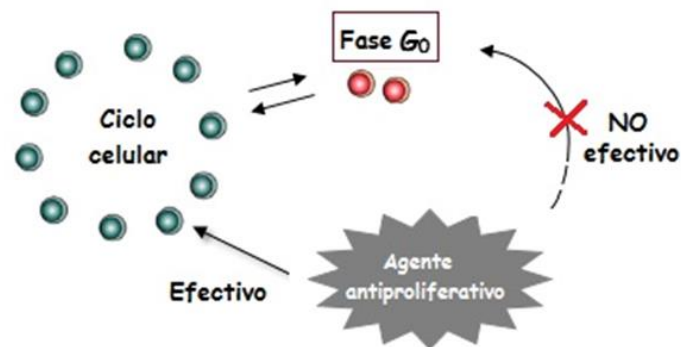


Figura 7. Repercusión clínica de la quiescencia celular. Representación adaptada de Takeishi S. *et al.* [16]

Varios investigadores sugieren que comprender los mecanismos que regulan este fenómeno y actuar sobre las células en estado no-proliferativo puede aportar grandes beneficios a la hora de tratar un tumor.

Actualmente existen varias estrategias que permiten actuar sobre células quiescentes y tales aproximaciones serán tratadas más adelante.

4.3 METÁSTASIS:

El desarrollo de metástasis es un proceso largo y complejo, y para que se complete las células tumorales deben superar una serie de etapas. En primer lugar, las células originarias del tumor deben ser capaces de eludir las barreras físicas que se oponen a su entrada en el torrente circulatorio y, posteriormente, escapar de los mecanismos de defensa del sistema inmune. Después, han de ser capaces de atravesar de nuevo la membrana basal y extravasarse, colonizando así una zona diferente a la de origen [17].

No todas las células tumorales presentan la capacidad de metastatizar, ya que el potencial metastático de una célula tumoral es función de su nivel de diferenciación y del desarrollo de diferentes mutaciones y alteraciones epigenéticas. Diversos estudios han vinculado la presencia de células madre tumorales a la aparición de metástasis, lo que se relaciona con su elevada resistencia a tratamientos convencionales y su capacidad de autorrenovación ilimitada [17].

La hipótesis actual hace referencia a un modelo EMT reversible: en primer lugar, células epiteliales tumorales inician una transición epitelial-mesenquimal, fenómeno que posibilita su migración. Posteriormente, tras asentarse en zonas distantes a la zona de origen, para poder proliferar y dar lugar a una metástasis, deben adquirir de nuevo un fenotipo epitelial, es decir, deben sufrir una transición mesenquimal-epitelial (MET), produciendo de esta forma metástasis epitelial [2]. Dicho proceso puede tener lugar gracias a la elevada plasticidad que presentan las células madre tumorales [1].

Es importante tener en cuenta que la detección y caracterización temprana de células tumorales circulantes en la sangre mediante el uso de una biopsia líquida puede prevenir la formación de metástasis y, consecuentemente, aumentar la supervivencia global de pacientes diagnosticados de cáncer [1].

5. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS:

5.1 MODULACIÓN DE LA QUIESCENCIA CELULAR:

El principal problema derivado de la resistencia terapéutica, es la capacidad que presentan las células madre tumorales de “despertar” del estado latente en el que se encuentran y generar células con un elevado potencial proliferativo, fenómeno que promueve el desarrollo de metástasis y la aparición de recurrencia.

Numerosos investigadores han centrado sus estudios en la búsqueda de estrategias que permitan destruir o neutralizar células madre tumorales quiescentes. En este ámbito destacan principalmente dos aproximaciones [16] (véase Figura 8):

1. Promover el despertar de las células madre tumorales quiescentes y consecuentemente su entrada en el ciclo celular. De esta forma, el uso de agentes antiproliferativos puede resultar en la extirpación completa de la masa tumoral. No obstante, existe el riesgo de que no todas las células proliferativas sean eliminadas y que por lo tanto las supervivientes puedan promover el desarrollo tumoral.
2. Favorecer la permanencia de las CSC en estado latente mediante el empleo de agentes farmacológicos. Mantener estas células en estado no proliferativo a lo largo de la vida del paciente puede prevenir de forma eficaz el desarrollo tumoral.

