JULIANA LAINO DO VAL CARNEIRO

Avaliação do papel dos miRNAs -221, -222 e -4728-3p em células-tronco tumorais derivadas de linhagens celulares de câncer de mama HER2+

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Emmanuel Dias-Neto

Co-orientadora: Dra. Diana Noronha Nunes

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

CARNEIRO, J. L. V. **Avaliação do papel dos miRNAs -221, -222 e -4728-3p em células-tronco tumorais derivadas de linhagens celulares de câncer de mama HER2+.** 2013. 122 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Estudos têm demonstrado que uma pequena população de células em tumores de mama, denominadas células iniciadoras de tumores ou células-tronco tumorais (CSCs – do inglês *Cancer Stem Cells*), são altamente tumorigênicas quando injetadas em camundongos imunodeficientes. As CSCs, caracterizadas pela expressão de CD44 concomitante à expressão baixa ou indetectável de CD24 ($CD44^{+}CD24^{-/baixa}$) e a alta atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1), contribuem para a agressividade tumoral, desenvolvimento de metástases e a resistência à radio- e à quimioterapia. *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28* são alguns dos marcadores de pluripotência de células-tronco embrionárias que poderiam estar presentes nas CSCs. Tumores de mama HER2+, quando comparados a tumores sem a amplificação deste oncogene, são ricos em CSCs, o que parece ser uma das bases de sua maior agressividade. Estudos anteriores mostraram a expressão aumentada dos miRNAs -221 e -222 em CSCs de mama, assim como a elevação dos níveis de miRNA-4728-3p (mapeado em um intron de *HER2*) em tumores e linhagens tumorais HER2+. Neste trabalho buscou-se contribuir para um melhor entendimento do papel dos miRNAs -221, -222 e -4728-3p na biologia das CSCs em linhagens celulares de mama. Para isto, inicialmente foram feitos experimentos com células de pacientes e células MCF-7 cultivadas em condições aderentes e de mamosferas (estruturas celulares esferóides ricas em CSCs). Foi observado que, em relação às células crescidas em condições aderentes, as mamosferas possuiam níveis aumentados de CD44, *OCT-4, NANOG* e *SOX2,* uma menor expressão de CD24 e uma elevação da expressão dos miRNAs -221 e -222,. A eficiência de formação de esferas (MFE) de células MCF-7 mostrou-se aumentada após a indução da superexpressão dos miRNAs -221 e -222. A resistência ao quimioterápico paclitaxel estava aumentada em mamosferas que superexpressavam o miRNA-222. Em conjunto esses dados sugerem um possível papel desses miRNAs na biologia das CSCs derivadas da linhagem MCF-7. Posteriormente, *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28*, bem como os miRNAs -221, -222, -4728-3p foram avaliados por qRT-PCR em mamosferas derivadas das linhagens HER2+, BT-474 e SKBR3, e MCF-7. CD44, CD24 e ALDH1 foram analisados em mamosferas derivadas dessas mesmas linhagens por citometria de fluxo. O fenótipo $CD44^{+}CD24^{-/baixa}$ não se mostrou aumentado em mamosferas derivadas dessas linhagens, algo que pode ser explicado pela associacão desse fenótipo com CSCs derivadas de células com perfil basal/mesenquimal. Apesar dos miRNAs e dos supostos marcadores *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28* não estarem aumentados em todos os tempos de cultivo, mamosferas com 7 dias de cultivo apresentaram altos níveis de ALDH1, que é considerada o marcador "padrão ouro" para o isolamento de subpopulações de CSCs em linhagens celulares HER2+. Esse resultado sugere um enriquecimento de CSCs em mamosferas das linhagens HER2+, BT-474 e SKBR3, e MCF-7. A superexpressão de miR-4728-3p, localizado em um intron de HER2, levou a um aumento das subpopulações ALDH1+ em duas linhagens celulares reforçando seu envolvimento com a biologia de CSCs.

Palavras-chave: Células-tronco tumorais. Câncer de mama. miR-221. miR-222. miR-4728-3p.

ABSTRACT

CARNEIRO, J. L. V. **Evaluation of the role of miRNAs -221, -222 e -4728-3p in breast cancer stem cells derived from HER2+ cell lines.** 2013. 122 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Studies have shown that a small population of breast tumor cells, called cancer stem-cells (CSCs), are highly tumorigenic when injected in immunodeficient mice. These CSCs, characterized by high expression levels of CD44, low or undetectable levels of CD24 ($CD44^{+}CD24^{-/low}$) and a high activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH1), contribute to tumor agressivity, metastatization as well as radio and chemotherapy resistance. These CSCs appear to express the embryonic stem cell markers *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28,* which could be found in CSCs. The enrichment of CSCs in HER+ breast tumors suggests that this oncogene may trigger it's more agressive behaviour when compared to tumors with no HER2 amplification. Some miRNAs are differentially expressed in stem cells, suggesting their putative role in regulation of the biology of these cells. Previous studies have shown miRNA-221 and -222 to be upregulated in breast CSCs when compared to differentiated cells, as well as the high levels of miRNA-4728-3p, (mapped in an intron of *HER2*) in HER2+ tumors and cancer cell lines. In this study, we aim to contribute to the better understanding the role of miRNAs -221, 222, 4728-3p in the the biology of CSCs in breast cancer cell lines. Firstly, experiments were done in breast cancer cells derived from patients as well as MCF-7 cells (grown adherent or as mammospheres). When compared to cells grown in adherent conditions, mammospheres showed higher levels of miRNAs -221 and -222, CD44, *OCT-4, NANOG* and *SOX2* and also, reduced CD24 levels. The mammosphere forming efficiency (MFE) of MCF-7 cells was increased after lentiviral-induced miR-221 and -222 overexpression. The resistance to paclitaxel was increased in mammopheres that were overexpressing miRNA-222. Together, these results suggested a possible role of these miRNAs in MCF-7-derived CSCs. Subsequently, *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28*, as well as miRNAs -221, -222, -4728-3p were evaluated by qRT-PCR in mammospheres (cultivated for 7, 14, 21 and 28 days) from HER+ cell lines, BT-474 e SKBR3, and MFC-7. ALDH1, CD44 and CD24 were evaluated in mamospheres from these cell lines by flow cytometry. The phenotype $CD44^{+}CD24^{-/low}$ was not increased in 7-days mammospheres, a finding that may derived from the association of this phenotype with CSCs with basal/mesenchymal profile. Although miRNAs -221, -222, -4728-3p and *OCT-4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28* were not found to be increased in mammospheres during all periods of culture, mammospheres in culture for 7 days showed high levels of ALDH1, a "gold standard" stem cell marker for isolating subpopulations of CSCs in HER+ cells lines. This result suggests an enrichment of CSCs in mammospheres from HER+ cell lines, BT-474 and SKBR3, as well as in MCF-7. A superexpression of miR-4728-3p, located in an intron of the HER2 gene, induced the increment of ALDH1+ subpopulations in two cell lines, reinforcing its role in the biology of CSCs.