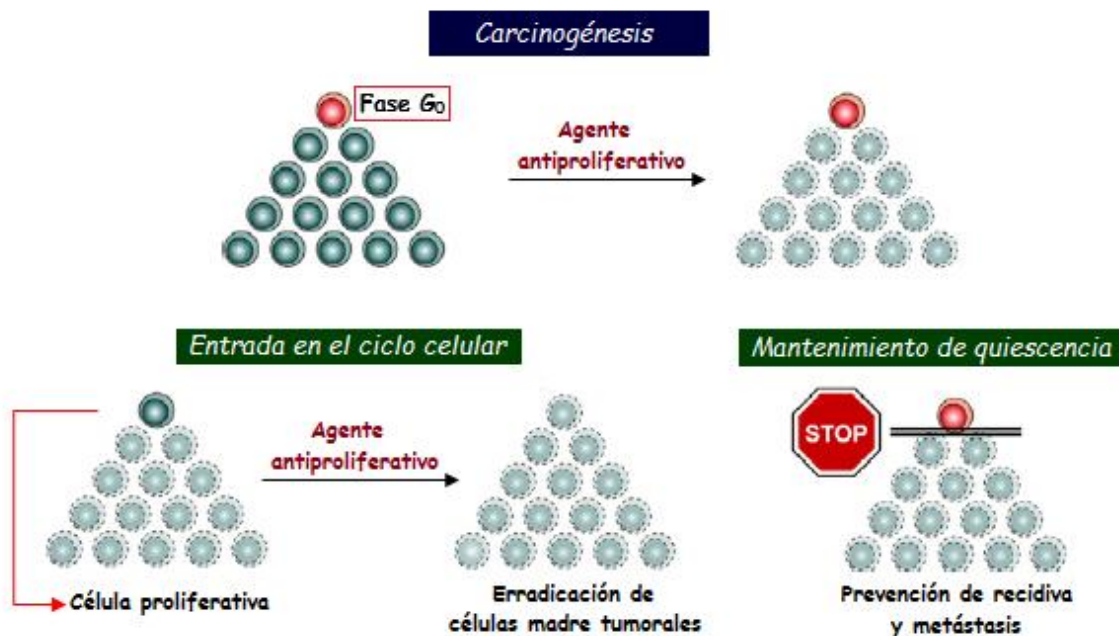


Figura 8. Esquema adaptado de Takeishi S. *et al.* [16] donde se representan dos posibles estrategias terapéuticas para la modulación de la quiescencia celular.

Como alternativa a estas dos posibilidades, varios investigadores apuestan por apuntar a las células madre tumorales cuando éstas se encuentran en fase G₀, aproximación que todavía se encuentra en fase de estudio [17].

5.2 INHIBICIÓN DE TRANSPORTADORES ABC:

En los últimos años se han estudiado múltiples estrategias para combatir la resistencia mediada por los transportadores ABC. Entre las diferentes posibilidades destaca por su indiscutible trascendencia el empleo de inhibidores competitivos y moduladores alostéricos (véase Tabla 2). En cuanto a los primeros, es posible distinguir cuatro generaciones: la primera generación la constituyen los inhibidores del transportador ABCB1 verapamilo y ciclosporina, cuya baja eficacia condujo a la necesidad de desarrollar inhibidores con una mayor especificidad. Surgieron así los inhibidores del transportador ABCB1 PSC833 Y biricodar, aunque con el tiempo se demostró que el PSC833 reducía el aclaramiento de diferentes agentes quimioterápicos aumentando consecuentemente sus niveles plasmáticos y la probabilidad de aparición de efectos tóxicos. La tercera generación de inhibidores la componen zosuquidar y taquiridar, el primero actúa específicamente sobre el transportador ABCB1 mientras que el segundo puede inhibir tanto el ABCB1 como el ABCG2. Por último, la cuarta generación está constituida por compuestos naturales como los polifenoles y la curcumina, cuya capacidad de modular los transportadores ABCG2, ABCB1 y ABCC1 fue demostrada en varios estudios [14].

Pese a las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo sobre los fármacos que componen estas 4 generaciones, debido a la baja especificidad que presentan y al importante riesgo de aparición de efectos tóxicos asociado a su uso, ninguno cumple los requisitos para su aprobación en clínica. No obstante, recientemente se ha demostrado que el inhibidor de la fosfodiesterasa 5 Vardenafilo presenta la capacidad de bloquear el transportador ABCB1 mejorando por ello la efectividad de quimioterápicos como paclitaxel y vincristina [18].

Tabla 2. Inhibidores competitivos y moduladores alostéricos de transportadores ABC.

Clasificación	Agente	Transportador
Inhibidores 1ª Generación	Verapamilo	ABCB1
	Ciclosporina	ABCB1
Inhibidores 2ª generación	Biricodar	ABCB1
	PSC833	ABCB1
Inhibidores 3ª generación	Zosuquidar	ABCB1
	Taquiridar	ABCB1 y ABCG2
Inhibidores 4ª generación	Curcumina	ABCB1, ABCB1, ABCC1
Moduladores	Vardenafilo	ABCB1

Como alternativa al empleo de inhibidores de las bombas eflujo, en los últimos años ha ganado gran importancia el campo de la nanotecnología; en concreto, el uso de nanopartículas precargadas de fármaco y su subsiguiente vectorización con el fin de aumentar la selectividad de dichos fármacos y reducir la aparición de efectos adversos. Como estrategia terapéutica frente a la expulsión de fármacos del interior celular por transportadores ABC, es posible administrar nanopartículas que únicamente contengan el fármaco inhibidor y dificulten su reconocimiento por la célula, o bien recurrir a la coadministración de un inhibidor y un citotóxico, lo que aumenta considerablemente la captación y eficacia del antitumoral [14].