Keywords: Cancer stem cells. Breast cancer. miR-221. miR-222. miR-4728-3p.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de mama e seus subtipos

O câncer de mama é a principal causa de morte no sexo feminino depois das doenças cardiovasculares, tais como o infarto e o acidente vascular cerebral, e apresenta a segunda maior taxa de mortalidade no mundo quando comparado com outros tipos de tumores (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). A previsão de novos casos para o ano de 2012, em todo o mundo, foi de 1,6 milhão (IARC, 2012).

O câncer de mama é uma doença heterogênea causada por diversas alterações moleculares que podem ocorrer em diferentes tipos celulares (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; SOTIRIOU et al., 2003; WEIGELT et al., 2009). A maioria dos carcinomas de mama (50-80%) é classificada como ductal-invasivo.

Os tumores de mama invasivos possuem várias formas e estágios, e se caracterizam pela disseminação das células tumorais para outras partes desta glândula, ou para outras regiões do corpo. Tradicionalmente estes tumores são classificados em subgrupos conforme seu grau e tipo histológico, presença de invasão linfo-vascular, metástase para os linfonodos e expressão de alguns marcadores preditivos, tais como os receptores hormonais (estrógeno – ER e progesterona – PR) e o receptor do fator de crescimento epidermal tipo 2 (ERBB2 ou HER2) (SORLIE et al., 2001).

Devido à alta heterogeneidade encontrada entre os tumores de mama, a classificação baseada no perfil molecular é uma alternativa atual em relação à classificação anatomo-patológica, uma vez que tumores com o mesmo grau, estadio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e distintas respostas à terapia (ELSTON et al., 1991).

A classificação molecular proposta por Perou et al. (2000) e por Sorlie et al. (2001) identifica cinco grandes grupos de tumores de mama e é baseada no perfil de expressão gênica: luminal A, luminal B, HER2 positivos (HER2+), *basal-like* e normal *breast-like*.

O subtipo luminal A possui geralmente um bom prognóstico, caracterizado principalmente pela expressão do ER e ausência de expressão de HER2 e expressão de citoqueratinas (CKs) características de células epiteliais luminais, como as CKs 7, 8, 18 e 19.

O subtipo luminal B expressa tanto o ER quanto HER2 e tem menor expressão das CKs 7, 8, 18 e 19, possuindo um pior prognóstico.

Os tumores HER2+ possuem superexpressão de HER2 e são negativos para a expressão de ER e PR, e também estão associados a um prognóstico ruim.

O subtipo *basal-like* apresenta características de células basais ou mioepiteliais de mama normal e é identificado pela expressão das CKs 5, 6, 14 e 17, e ausência de expressão dos receptores hormonais e HER2. É um subtipo de mau prognóstico que não responde aos tratamentos hormonais e imunoterápicos disponíveis.

Os tumores *normal-breast like* apresentam um perfil de expressão gênica similar ao do tecido adiposo e de outras células não-epiteliais, sendo de crescimento lento e pouco agressivo. Geralmente possuem bom prognóstico, apesar de também não responderem ao tratamento hormonal e imunoterápico devido à ausência de expressão de ER e PR e HER2. Os dois últimos subtipos apresentados são frequentemente agrupados em uma classe chamada de tumores triplo-negativos, devido à ausência de expressão dos receptores hormonais e HER2. Além dos cinco grandes grupos acima, existem alguns tumores que sobrepõem dois grupos, tais como os tumores HER2+ com expressão de CKs basais 5 e 6, chamados de basal HER2+ esses tumores são tipicamente pouco diferenciados, possuem alto grau de invasão com grande necrose (OLIVERAS-FERRAROS et al., 2010).

Apesar dessas classificações moleculares dos tumores terem contribuído com maior valor preditivo da evolução e da resposta ao tratamento em relação à classificação histopatológica clássica, tumores com a mesma classificação histológica e molecular podem ter prognóstico e evolução da doença muito distintos.

1.1.1 Tumores de mama do subtipo ductal invasivo HER2+

HER2 é uma proteína codificada pelo proto-oncogene *HER2 (ERBB2/C- ou ERBB2/NEU)*, que se localiza em um bloco genômico de cerca de 30 mil bases, no cromossomo 17. Esta proteína é um receptor do tipo tirosina quinase (RTK), membro da família dos receptores de crescimento epidermal (EGFR), que compreende: HER1 (EGFR), HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4) (ANDRÉ et al. 2005; POLANOVSK; LEBEDENKO; DEYEV, 2012). Todos os membros da família possuem um domínio extracelular de ligação, uma única região transmembrana e um domínio citoplasmático tirosina quinase (HYNES; LANE, 2005). HER2 forma heterodímeros com os outros três membros da família EGFR, compondo diferentes complexos que levam à fosforilação cruzada nos resíduos de tirosina, ativando cascatas de transdução de sinal e ativação de várias vias de sinalização. As principais vias ativadas pela heterodimerização de ERBB2 e ERBB3, são as de MAPK, PI3K/Akt e mTOR, (HYNES; MACDONALD, 2009; POLANOVSK; LEBEDENKO; DEYEV, 2012).

Os tumores HER2+, compreendem cerca de 15-30% de todos os tumores de mama, ou 20-25% dos tumores invasivos. Sua amplificação ou superexpressão em tumores de mama invasivos contribui consideravelmente para sua transformação maligna, pois pacientes com este subtipo tumoral têm o dobro de taxa de mortalidade, quando comparados com aqueles sem a superexpressão deste oncogene (MOASSER, 2007; ROSS et al., 2003; SLAMON et al., 1987). Assim, os tumores de mama HER2+ estão entre os mais agressivos e de pior prognóstico quando não tratados adequadamente (SLAMON et al., 1987).

HER2 é importante na biologia do câncer de mama. Um exemplo está nas consequências de sua transfecção na linhagem celular MCF7 (que expressa ER), que tem como consequência um aumento na proliferação celular, maior potencial de invasão e um potencial metastático elevado (ROSS et al., 2003). Além disto, existe uma correlação entre o comportamento agressivo das linhagens celulares HER2+ e a observação clínica de tumores HER2+, que são associados com um pior prognóstico na ausência de terapia (MOASSER, 2007).

Existem duas principais classes de inibidores de HER2: anticorpos monoclonais simples e conjugados que se ligam diretamente no domínio extracelular de HER2 e inibidores de tirosina quinase que competem com o ATP (adenosina trifosfato de potássio) no domínio tirosina quinase do receptor (HYNES; LANE, 2005).