Otra posible aproximación para aumentar la eficacia quimioterapéutica sería el empleo de un único agente capaz tanto de modular el transporte eflujo de fármacos como de generar un efecto citotóxico en las propias células madre. Ambas propiedades están presentes en un grupo de metabolitos hidrofóbicos denominados Flavonoides, los cuales son capaces de inhibir los transportadores ABCB1 y ABCG2 y a su vez pueden actuar como agentes antimetabólicos [14].

Finalmente, cabe mencionar la posibilidad de utilizar una terapia basada en el uso de ácidos nucleicos como estrategia para suprimir la actividad de las bombas eflujo. En este campo destaca el empleo de pequeñas moléculas de ARN interferente (siRNA) capaces de silenciar la expresión de los genes que codifican los transportadores ABC, destacando entre ellos el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR), responsable de la expresión del transportador ABCB1/glucoproteína P. Esta terapia promete una inhibición selectiva del gen problema con el fin de aumentar la susceptibilidad de tumores quimiorresistentes y favorecer la regresión tumoral. No obstante, para un paso sin restricciones a través de la membrana biológica y una incorporación adecuada de las moléculas de siRNA al interior celular, resulta imprescindible la neutralización de la carga negativa que presentan. El principal problema es que para ello se suelen emplear agentes de transfección que in vivo pueden provocar importantes efectos tóxicos [19].

5.3 INHIBICIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN:

La autorrenovación es una propiedad inherente a las células madre y se encuentra altamente regulada por diferentes vías de señalización. Una desregulación en estas vías se relaciona con un fenotipo CSC, por lo que comprender los mecanismos que intervienen en este proceso resulta de gran interés para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

En los últimos años, varios estudios han relacionado alteraciones metabólicas en las vías de señalización Notch, Hedgehog, Wnt y BMI-1, con una elevada proliferación celular y el desarrollo de múltiples neoplasias. Esto abre la posibilidad de utilizar diferentes componentes de estas vías como nuevas dianas terapéuticas. No obstante, la autorrenovación es una propiedad común a células madre normales y células madre tumorales, con lo que apuntar a estos mecanismos mediante el empleo de agentes que carezcan de selectividad puede generar una importante toxicidad en el paciente [20].

Un funcionamiento correcto de la vía de señalización Notch es fundamental para el mantenimiento de la capacidad de diferenciación por parte de las células madre. Sin embargo, una sobreactivación de dicha vía promueve el desarrollo de células altamente proliferativas con capacidad de evasión de la apoptosis. Recientemente, un grupo de investigadores afirmó que un compuesto natural denominado psoralidin presenta la capacidad de inhibir la vía Notch en determinados tipos de cáncer mediante la estimulación de proteínas proapoptóticas [18].

Una posibilidad añadida es utilizar anticuerpos dirigidos a componentes específicos de la vía como el ligando DLL4 (del inglés Delta-Like 4 Ligand) lo que favorece la regresión tumoral [20].

Otra vía de señalización que interviene en el proceso de regulación de la autorrenovación es la denominada vía Hedgehog. Esta vía se relaciona con el proceso de embriogénesis ya que su activación promueve el desarrollo de células madre embrionarias [18]. No obstante, como en el caso anterior, una alteración metabólica puede favorecer el desarrollo de un fenotipo CSC, aunque para ello es esencial la activación de un componente específico de la vía, el receptor transmembrana "Smoothened" [21].

El uso de antagonistas es una estrategia eficaz para la reversión de las posibles desregulaciones, y en caso de una alteración metabólica en la vía Hedgehog destaca la ciclopamina. La eficacia de este compuesto reside en su capacidad de reducir la progresión tumoral por inhibición del receptor transmembrana "Smoothened" [20, 21].

Además, los resultados de diferentes estudios sugieren la posibilidad de utilizar compuestos nutracéuticos como la curcumina y el resveratrol para la inhibición de la vía Hedgehog en determinados tipos de cáncer [18]

Otras vías de señalización proto-oncogénicas fundamentales para la supervivencia de las células madre tumorales son las vías Wnt y BMI-1. Una sobreexpresión de la vía BMI-1 se relaciona con una mayor invasividad y por ello la utilización de antagonistas puede resultar beneficiosa. Varios estudios se centraron en la utilización de inhibidores de la histona deacetilasa (enzima implicada en las vías Hedgehog y BMI-1) y el fármaco antimalárico artemisina como posibles inhibidores, no obstante, hasta el momento ninguna molécula ha mostrado presentar especificidad suficiente [18].

En resumen, profundizar en los mecanismos de autorrenovación que permiten la supervivencia de las células madre tumorales y dotar de la especificidad suficiente a los agentes antitumorales permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas eficaces en la eliminación de este tipo celular [20].

5.4 INMUNOTERAPIA:

El objetivo de apuntar selectivamente a células madre tumorales ha impulsado el desarrollo de diferentes estrategias basadas en la inmunoterapia [15].

Generación in vitro de linfocitos T anti-CSC:

Los linfocitos T CD8⁺ pueden diferenciarse a linfocitos T citotóxicos (CTLs) bajo determinadas condiciones, lo que promueve su migración a tejidos periféricos y la secreción de diferentes moléculas citotóxicas. Estos linfocitos se caracterizan principalmente por su capacidad de adquirir memoria inmunológica, propiedad que puede perdurar durante largos estadios y que facilita una activación rápida del sistema inmune en caso de recurrencia o metástasis.

Varios investigadores han probado que linfocitos T CD8⁺ mostrados a células madre tumorales in vitro poseen una importante actividad anti-CSC in vivo. En 1999, Bonnet y colaboradores llevaron a cabo un estudio en el que generaron linfocitos T CD8⁺ frente a células madre leucémicas humanas, cuya administración a ratones inmunocomprometidos permitió la erradicación del tumor. Diferentes estudios similares muestran el potencial terapéutico de esta terapia; no obstante, recientemente se ha visto que numerosas células madre tumorales logran evadir la acción de los linfocitos T, lo que puede relacionarse con una elevada expresión de interleucina 4, molécula capaz de inhibir la actividad citotóxica de estos linfocitos [15].

Vacunas anti-CSC:

La capacidad antigénica de las células madre tumorales ha posibilitado el desarrollo experimental de vacunas potencialmente eficaces frente al cáncer. Hasta la fecha, se han preparado diferentes vacunas empleando células dendríticas como células presentadoras de antígeno, capaces de desencadenar la respuesta inmune por activación de los linfocitos T en ratones inmunocomprometidos.

No obstante, la eficacia de una vacuna depende de su capacidad de inducir inmunidad celular y humoral en el hospedador y por ello el estudio de eficacia se llevó a cabo en ratones inmunocompetentes. Los resultados fueron satisfactorios ya que se demostró que la administración de una vacuna anti-CSC puede prevenir el desarrollo de metástasis y favorecer la regresión tumoral.

Las células madre tumorales constituyen una pequeña parte del total de la masa tumoral y por ello la eliminación de estas células puede no resultar en una disminución del tamaño del tumor. Para una mayor efectividad podría recomendarse el empleo de vacunas anti-CSC bien en combinación con radioterapia y/o quimioterapia o bien en adyuvancia tras una extirpación quirúrgica [15].

5.5 ANTICUERPOS FRENTE A MARCADORES CSC:

En la última década ha sido posible identificar y aislar diferentes poblaciones de células madre tumorales debido a los perfiles de expresión de determinados marcadores de superficie. Sin embargo, recientemente varios estudios han demostrado el potencial de utilizar estos biomarcadores como posible diana terapéutica, principalmente en el campo de la inmunoterapia. Diversos anticuerpos han sido desarrollados para detectar determinados marcadores CSC y activar, consecuentemente, el sistema inmune, con el fin de afectar al crecimiento celular y promover la regresión tumoral. Las células madre tumorales se caracterizan por expresar múltiples marcadores de superficie, pero como potentes dianas terapéuticas destacan los marcadores CD44, CD133 y EpCAM.

El marcador CD44 está relacionado con la adquisición de propiedades CSC (autorrenovación, invasividad y evasión de la apoptosis), y por ello juega un papel fundamental en el desarrollo tumoral. En los últimos años, el empleo de varios anticuerpos dirigidos a inhibir la actividad del marcador CD44 en diferentes modelos animales ha resultado en una mayor supervivencia animal, lo que se relaciona con una menor capacidad metastásica y una elevada susceptibilidad a la apoptosis. El primer anti-CD44 desarrollado fue el anticuerpo monoclonal H90, capaz de erradicar una población de células madre leucémicas tras su administración a ratones inmunocomprometidos. Actualmente, varios anti-CD44 se encuentran bajo investigación preclínica [15].

El fenotipo CD133⁺ se asocia con resistencia a tratamientos citotóxicos convencionales y con un mal pronóstico de la enfermedad. Numerosos tumores sólidos se encuentran enriquecidos con células madre tumorales CD133⁺ y con el fin de erradicar esta población se han desarrollado varios anticuerpos monoclonales [15]. Entre ellos destaca el anticuerpo biespecífico (BsAb) anti-CD133/CD3. La conjugación de este anticuerpo a células CIK (del inglés cytokine-induced killer cells) genera células con un elevado potencial antitumoral (células BsAb-CIK), cuya administración a ratones inmunocomprometidos resulta en regresión tumoral [22].