Tumores HER2+ tem forte indicação clínica para o uso de trastuzumabe (tzb-anticorpo monoclonal recombinante humanizado anti-HER2) em estágios precoces ou metastáticos do câncer de mama (WOLFF et al., 2007). A terapia adjuvante com tzb, testada em cinco estudos prospectivos randomizados, mostrou que o tratamento reduziu o risco de recorrência em 50% e diminuiu em 30% o risco de morte em pacientes com tumores HER2+ (IZUMI et al., 2002; ROMOND et al., 2005; PICCART-GEBHART et al., 2005). No entanto, nem todos os tumores HER2+ respondem ao tratamento com tzb, e alguns mecanismos de resistência à droga já foram demonstrados *in vitro*, tais como: a deficiência de PTEN (PANDOLFI, 2004); a superexpressão de outros receptores de superfície, como o receptor do fator de crescimento similar a insulina (IGFR) (LU et al., 2001); o perfil de tumores basais HER2+ (HARRIS et al., 2007); ou a presença de mucina 4 (MUC4) na superfície celular (MOASSER, 2007). Na ocorrência de metástases apenas um terço das pacientes que superexpressam HER2 respondem a tzb. Muitas pacientes tratadas com drogas anti-HER2 vão desenvolver resistência ao tratamento, apesar de terem apresentado uma resposta positiva no início da terapia. Da mesma forma, a maioria das pacientes com doença metastática com boa resposta inicial anti-HER2, mostra progressão da doença em apenas um ano após o início do

tratamento. A terapia do tzb em combinação com paclitaxel (SEIDMAN et al., 2001) ou docetaxel (SLAMON et al., 2001) pode aumentar a resposta ao tratamento, tempo de progressão da doença e sobrevida quando comparado com a monoterapia do tzb (NAHTA; ESTEVA, 2006).

Deste modo, a resistência à droga e a ocorrência de metástases tumorais representam os principais obstáculos para o sucesso do tratamento deste tipo de câncer (VOGEL, 2002). Por isso, a estratégia da combinação com outras drogas em um mesmo tratamento com tzb geralmente é adotada (HYNES; LANE, 2005).

Estudos recentes sugerem que a resistência clínica ao tzb e a outras terapias que têm como alvo o receptor HER2, é devida à presença das chamadas células iniciadoras de tumores, também conhecidas como células-tronco tumorais (CSCs) em tumores HER2+ (revisado por BEDARD; CARDOSO; PICCART-GEBHART, 2009). Alguns possíveis mecanismos de resistência ao tzb envolvem muitos dos mesmos marcadores que têm sido descritos na biologia de células-tronco tumorais. A perda ou bloqueio do sítio de ligação do tzb no domínio extracelular de HER2 parece estar relacionada à expressão aumentada do marcador de célula-tronco CD44 (revisado por BEDARD; CARDOSO; PICCART-GEBHART, 2009). Outro mecanismo de resistência é a ativação da sinalização via NOTCH, que leva ao aumento da capacidade de auto-renovação/proliferação de células progenitoras, tanto *in vivo* como *in vitro*, (ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS et al., 2006) ou à indução da transição epitélio-mesênquima (EMT) (revisado por BEDARD; CARDOSO; PICCART-GEBHART, 2009).

1.2 Células-tronco tumorais (CSCs)

O conceito de que o câncer surge a partir de células-tronco ou "células germinativas" foi primeiramente proposto há 150 anos (GINESTIER et al., 2007), mas apenas recentemente os avanços no conhecimento da biologia destas células permitiram o desenvolvimento de abordagens experimentais necessária para uma maior investigação desta hipótese (REYA et al., 2001; SELL, 2004).

De acordo com os modelos clássicos de carcinogênese, os eventos que resultam na geração de um tumor podem ocorrer em qualquer célula. Nesse modelo a desregulação que leva ao crescimento exacerbado dos tumores é atribuída a uma série de alterações genéticas sequenciais e cumulativas, que resultam na ativação de genes responsáveis pela proliferação celular e no silenciamento de genes que inibem a proliferação e a morte celular (ISAAC,

1993; LOWE; LIN, 2000). Porém, de acordo com a hipótese das células-tronco tumorais (CSC), os alvos preferenciais da transformação oncogênica devem ser as células-tronco, ou células progenitoras em um nível precoce de diferenciação (BONNET; DICK, 1997; GLINSKY, 2007; JAISWAL et al., 2003, KRIVTSOV et al., 2006). Neste modelo, os tumores contêm populações celulares heterogêneas, incluindo um pequeno subgrupo distinto de células, formado pelas CSCs, as quais possuem a habilidade de iniciar e manter o crescimento tumoral, além de promover o surgimento de metástases (AL-HAJJ; CLARKE, 2004; CREIGHTON et al., 2009; LI et al., 2008; NICOLINI et al., 2011; PHILLIPS et al., 2006; VAN RHENEN et al., 2005). Importantes evidências sugerem que as CSCs sejam responsáveis pela progressão e pela recorrência tumoral (CLARKE; FULLER, 2006; LYNCH; CARIATI; PURUSHOTHAM, 2006; POLYAK et al., 2006; WEISSMAN et al., 2005; WICHA et al., 2006), além de serem muito importantes em fases posteriores nas quais ocorrem resistência à terapêutica (AL-EJEH et al., 2011; FRAME; MAITLAND, 2011; HU; FU; 2012; LI et al., 2008; LIU; WICHA, 2010).

De acordo com a hipótese de CSCs, tumores são originados a partir mutações em células-tronco ou células progenitoras normais, as quais levam a uma alteração dos genes que regulam o processo normal de auto-renovação (MOLOFSKY; PARDAL; MORRISON, 2004; PASSEGUÉ et al., 2003). Algumas das vias controladas por estes genes incluem: Bmi-1, Notch, Wnt e Sonic Hedgehog (AUSTIN et al., 1997; BHARDWAJ et al., 2001; LIU et al., 2006; SPINK; POLAKIS; WEIS, 2000; TAIPALE; BEACHY et al., 2001). Dois argumentos básicos sustentam a hipótese de que células-tronco tumorais se originam a partir de células-tronco normais. Primeiro, considerando que o desenvolvimento tumoral é o resultado do acúmulo de alterações genéticas sequenciais e progressivas, células-tronco adultas seriam alvos ideais para a transformação maligna inicial devido a sua meia-vida ser muito mais longa em comparação com células diferenciadas (VERMEULEN et al., 2008). Além disto, CSCs compartilham propriedades com células-tronco normais, tais como a capacidade de auto-renovação e de diferenciação (BIXBY et al., 2002; PONTI et al., 2005; VERMEULEN et al., 2008). Auto-renovação é o processo pelo qual células-tronco geram progenitores idênticos a elas mesmas, uma propriedade que pode levar à tumorigenicidade, recorrência e metástase (REYA et al., 2001). As células-tronco também se diferenciam para gerar progenitores multipotentes, os quais por sua vez, dão origem a progenitores comprometidos e células diferenciadas. Nas CSCs essa propriedade leva à heterogeneidade populacional de células tumorais, uma característica de quase todos os tipos de câncer (AL-HAJJ; CLARKE, 2004). Deste modo, as células diferenciadas que constituem a massa tumoral, não devem ser

tumorigênicas, pois não possuem capacidade de auto-renovação e apresentam potencial limitado de proliferação (DEAN; FOJO; BATES, 2005; PARDAL; CLARKE; MORRISON, 2003; REYA et al., 2001).

Evidências experimentais que deram suporte à hipótese de CSCs surgiram pela primeira vez em 1997 (BONNET; DICK, 1997) quando foi demonstrado que leucemias humanas são geradas a partir de uma pequena população de células-tronco leucêmicas capazes de reproduzir a doença em camundongos NOD/SCID (BONNET; DICK, 1997). Estas evidências também foram encontradas em tumores sólidos (AL-HAJJ et al. 2003), quando foi demonstrado que tumores de mama humanos possuem uma subpopulação celular com propriedades de células-tronco. O câncer de mama foi o primeiro carcinoma humano a partir do qual uma subpopulação de células-tronco foi isolada (AL-HAJJ et al., 2003). Originalmente esta população foi caracterizada pela alta expressão de CD44, além de uma expressão baixa ou indetectável de CD24 ($CD44^{+}CD24^{-/baixa}$). De modo relevante, estas células se mostraram altamente tumorigênicas quando injetadas em camundongos imunodeficientes NOD/SCID.

Alguns trabalhos sugerem que genes associados às células-tronco incluindo *LIN28*, *OCT4,* e *NANOG* podem ter um papel crítico na regulação de CSCs de alguns tumores, tais como câncer de ovário (KWON; SHIN, 2013; PENG; MAIHLE; HUANG, 2010). Pesquisas envolvendo células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), suportam a hipótese de que células-tronco são originadas a partir de mecanismos de reprogramação (KRIZHANOVSKY; LOWE, 2009). Esse processo ocorreria através da expressão de um grupo de genes, então chamados de "fatores de reprogramação", células somáticas diferenciadas poderiam ser convertidas em iPS que possuiriam a mesma capacidade de células-tronco embrionárias de dar origem a todos os tipos de tecidos do corpo (YANG et al., 2010). Interessantemente, a maioria desses fatores de reprogramação são superexpressos em certos tipos de tumores humanos e, pelo menos alguns deles, tais como, *cMYC, KLF4, SOX2 e LIN28*, são estabelecidos como oncogenes (KRIZHANOVSKY; LOWE, 2009). Alguns estudos associam células-tronco tumorais com tais fatores de reprogramação.

A partir de marcadores de superfície característicos, CSCs também têm sido identificadas e isoladas de outros tumores como leucemia mielóide aguda (BONNET; DICK, 1997, HOPE et al., 2004), leucemia mielóide crônica (EISTERER et al., 2005; HOPE et al., 2004), câncer ósseo (GIBBS et al., 2005), câncer cerebral (SINGH et al., 2004a; SINGH et al., 2004b), câncer de próstata (COLLINS et al., 2005), melanoma (FANG et al., 2005), mieloma múltiplo (MATSUI et al., 2004), câncer de cólon (O'BRIEN et al., 2007; RICCI-

VITIANI et al., 2007), câncer de pâncreas (LI et al., 2007) e câncer de cabeça e pescoço (PRINCE et al., 2007), entre outros.

A resistência à quimioterapia e à radioterapia podem ser devidas à baixa taxa de multiplicação celular, o que também é uma característica que permite distinguir as CSCs de câncer de mama dos outros tipos celulares deste tumor (AL-HAJJ, 2007). As CSCs de tumores de mama também são mais resistentes à radioterapia por possuirem uma maquinaria de reparo de DNA mais eficiente. Da mesma maneira a quimioterapia parece selecionar as CSCs de carcinomas de mama, que resistem ao tratamento (AL-HAJJ, 2007).

Evidências recentes mostram que a tumorigênese, a invasão tumoral e a formação de metástases mediada por HER2 podem ser atribuídas às CSCs presentes em tumores de mama HER2+ (KORKAYA et al., 2008). Korkaya et al. (2008) demonstraram que HER2 regula a população de CSC e de progenitores, levando à tumorigênese e invasão**.** Foi demonstrado que o tzb reduz a população de CSCs tanto *in vivo* como *in vitro* (CHAKRABARTY et al., 2013), além de reduzir a capacidade de formação de estruturas celulares esferoidais com características de células-tronco, conhecidas como mamosferas (KANG et al., 2011). De maneira contrária, a alta expressão de HER2 aumenta a capacidade de formação de mamosferas e também o seu tamanho (KORKAYA et al., 2008).

Em trabalho publicado em 2007, Farnie et al. demonstraram que amostras derivadas de carcinomas de mama ductal *in situ* (DCIS) HER2+ possuem uma maior eficiência de formação de mamosferas (MFE), quando comparadas com amostras DCIS HER2- (**Figura 1**). A adição do fator de crescimento epidermal (EGF) foi testada e não alterou a MFE de nenhum dos grupos. No entanto, o uso de gefitinib (inibidor de tirosina quinase de EGFR) foi capaz de reduzir o crescimento das mamosferas HER2+ na ausência de EGF, sugerindo que a droga inibe preferencialmente a atividade de tirosina quinase do heterodímero formado por EGFR/HER2 (FARNIE et al., 2007). Em outro estudo, algumas linhagens celulares tumorais de mama que superexpressam HER2 também possuíam um número maior de CSCs; quando estas células foram injetadas em camundongos, elas se mostraram mais tumorigênicas (MAGNIFICO et al., 2009; ROESLER et al., 2010).

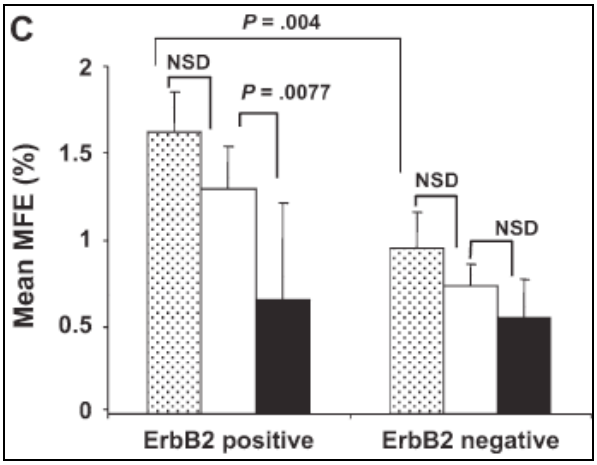

Figura 1 – Eficiência de formação de mamosferas em função de HER2. Amostras HER2+ e HER2- na presença de meio completo para mamosferas contendo EGF (barras pontilhadas), meio sem adição de EGF (barra clara), ou meio completo sem EGF contendo 1μM de gefitinib (barra preta). As barras de erro correspondem a 95% dos intervalos de confiança. Após a correção de Bonferroni, apenas P-valores <0,0083 foram considerados estatisticamente significantes. NSD: sem significância estatística. Fonte: Farnie et al. (2007).

Outro dado interessante é que linhagens celulares de câncer de mama que possuem características de células-tronco, como a formação de mamosferas, possuem alta expressão de HER2 e são mais sensíveis ao tratamento com tzb e lapatinib (droga que inibe a atividade de tirosina-quinase de EGFR e HER2) (ROESLER et al., 2010). Estes resultados sugerem fortemente que as terapias utilizadas no tratamento de tumores de mama HER2+ devam considerar os efeitos da inibição de HER2 na subpopulação de células-tronco presente no tumor. Dados recentes sugerem que em alguns casos a resistência ao tratamento com tzb e a outras terapias que possuem HER2 como alvo pode ser devido à presença de subpopulações de células-tronco nos tumores HER2+. De fato, vários mecanismos possíveis de resistência a tzb também envolvem proteínas características de células-tronco, como no caso da superexpressão do marcador CD44, capaz de bloquear a ligação de tzb ao domínio extracelular de HER2 (PÁLYI-KREKK et al., 2007). Desta forma, é importante determinar a sensibilidade das subpopulações de células-tronco presentes nos tumores HER2+ frente aos tratamentos a serem empregados, assim como é importante a descoberta de novas drogas que permitam estratégias de tratamento alternativas no caso de relapso da doença, cuja fonte são as CSCs.