Otro marcador sobreexpresado en células madre con elevado potencial tumorigénico es la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM). Al igual que en los casos anteriores, en los últimos años se han llevado a cabo varios estudios donde ha sido utilizada como diana de numerosos anticuerpos humanizados, destacando por su potente actividad antitumoral el anticuerpo Solitomab (MT110). Solitomab es un anticuerpo biespecífico anti-CD3/EpCAM de acoplamiento a células T que ha mostrado una notable eficacia a la hora de estabilizar y remitir diferentes patologías tumorales en pacientes con un estadio avanzado [22].

5.6 MODULACIÓN DEL NICHOS CSC:

El nicho CSC está implicado en el mantenimiento de las propiedades de células madre tumorales y por ello el desarrollo de terapias que permitan combatir dicho fenómeno puede resultar eficaz en la erradicación de este tipo celular.

1. Normalización vascular:

La angiogénesis es un proceso esencial para el desarrollo de tumores regulado por la secreción de diferentes factores angiogénicos como el VEGF y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF).

Tradicionalmente, con el fin de privar al tumor de oxígeno y nutrientes, se buscaba destruir completamente los vasos formados durante el desarrollo del tumor. No obstante, actualmente dicha estrategia se ha sustituido por lo denominado “normalización vascular”, consistente en normalizar la vasculatura tumoral favoreciendo la administración de fármacos y dificultando la formación de un ambiente hipóxico. Así, la angiogénesis puede combatirse bien interfiriendo con moléculas pro-angiogénicas o bien potenciando la vía antiangiogénica.

Como molécula pro-angiogénica destaca el VEGF, y por ello la administración de Bevacizumab (anticuerpo anti-VEGF) resulta eficaz a la hora de reestablecer la vasculatura. En cuanto a la vía antiangiogénica, es posible potenciar el efecto del PEDF, factor con propiedades antiangiogénicas y antitumorales. Con este fin, se recurre a la terapia génica, es decir, a la administración de un plásmido que codifique dicho factor. Se ha demostrado además que la terapia combinada de un agente quimioterápico y PEDF proporciona un efecto antitumoral sinérgico [23].

2. Modulación de la matriz extracelular:

Como se mencionó anteriormente, la matriz extracelular constituye una barrera física que protege a las células madre tumorales de la acción de agentes quimioterápicos. No obstante, este fenómeno puede combatirse mediante la administración de enzimas que degraden la matriz como colagenasa o hialuronidasa, cuya administración debe realizarse en el interior de nanopartículas que eviten el efecto sistémico y potencien el efecto local.

Otra estrategia potencialmente eficaz sería la inhibición de la lisil oxidasa, enzima sobreexpresada en los tumores y que aumenta la rigidez de la barrera por reticulación del colágeno.

Además de proteger a las células madre tumorales, la matriz extracelular también favorece la progresión tumoral por liberación de diversos mediadores celulares durante el proceso de remodelación. Este proceso se lleva a cabo mediante enzimas denominadas metaloproteinasas, cuya acción catalítica requiere la presencia de iones cobre o cinc. Así, para evitar el proceso de remodelación, es posible administrar

compuestos que quelaten dichos iones e impidan la acción de las metaloproteinasas. Entre estos compuestos es posible destacar marimastat, batimastat y β -aminopropionitrilo [23].

3. Oxigenación:

La hipoxia se asocia a un mal pronóstico clínico ya que favorece tanto la inmunosupresión como el desarrollo de angiogénesis. Con el fin de combatir ambos efectos, se recurre a la oxigenación del tumor mediante el empleo de agentes de normalización vascular. Asimismo, el proceso de angiogénesis está mediado por HIF, cuya expresión puede reducirse mediante el empleo de ARN interferente [23].

4. Modulación de células inflamatorias:

La reversión de la inmunosupresión mediada por células inflamatorias es una etapa crítica de la regresión tumoral. Actualmente, existen varias estrategias terapéuticas que promueven la reactivación de la respuesta inmune en el ambiente tumoral y contribuyen, consecuentemente, a la eliminación del tumor.

En primer lugar, es posible reactivar la acción citotóxica de los linfocitos TCD8+ mediante la administración de “señales de peligro”. Entre estas señales destaca el uso del lipopolisacárido, capaz de promover la conversión de los TAMs a un fenotipo inmunoestimulador.

Otra posibilidad es recurrir a la administración de citoquinas que medien el proceso de inmunoestimulación como IL-12 e IL-2, o inhibir la inmunosupresión vía TFG- β mediante la administración del antagonista SB505124. No obstante, ambas estrategias precisan del empleo de nanopartículas que protejan al agente terapéutico y favorezcan la obtención de niveles sostenidos. Además, en vez de administrar citoquinas, también es posible recurrir a la terapia génica e inducir su expresión mediante la administración de nanopartículas cargadas de plásmidos.

Finalmente, con el fin de evitar el desarrollo de metástasis, es necesario contrarrestar las acciones mediadas por la interacción de CXCL12 y su receptor CXCR4, sobreexpresado en tumores metastásicos. Para ello, bien se silencia la expresión de dicho receptor mediante el empleo de ARN interferente, o bien se bloquea su acción por administración del antagonista perixaflor [23].