Estudos recentes mostraram evidências que sustentam a hipótese de que CSCs possuem fenótipo definido pela célula de origem (sendo estas células-tronco ou células progenitoras em nível precoce de diferenciação) e pelos eventos oncogênicos que contribuíram para a sua transformação (JAMIESON et al., 2004; KELLY et al., 2002).

1.3 Seleção de CSCs

Uma estratégia para encontrar marcadores de células-tronco normais compartilhados com as CSCs é focar o estudo nas funções conservadas de células-tronco e progenitores, já que esses marcadores de função podem estar mantidos nas CSCs. Um marcador candidato que se encaixa nessa descrição é a enzima de detoxificação aldeído desidrogenase 1 (ALDH1).

As aldeído desidrogenases (ALDH) são enzimas que catalisam a oxidação nucleotídeo-dependente (dependente de NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo) mediada por piridina (núcleo estrutural e ativo do NAD), de uma variedade de substratos aldeídos para os seus correspondentes ácidos carboxílicos (DUESTER, 2000; MAGNI et al., 1996; SOPHOS; VASILIOU, 2003; YOSHIDA et al., 1998). Aldeídos são compostos endógenos formados a partir do metabolismo de álcool, vitaminas e aminoácidos, bem como através do metabolismo de compostos exógenos, tais como certas drogas terapêuticas e toxinas ambientais. Enzimas ALDH são necessárias para que os aldeídos possam manter a homeostase e o crescimento celular normal, bem como permitir que as células se adaptem a um ambiente de estresse. Até hoje já foram descritos 19 membros da superfamília de ALDH (MARCHITTI et al., 2008; SLÁDEK, 2003). Duas das isoenzimas humanas mais estudadas são as ALDH1 (ou ALDH1A1) e ALDH2. ALDH1 tem como função principal a oxidação do retinol (vitamina A) em ácido retinóico (CHUTE et al., 2006) que tem um papel crucial na homeostase fisiológica de muitos órgãos e no desenvolvimento normal durante a embriogênese humana (EVANS, 1988; LABRECQUE; BHAT; LACROIX, 1993). ALDH1 é predominantemente expressa no epitélio de testículo, cérebro, olhos, rins e também está altamente expressa em células-tronco/progenitoras hematopoiéticas e neurais humanas e de murinos (ARMSTRONG et al., 2004; CHUTE et al., 2006; HESS et al., 2004; HESS et al., 2006; MARCHITTI et al., 2008; MATSUI et al., 2004). Seu papel nestas células está relacionado com a diferenciação celular via oxidação do retinol em ácido retinóico (COLLINS, 2008). O ácido retinóico ativa receptores de ácidos retinóicos (RARs), que são uma família de fatores de transcrição nuclear dependente de ligante, que regulam a transcrição de genes contendo elementos responsivos ao ácido retinóico (SO; CROWE, 2000).

ALDH1 também possui um papel na detoxificação de certos agentes alquilantes terapêuticos, como a ciclofosfamida e a ifosfamida (SAHOVIC et al., 1988) e, portanto, parece contribuir com as propriedades inatas de resistência à radiação e detoxificação das células-tronco normais (DEAN, FOJO; BATES, 2005). Células tumorais com altos níveis de ALDH1 são resistentes ao efeito citotóxico desses agentes alquilantes citados (DUELLMAN

et al., 2013). Várias isoformas de ALDH, incluindo ALDH1, são também altamente expressas em células-tronco, CSCs e células do cordão umbilical, quando comparadas com tipos celulares diferenciados (ALISON et al., 2010; BALBER, 2011; D'ANGELO; WICHA, 2010; GENTRY et al., 2007; GINESTIER et al., 2007; JIANG et al., 2009; MA; ALLAN, 2011; MOREB, 2008).

A atividade da ALDH1 é avaliada em ensaios *in vitro*, como o *Aldefluor*® e o *Aldecount*® (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Este último é aprovado para diagnóstico pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso na detecção, quantificação e monitoramento de células-tronco/progenitoras do sangue periférico, cordão umbilical e de medula óssea. Utilizando o kit *Aldefluor*®, Ginestier et al. (2007) mostraram que células aldefluor+ de câncer de mama são altamente tumorigênicas e possuem propriedades de CSCs de auto-renovação e diferenciação. Dessa forma a ALDH1 é um marcador de células-tronco humanas normais e tumorais de mama, sendo considerado um marcador de pior prognóstico nestes tumores (GINESTIER et al., 2007). A atividade aumentada de ALDH foi encontrada também em populações de CSCs de mieloma múltiplo e leucemia mielóide aguda (MATSUI et al., 2004; PEARCE et al., 2005).

Foi observado que a população de células $ALDH^+$ estava aumentada em tumores de mama com alta expressão de HER2 (KORKAYA et al., 2008; MAGNIFICO et al., 2009; LI et al., 2008). Sendo que os níveis de ALDH se mostraram diretamente relacionados com alguns parâmetros clínicos, incluindo a maior expressão de HER2 (MORIMOTO et al., 2009). Desta maneira, a expressão de ALDH pode ser uma importante ferramenta de prognóstico para o câncer de mama, além de ser um marcador útil para o isolamento de CSCs.

1.4 Linhagens celulares no estudo de CSCs

Linhagens celulares representam populações policlonais de células que se adaptaram às condições em cultura, mas retiveram muitas de suas propriedades fenotípicas e genotípicas ao longo de diversas passagens. Alguns estudos demonstraram que linhagens celulares imortalizadas provenientes de camundongos e de humanos contêm populações celulares distintas, incluindo células com propriedades de células-tronco (CHRISTGEN et al., 2007; FILLMORE; KUPERWASSER, 2008; KONDO; SETOGUCHI; TAGA, 2004; SETOGUCHI et al., 2004). Desta forma, o uso de linhagens celulares de mama viabiliza o estudo destas CSCs, pois virtualmente não existe limite na obtenção destas células *in vitro*, ao contrário do uso de amostras derivadas de tumores primários.

As CSCs de câncer de mama e as células progenitoras tumorais podem ser isoladas *in vitro* quando crescidas em suspensão, sob condições que não permitam sua diferenciação e evitem sua morte por apoptose. Estas células crescem em estruturas esferóides clonais em 3D, chamadas mamosferas, e tendem a expressar marcadores de células-tronco como *OCT4* e *BMI* (KORKAYA et al., 2008).

1.5 O cultivo de células-tronco em condições não-aderentes

O crescimento clonal em cultura não-aderente foi originalmente utilizado para testar a capacidade de auto-renovação em culturas de células neurais (REYNOLDS; WEISS, 1996). Culturas em suspensão favorecem a formação das, então chamadas, neurosferas que eram constituídas de 4–20% de células-tronco. Essa técnica foi adotada para células de mama humanas por Dontu et al. em 2002 (DONTU et al., 2003).

A primeira descrição do cultivo de células-tronco e progenitoras de mama envolveu células não-tumorais derivadas de mamoplastias de redução que foram dissociadas mecânica e enzimaticamente gerando suspensões de células epiteliais mamárias únicas, quebrando desta forma, o dogma de que células epiteliais precisam estar ancoradas para crescer. As mamosferas são altamente enriquecidas em células indiferenciadas, como demonstrado pela capacidade das células-únicas de gerarem outras linhagens quando cultivadas sob condições apropriadas, na presença de alguns fatores de crescimento (DONTU et al., 2003). Enquanto que cerca de 8% das células isoladas de cultivo primário de tecido mamário são compostas por células progenitoras de multi-linhagens, este percentual sobe para 68% no cultivo de mamosferas primárias e chega a virtualmente 100% das células de segunda passagem ou passagens posteriores (DONTU et al., 2003). A frequência de formação das esferas permanece a mesma com as passagens, sugerindo que as células iniciadoras de esferas podem ser mesmo células-tronco. Além disso, a frequência de células capazes de produzir estruturas do complexo ducto-ácino em culturas de matrigel tridimensionais foi a mesma das células iniciadoras de esferas (DONTU et al., 2003).

Mamosferas também foram eficientemente produzidas a partir de células epiteliais de pacientes com DCIS. Estes tumores possuem uma pequena fração de células com capacidade de formar mamosferas, o que sugere a presença de CSCs. Das 29 amostras das lesões colocadas em cultura, 69% foram capazes de formar mamosferas e estas estruturas foram passadas em cultura repetidamente, indicando sua capacidade de auto-renovação (FARNIE et al., 2007). Quando comparadas com células de tecido normal de mama, os DCIS possuem

capacidade 3x maior de formar mamosferas (0,5% versus 1,5%) (FARNIE et al., 2007). Mamosferas derivadas de tumores também possuíam maior capacidade de auto-renovação, pois foram capazes de produzir novas gerações de células com razão de regeneração superior à das células normais (FARNIE et al., 2007). Tumores com graus histológicos mais avançados geraram mais mamosferas, sugerindo maior presença de células-tronco nos mesmos (FARNIE et al., 2007).

1.6 miRNAs em células-tronco tumorais de tumores de mama

As células-tronco são controladas por sinais extrínsecos, derivados principalmente de seu nicho regular (MESHORER et al., 2006; XI; XIE, 2005) e também por fatores intrínsecos como a expressão de alguns microRNAs (miRNAs ou miRs) (HOUBAVIY; MURRAY; SHARP, 2003; SUH et al., 2004), pequenos RNAs que interagem de maneira sequência-específica com mRNAs ou outros RNAs-alvo) e são capazes de suprimi-los pós-transcricionalmente. Independentemente do seu modo de ação os miRNAs afetam diretamente a quantidade de proteína produzida atuando de modo marcante na fisiologia celular. Já que um único miRNA pode interagir com centenas (600 a 800) de mRNAs, e hoje mais de 2 mil miRNAs humanos maduros já foram descritos (MIRBASE, 2012), é possível afirmar que os miRNAs talvez sejam a mais importante e mais ampla classe de reguladores negativos do genoma humano (BARTEL, 2004). Como alguns miRNAs regulam a diferenciação celular e podem funcionar como supressores tumorais ou como oncogenes (LU et al., 2005), a sua expressão desregulada é uma característica comum de tumores sólidos e hematopoiéticos (CALIN et al., 2002; RUVKUN, 2006).

Estudos demonstraram a importância e o potencial de miRNAs como biomarcadores em câncer de mama (revisto em ANDORFER et al., 2011). Alguns destes trabalhos mostraram a contribuição dos miRNAs na invasão e metástase (HUANG et al., 2008; IORIO et al., 2005; MA; TERUYA-FELDSTEIN; WEINBERG, 2007; VALASTYAN et al., 2009), na EMT (BRACKEN et al., 2009; GREGORY et al., 2008) e na manutenção das células-tronco tumorais (SHIMONO et al., 2009). Em estudo recente, Gong et al, (2011) mostraram que miR-21 encontra-se superexpresso em tumores de mama HER2+ que se tornam resistentes ao tratamento com tzb e que esta resistência ocorre pela inibição da expressão de PTEN por miR-21. A restauração da expressão de PTEN nas células resistentes a tzb restaura a sensibilidade destas células ao tratamento com esta droga. De maneira contrária, células sensíveis ao tratamento com tzb se tornam resistentes ao tratamento quando o miR-21 é

superexpresso ectopicamente. A superexpressão de miR-21, e por consequência o bloqueio da expressão da proteína PTEN, também está associada à pior resposta ao tratamento com tzb em pacientes com câncer de mama (GONG et al., 2011). Este estudo mostra a importância do efeito de um desequilíbrio na expressão de miRNAs, que pode levar entre outras consequências, a uma pior resposta ao tratamento (GONG et al., 2011).

Alguns estudos mostraram que os miRs -221 e -222 estão altamente expressos em tumores de mama (ZHAO et al., 2008). Já foi descrito que estes miRNAs reprimem a expressão de $p27^{Kip1}$, p57 e do receptor de c-Kit, o que promove a proliferação e sobrevivência celular e inibe a sua diferenciação (FELLI et al., 2005; FELICETTI et al., 2008; GALARDI et al., 2007; LE SAGE et al., 2007; MEDINA et al., 2008; VISONE et al., 2007). Os miRs -221 e -222 regulam pós-transcricionalmente a expressão de ER e a deleção de ambos miRNAs nas células MDA-MB-468 levou à reconstituição da expressão de ER, tornando estas células sensíveis ao tratamento com tamoxifeno (ZHAO et al., 2008). De maneira oposta, quando os miRs -221 e -222 foram superexpressos nas células tumorais de mama MCF-7 e T47D, os níveis de expressão protéica de ER diminuíram e as células se tornaram resistentes ao tratamento com tamoxifeno (ZHAO et al., 2008). Apesar de os miRs -221 e 222 possuírem a mesma sequência de 8 nucleotídeos que determina o reconhecimento do alvo (*seed-sequence*) e ambos regularem a expressão de um grupo comum de genes (incluindo p27, p57, c-Kit e ER), o efeito da deleção de ambos miRNAs é mais significante do que a deleção de apenas um deles (ZHAO et al., 2008). Isso sugere a ocorrência de um efeito aditivo ou ainda que, quando atuando em conjunto, os miRs -221 e -222 possam exercer uma atividade regulatória em rede, que ainda não foi descrita (ZHAO et al., 2008).

Trabalhos anteriores descreveram que alguns miRNAs são diferentemente expressos em células-tronco, sugerindo um papel especializado na regulação dessas células (HOUBAVIY; MURRAY; SHARP, 2003; SUH et al., 2004). Seguindo este raciocínio, os miRNAs-221 e 222 podem ter um papel importante na biologia de CSCs de mama. Além disso, como os tumores HER2+ são enriquecidos em CSCs, é possível especular que os miRNAs -221 e -222 possam estar superexpressos e tenham um papel na agressividade e no prognóstico destes tumores.