5.7 NANOMEDICINA:

Desde el nacimiento de la hipótesis CSC, los esfuerzos dirigidos a acabar con las células madre tumorales se han centrado principalmente en el desarrollo de estrategias terapéuticas que permiten reducir la resistencia tumoral, bien por inhibición de diferentes mecanismos o propiedades inherentes a este tipo celular, o bien por destrucción del medioambiente tumoral. Sin embargo, recientemente, han surgido numerosos agentes terapéuticos con capacidad de apuntar directamente a estas células, lo que abre la

posibilidad de eliminar íntegramente la carga tumoral y lograr, consecuentemente, una regresión tumoral completa [24].

Durante la evaluación de numerosos agentes anti-CSC específicos se llegó a la conclusión de que su administración resultaba errónea, entre otras razones, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Ello, unido a su elevada citotoxicidad y estrecho margen terapéutico, ha impulsado el desarrollo de una terapia anti-CSC basada en la nanotecnología.

Como consecuencia de su tamaño y composición, las nanopartículas pueden transportar fármacos estructuralmente muy diferentes, proporcionando así grandes mejoras tanto en sus perfiles de absorción, distribución y eliminación, como en su relación eficacia-seguridad. Hasta la fecha, un número elevado de nanomedicinas han sido evaluadas en diferentes estudios preclínicos, no obstante, a pesar de su potencial terapéutico, su aplicación clínica continua siendo un desafío [24].

A continuación se exponen las interesantes ventajas que puede aportar la nanomedicina a la hora de combatir la problemática de las células madre tumorales y sus principales aplicaciones dentro de este campo.

Ventajas de la nanomedicina en la terapia anti-CSC:

1. Aumento de la biodisponibilidad de fármacos anti-CSC:

Como se mencionó anteriormente, la administración de agentes anti-CSC específicos presenta varios obstáculos relacionados con su solubilidad, inestabilidad, baja absorción celular y elevado potencial citotóxico. Como solución, es posible conjugar o encapsular estos agentes dentro de nanopartículas que faciliten su llegada al lugar de acción y aumenten, consecuentemente, su biodisponibilidad.

Este proceso puede llevarse a cabo mediante dos modalidades, la vectorización pasiva y la vectorización activa. En el primer caso, las nanopartículas presentan la capacidad de acumularse en tejidos tumorales debido al mayor tamaño de poro del epitelio vascular y al reducido drenaje linfático que presentan estos tejidos. En cambio, en la vectorización activa es posible dirigir las nanopartículas a un tejido diana concreto por conjugación de diferentes ligandos con afinidad por marcadores CSC a su superficie celular.

Además de aumentar la concentración de agentes terapéuticos en tejidos tumorales, los nanotransportadores también son capaces de penetrar en el nicho hipóxico en el que residen las células madre tumorales, el cual por encontrarse alejado del torrente circulatorio no resulta accesible a terapias convencionales [24].

2. Evasión de transportadores ABC:

La conjugación o encapsulación de quimioterápicos en nanopartículas dificulta su reconocimiento por los transportadores ABC, principales promotores de la aparición de tumores quimiorresistentes. Asimismo, las nanopartículas modificadas son capaces de evadir las bombas eflujo mediante el proceso de endocitosis mediada por receptor, lo que resulta en un incremento de su concentración intracelular. Consecuentemente, ambos fenómenos pueden promover un aumento de la concentración intracelular de fármacos anti-CSC y potenciar marcadamente su citotoxicidad [24].

3. Reducción de la toxicidad en células madre somáticas:

En los últimos años se han desarrollado numerosos agentes terapéuticos capaces de apuntar selectivamente tanto a marcadores CSC como a determinados mecanismos de señalización. No obstante, esta terapia puede dar lugar a importantes efectos nocivos ya que estos componentes no son expresados exclusivamente por células madre tumorales, sino también por células madre somáticas.

Para prevenir la toxicidad en este tipo celular es posible recurrir a la nanomedicina; las nanopartículas pueden concentrarse en los tejidos tumorales debido al menor arrastre vascular y linfático que sufren en dichos tejidos [24].

Aplicaciones de la nanomedicina dentro de la terapia anti-CSC:

1. Administración de agentes anti-CSC específicos:

Como se explicó anteriormente, los agentes anti-CSC específicos pueden presentar propiedades fisicoquímicas que dificulten su administración. Por ejemplo, el antibiótico *salinomicina* resulta marcadamente eficaz frente a las células madre tumorales, pero su baja solubilidad acuosa y su elevada toxicidad dificultan su uso en clínica. Como alternativa, la preparación de nanopartículas cargadas con *salinomicina* aumenta significativamente la biodisponibilidad y citotoxicidad del fármaco. Del mismo modo, la encapsulación de *curcumina* en micelas poliméricas solventa los problemas relacionados con su inestabilidad, proporcionando niveles intracelulares aumentados y promoviendo la inhibición de células madre tumorales CD44⁺CD24⁻ de origen colorrectal.

También es posible aplicar la nanotecnología a la administración de agentes quimioterápicos convencionales. Este es el caso de la *doxorubicina*, cuya conjugación a nanopartículas de oro permite evadir la actividad de la glucoproteína P en células madre tumorales de origen mamario. Este fenómeno posibilita una reducción importante del comportamiento CSC [24].

2. Administración de ácidos nucleicos anti-CSC:

Los ácidos nucleicos son macromoléculas con un elevado potencial antitumoral y su administración en nanotransportadores puede solventar problemas asociados a su estabilidad y biodisponibilidad. Los MicroRNAs posibilitan la regulación post-transcripcional de diferentes funciones celulares y ofrecen varias posibilidades para atacar a las células madre tumorales. Los RNAi destacan por su capacidad de silenciar la expresión de determinados genes diana, lo que puede reducir notablemente la densidad de células madre tumorales. Cabe señalar a modo de ejemplo un estudio llevado a cabo recientemente en el que se observó que la supresión del gen OTC-4 mediada por siRNA resultaba en apoptosis.

No obstante, la aplicación clínica de estos agentes presenta varios desafíos derivados de su inestabilidad, baja biodisponibilidad y probable toxicidad sistémica. Como solución, varios investigadores han propuesto que la encapsulación de miRNAs en nanotransportadores puede favorecer la inhibición del potencial tumorigénico de células madre tumorales, aumentar su susceptibilidad a agentes terapéuticos, reducir su capacidad de formación de esferas e, incluso, inhibir su capacidad metastásica [24].

3. Administración combinada de agentes anti-CSC:

La elevada heterogeneidad de la masa tumoral y la plasticidad de las células madre tumorales justifican que la eliminación de una población CSC no resulte en regresión tumoral completa. Si tras la depleción de estas células permanecen residuos celulares con capacidad de sufrir “stemness”, se obtendrá una nueva población CSC capaz de mantener el crecimiento tumoral y promover, consecuentemente, el desarrollo de recurrencia.

Una alternativa puede ser combinar estrategias que apunten tanto a células madre tumorales como al resto de células que componen el tumor. Como ejemplo, para el tratamiento del cáncer de mama, un grupo de investigadores empleó micelas poliméricas cargadas de paclitaxel para apuntar a células tumorales normales y micelas poliméricas cargadas de salinomycin para eliminar CSC. La administración combinada de ambos agentes inhibió eficazmente el desarrollo tumoral promoviendo una regresión tumoral tanto in vitro como in vivo.

Otras estrategias propuestas recientemente son la encapsulación de varios agentes terapéuticos sinérgicos en un mismo nanotransportador y la administración de MicroRNAs junto con agentes químicos que promuevan su penetración en los tejidos tumorales [24].

4. Vectorización de nanotransportadores:

La decoración de nanopartículas cargadas con anticuerpos frente marcadores CSC permite guiar a agentes anti-CSC a su lugar de acción y aumentar, consecuentemente, su eficacia terapéutica.

De manera reciente se ha propuesto que el ácido hialurónico actúa como ligando de unión al receptor CD44, marcador relacionado con la adquisición de propiedades CSC. Consecuentemente, se demostró que la administración de nanotransportadores modificados con ácido hialurónico y cargados con siRNA favorece una respuesta antitumoral mayor en tumores CD44⁺ [24].

6. CONCLUSIÓN:

Habiendo desarrollado la presente revisión, las principales conclusiones que extraigo son las que se exponen a continuación:

- En lo relativo al concepto de célula madre tumoral, aunque actualmente parece haber un consenso sobre la existencia de esta población, su definición todavía no está clara, y crecientes discrepancias surgen en torno a la denominación célula madre tumoral. Cabe asimismo destacar que, el calificativo célula madre tumoral surge por analogía con las células madre tisulares y por ello numerosos autores muestran reticencia al empleo de esta designación.
- Las principales propiedades que caracterizan a las células madre tumorales son su capacidad de autorrenovación ilimitada y generación de linajes diferenciados. Por ello, aunque puedan ser identificadas mediante caracterización fenotípica, siempre será necesario llevar a cabo una validación funcional.
- Actualmente varios autores exponen la necesidad de diferenciar estas células en función del grado de expresión de sus capacidades, surgiendo así por ejemplo el concepto de célula iniciadora de tumor. No obstante, la diferencia entre ambas entidades sigue sin estar clara y muchos autores continúan empleando el término célula madre tumoral como sinónimo de célula iniciadora de tumor.
- La repercusión clínica del concepto de célula madre tumoral se fundamenta en un aumento de la resistencia terapéutica tras la administración de tratamientos antitumorales convencionales que apuntan únicamente a células altamente proliferativas. Este fenómeno ha llevado a establecer uno de los principios básicos de la terapia antitumoral, basándose en la necesidad de combinar estrategias terapéuticas que apunten tanto a las células madre tumorales como al resto de células que componen el tumor.
- De la presente revisión se evidencia que la población CSC representa una entidad inestable, que se define como un estado transitorio que puede ser inducido o disuadido por influencia de diferentes factores. Ello ha llevado al establecimiento de un nuevo modelo de carcinogénesis, revolucionando el concepto tradicional de desarrollo tumoral y dotando de una especial trascendencia al concepto de célula madre tumoral dentro del ámbito del cáncer.
- En cuanto a las estrategias terapéuticas descritas, considero necesario destacar que todas ellas se encuentran actualmente en desarrollo, y que la mayoría constituyen estudios experimentales cuya eficacia no ha sido clínicamente probada.