Comumente, tumores HER2+ possuem amplificação do *locus* 17q21. Além de diversos genes de importância, nesta região genômica foram encontrados 5 *miRNA-loops* (miRs -4726, -4727, -296m, -4728 e -4734). Interessantemente, um destes miRNAs (miR-4728) se localiza dentro de um dos introns de *HER2* (PERSSON et al., 2011). Ambos os miRNAs maduros codificados por este miRNA, miR-4728-3p e miR-4728-5p foram

encontrados associados com a proteína Argonauta-2, que é responsável pela clivagem dos mRNAs-alvo de miRNAs e siRNAs (PERSSON et al., 2011). A avaliação da expressão destes miRNAs em algumas linhagens celulares que possuem amplificação de HER2 (BT-474, JIMT-1 e SKBR3) e duas linhagens-controle que não expressam HER2 (MCF-7 e MCF10A) mostrou que miR-4728-3p estava superexpresso apenas nas linhagens HER2+ (PERSSON et al., 2011). Este miRNA está localizado logo antes do quinto sítio de *splicing* do exon 24 de *HER2*, mostrando que seu processamento depende do *splicing* do próprio gene *HER2*. O transcrito de HER2 que contém o exon 24 também estava superexpresso nas mesmas linhagens HER2+ (PERSSON et al., 2011). Tumores derivados de pacientes com câncer de mama que superexpressam HER2 foram avaliados e mostraram que 66% dos 6 tumores avaliados superexpressavam ambos miR-4728-3p e o exon 24 de *HER2* (PERSSON et al., 2011). Uma significativa expressão deste miRNA foi também observada em dados de nosso grupo, utilizando sequenciamento em larga-escala de 25 amostras de câncer de mama HER2+ (BRANCO et al., em preparação). Esses dados demonstram um papel complementar da expressão do gene *HER2* em tumores de mama e sugerem a importância de miR-4728-3p na biologia destes tumores (PERSSON et al., 2011). Deste modo, já que tumores HER2+ mais agressivos possuem mais células-tronco tumorais e como o miR-4728-3p se encontra superexpresso em linhagens celulares que superexpressam *HER2*, é importante investigar o nível de expressão deste miRNA nas CSCs, assim como é importante a identificação dos genes-alvo regulados por miR-4728-3p.

Neste trabalho buscou-se contribuir para um melhor entendimento da biologia das células-tronco tumorais presentes em tumores de mama HER2+ tendo como foco o estudo do papel de expressões de alguns miRNAs nessas células. Os resultados previstos poderão contribuir futuramente com o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, determinação de prognóstico e até mesmo com o desenvolvimento de novas drogas que atuem especificamente na subpopulação de células-tronco tumorais presentes em tumores HER2+.

3.4 Conclusões

3.4.1 Capítulo I

- A geração de mamosferas a partir da linhagem celular MCF-7 e de amostras de pacientes foi bem sucedida. Mamosferas derivadas da linhagem MCF-7 mostraram-se maiores e eram constituídas por células bem aderidas entre si. Mamosferas obtidas a partir de tumores eram constituídas de células $CD44^+/CD24^-$ e se mostraram menores e constituídas de células menos aderidas entre si, o que pode sugerir um perfil basal ou de EMT nessas células;
- A expressão de marcadores de pluripotência de células-tronco embrionárias *SOX2*, *NANOG* e *OCT4* em mamosferas derivadas tanto da linhagem MCF-7 quanto de células derivadas de tumores primários das pacientes mostrou-se elevada, o que sugere um enriquecimento de CSCs pluripotentes nas mamosferas provenientes desses tipos celulares;
- As frações celulares separadas de $CD44^+$ e $CD24^-$ da linhagem MCF-7 foi maior em mamosferas do que em células aderentes, o que pode sugerir um enriquecimento de CSCs com o fenótipo $CD44^+/CD24^-$ em mamosferas dessa linhagem;
- Para todas as amostras estudadas, a expressão de miR-221 e miR-222 encontrava-se aumentada quando células aderentes foram comparadas a mamosferas, o que reforça o papel destes miRNAs na regulação de CSCs;
- Células MCF-7 apresentaram maior eficiência na formação de mamosferas após a indução confirmada da superexpressão de miR-221 e miR-222, o que sugere um possível papel desses miRNAs na biologia de CSCs;
- Células MCF-7 apresentaram maior resistência à morte celular quando tratadas com paclitaxel após a indução da superexpressão de miR-222, sugerindo um papel desse miRNA na regulação de morte celular de CSCs.

3.4.2 Capítulo II

- Mamosferas foram obtidas a partir de células das linhagens MCF-7, BT-474 e SKBR3. Mamosferas maiores e em maior quantidade foram formadas a partir de BT-474, seguida por MCF-7 e SKBR3;

- Mamosferas obtidas a partir de células da linhagem MCF-7, sem amplificação de *HER2*, apresentaram pelo menos o dobro de expressão de HER2 em todas as 4 gerações. Este fato reforça a importância de HER2 na biologia de CSCs e sua possível relevância no tratamento de pacientes que não sejam HER2+;
- O estudo do perfil de expressão de cinco marcadores de pluripotência de células-tronco embrionárias (*SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, *KLF4* e *LIN28*) nas três linhagens de mama mostrou expressão elevada de *SOX2*, *NANOG*, *OCT4* nas culturas de mamosferas da linhagem MCF-7 quando comparadas com as células aderentes em concordância com o capítulo I. Os demais aumentos foram pontuais, o que sugere que estes não são marcadores universais para CSCs de linhagens de mama;
- O fenótipo $CD44^{+}/CD24^{-/baixo}$ estava presente em uma pequena fração das células de mamosferas das três linhagens estudadas, o que sugere que esse fenótipo não seja o mais adequado para CSCs destas mamosferas;
- O perfil de expressão dos miRNAs em células aderentes e de mamosferas da linhagem MCF-7 e linhagens HER2+, BT-474 e SKBR3 mostra que existe uma variabilidade na expressão endógena dos miRNAs ao longo dos tempos de cultivo. Isso sugere a necessidade do estudo mais aprofundado desses miRNAs na biologia de CSCs;
- Mamosferas de todas as linhagens apresentaram um enriquecimento de células $ALDH1^{+}$ quando comparadas com as células aderentes. Este achado sugere que essas mamosferas podem estar enriquecidas de CSCs e que ALDH1 pode ser um marcador útil no estudo de CSCs derivadas das linhagens MCF-7, BT-474 e SKBR3;
- A superexpressão dos miRNAs aqui estudados foi bem sucedida. A expressão elevada de miR-4728-3p levou a um aumento das subpopulações $ALDH1^{+}$ nas linhagens MCF-7 e SKBR3. Para as células SKBR3 e BT-474 a superexpressão de miR-222 resultou em uma diminuição das frações $ALDH1^{+}$. Em conjunto os resultados reforçam o envolvimento destes miRNAs na regulação da produção de CSCs ALDH1+.