7. BIBLIOGRAFÍA:

1. Peitzsch C., Tyutyunnykova A., Pantel K., Dubrovskaya A. Cancer stem cells: the root of tumor recurrence and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 2017; 1-41.
2. Chang JC. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis and treatment resistance. *Medicine* 2016; 95(S1): S20-S25.
3. Craig TJ. Cancer Stem Cells: Controversial or Just Misunderstood? *Cell Stem Cell* 2009; 4(3): 203-205.
4. Adorno-Cruz V. et al. Cancer stem cells: Targeting the roots of cancer, seeds of metastasis, and sources of therapy resistance. *Cancer Research* 2015; 75(6): 924-929.
5. Deshmukh A. et al. Cancer stem cell metabolism: a potential target for cancer therapy. *Molecular Cancer* 2016; 15(69): 1-10.
6. Rycaj K., Tang DG. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Research* 2015; 75(19): 4003-4011.
7. Peiris-Pagès M. et al. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Research* 2016; 18(1): 1-10.
8. Plaks V., Kong N. et al. The cancer stem cell niche: How essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell Stem Cell* 2015; 16(3): 225-238
9. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells: Current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 2012; 10(6): 717-728.
10. Tang DG. Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research* 2012; 22(3): 457-472.
11. Tirino V. et al. Cancer stem cells in solid tumors: An overview and new approaches for their isolation and characterization. *The FASEB Journal* 2013; 27(1): 1-12.
12. Islam F. et al. Translational potential of cancer stem cells: A review of the detection of cancer stem cells and their roles in cancer recurrence and cancer treatment. *Experimental Cell Research* 2015; 335(1): 135-147.
13. Hadnagy A. et al. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research* 2006; 312(19): 3701-3710.
14. Moitra K. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Stem Cells. *BioMed Research International* 2015; 1-8.
15. Pan Q., Li Q., Liu S. et al. Concise Review: Targeting Cancer Stem Cells Using Immunologic Approaches. *Stem cells* 2015; 2085-2092.
16. Takeishi S., Nakayama KI. To wake up cancer stem cells, or to let them sleep, that is the question. *Cancer Science* 2016; 107(7): 875-881.

17. Chen W. et al. Cancer stem cell quiescence and plasticity as major challenges in cancer therapy. *Stem Cells International* 2016; 1-16.
18. Kim YJ, Siegler EL, Siriwon N., Wang P. Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2016; 2(1): 233-235.
19. Karnati H., Yalagala R., Undi R. et al. Therapeutic potential of siRNA and DNazymes in cancer. *Tumor biology* 2014; 35(10): 9505–9510.
20. O’Brien C., Kreso A. et al. Cancer stem cells and self-renewal. *Clinical Cancer Research* 2010; 16(12): 3113-3120.
21. Borah A., et al. Targeting self-renewal pathways in cancer stem cells: clinical implications for cancer therapy. *Oncogenesis* 2015; 4(11): 1-11.
22. Kwiatkowska-Borowczyk E. et al. Immunotargeting of cancer stem cells. *Contemporary Oncology* 2015; 19 (1A): A52-A59.
23. Garcia-Mazas C. et al. Biomaterials to suppress cancer stem cells and disrupt their tumoral niche. *International Journal of Pharmaceutics* 2016; 1-16.
24. Shen S. et al. Nanomedicine-mediated cancer stem cell therapy. *Biomaterials* 2016; 74(1): 1-18.

AGRADECIMIENTOS:

A mi tutor, el Dr. Anxo Vidal, por haber aceptado mi propuesta de realizar el trabajo de Fin de Grado bajo su supervisión y haber fomentado mi interés por el campo de las células madre tumorales.

A mis padres y a mi hermano, por apoyarme cada día y comprender que todo objetivo conlleva un esfuerzo importante.

A mis amigas, en especial a Diana y Estrela, por acompañarme a lo largo de este viaje y compartir conmigo cada una de mis derrotas y alegrías.

Y a mi novio, Brais, por escucharme en cada momento de agobio y proporcionarme esa visión positiva que tanto me hace falta. Sin su apoyo llegar hasta aquí habría resultado un camino imposible.