3.5 Perspectivas futuras

O estudo da biologia e do papel de CSCs em câncer de mama é um aspecto extremamente atual e relevante. A heterogeneidade tumoral aparece como um fator de grande importância no manejo clínico das pacientes e a classificação das mesmas em diferentes sub-tipos pode mudar durante a evolução clínica. Trabalhos recentes consolidam o conceito de que o *status* de HER2 apresenta relevante variação entre componentes diversos de um tumor, incluindo não apenas variações no próprio tumor primário, mas também em células tumorais circulantes e micrometástases ocultas ao diagnóstico. Deste modo, não apenas as CSCs têm um papel cada vez mais claro no estabelecimento de metástases à distância, como HER2 tem sua importância ainda mais reconhecida para o tratamento de um grupo mais amplo de pacientes.

Neste contexto, além dos resultados apresentados nas páginas anteriores, este trabalho gerou uma grande quantidade de reagentes que serão fundamentais para a continuidade dos estudos que buscam relacionar HER2, CSCs e os miRNAs aqui estudados. Deste modo, as perspectivas futuras desta linha de pesquisa incluem:

- Realizacão de ensaios funcionais (proliferação, resistência à apoptose e migração/invasão) com as células $ALDH^+$ obtidas a partir das linhagens MCF-7, BT-474 e SKBR3 que superexpressam miR-221, -222, -4728-3p;
- O *knockdown* dos miRNAs -221, -222, -4728-3p nessas mesmas linhagens já foi realizado (dados não apresentados), portanto a próxima etapa envolve a análise e isolamento das frações $ALDH^+$ em células com expressão diminuída desses mesmos miRNAs;
- Realização de ensaios funcionais (proliferação, resistência à apoptose e migração/invasão) envolvendo células com expressão diminuída (referidas acima);
- Identificação dos genes-alvo regulados pelos miRNAs através de sequenciamento em larga-escala após a superexpressão ou a redução da expressão de miR-221, -222, -4728-3p nas células de interesse .

REFERÊNCIAS*

AL-EJEH, F. et al. Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities. **Carcinogenesis,** v. 32, n. 5, p. 650-658, 2011.

AL-HAJJ, M. Cancer stem cells and oncology therapeutics. **Curr. Opin. Oncol.,** v. 19, n. 1, p. 61-64, 2007.

AL-HAJJ, M.; CLARKE, M. F. Self-renewal and solid tumor stem cells. **Oncogene,** v. 23, n. 43, p. 7274-7282, 2004.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 2003.

ALISON, M. R. et al. Finding cancer stem cells: are aldehyde dehydrogenases fit for purpose? **J. Pathol.,** v. 222, n. 4, p. 335-344, 2010.

ANDORFER, C. A. et al. MicroRNA signatures: clinical biomarkers for the diagnosis and treatment of breast cancer. **Trends. Mol. Med.,** v. 17, n. 6, p. 313-319, 2011.

ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature,** v. 442, n. 7104, p. 823-826, 2006.

ANDRÉ, S.; TOMÁS, A. R.; FONSECA, R. Determination of HER2 by fluorescence in situ hybridization (FISH) in breast cancer. Experience of the Reference Laboratory of Lisbon. **Acta Med. Port.,** v. 18, n. 6, p. 417-422, 2005.

ARMSTRONG, L. et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. **Stem Cells,** v. 22, n. 7, p. 1142-1151, 2004.

ATLASI, Y. et al. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. **Int. J. Cancer,** v. 120, n. 7, p. 1598-1602, 2007.

AUSTIN, T. W. et al. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. **Blood,** v. 89, n. 10, p. 3624-3635, 1997.

BABAIE, Y. et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. **Stem Cells,** v. 25, n. 2, p. 500-510, 2007.

BAEK, D. et al. The impact of microRNAs on protein output. **Nature,** v. 455, n. 7209, p. 64-71, 2008.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALBER, A. E. Concise review: aldehyde dehydrogenase bright stem and progenitor cell populations from normal tissues: characteristics, activities, and emerging uses in regenerative medicine. **Stem Cells,** v. 29, n. 4, p. 570-575, 2011.

BALZER, E. et al. LIN28 alters cell fate succession and acts independently of the let-7 microRNA during neurogliogenesis in vitro. **Development,** v. 137, n. 6, p. 891-900, 2010.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell,** v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004.

BEDARD, P. L.; CARDOSO, F.; PICCART-GEBHART, M. J. Stemming resistance to HER-2 targeted therapy. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia,** v. 14, n. 1, p. 55-66, 2009.

BELTRAN, A. S. et al. Generation of tumor-initiating cells by exogenous delivery of OCT4 transcription factor. **Breast Cancer Res.,** v. 13, n. 5, p. R94, 2011.

BEN-PORATH, I., et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. **Nature Genetics,** v. 40, n. 5; p. 499-507, 2008.

BHARDWAJ, G. et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. **Nat. Immunol.,** v. 2, n. 2, p. 172-180, 2001.

BIXBY, S. et al. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. **Neuron.,** v. 35, n. 4, p. 643-656, 2002.

BONCI, D. et al. 'Advanced' generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo. **Gene. Ther.,** v. 10, n. 8, p. 630-636, 2003.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat. Med.,** v. 3, n. 7, p. 730-737,1997.

BRACKEN, C. P. et al. The role of microRNAs in metastasis and epithelial-mesenchymal transition. **Cell Mol. Life Sci.,** v. 66, n. 10, p. 1682-1699, 2009.

BURNS, J. C. et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 90, n. 17, p. 8033-8037, 1993.

CALIN, G. A. et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.

CHAKRABARTY, A. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER2-PI3K-FoxO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. **Cancer Res**., v.73, n. 3, p.1190-1200, 2013.

CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. **Cancer. Res.,** v. 69, n. 4, p. 1302-1313, 2009.

CHRISTGEN, M. et al. Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. **Mol. Cell. Biochem.,** v. 306, n. 1-2, p. 201-212, 2007.

CHUTE, J. P. et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 103, n. 31, p. 11707-11712, 2006.

CLARKE, M. F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell,** v. 124, n. 6, p. 1111-1115, 2006.

COLLINS, A. T. et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res.,** v. 65, n. 23, p. 10946-10951, 2005.

COLLINS, S. J. Retinoic acid receptors, hematopoiesis and leukemogenesis. **Curr. Opin. Hematol.,** v. 15, n. 4, p. 346-351, 2008.

COOLS, M. et al. Gonadoblastoma arising in undifferentiated gonadal tissue within dysgenetic gonads. **J. Clin. Endocrinol. Metab.,** v. 91, n. 6, p. 2404-2413, 2006.

CREIGHTON, C. J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 106, n. 33, p. 13820-13825, 2009.

D'ANGELO, R. C.; WICHA, M. S. Stem cells in normal development and cancer. **Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.,** v. 95, p. 113-158, 2010.

DAVOREN, P. A. et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. **BMC Mol. Biol.,** v. 9, p. 76, 2008.

DE BEÇA, F.F. et al. Cancer stem cells markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types. **J. Clin. Pathol.,** v. 66, n. 3, p. 187-191, 2013.

DEAN, M.; FOJO, T.; BATES, S. Tumour stem cells and drug resistance. **Nat. Ver. Cancer,** v. 5, n. 4, p. 275-284, 2005.

DEBEB, B. G. et al. Differential radiosensitizing effect of valproic acid in differentiation versus self-renewal promoting culture conditions. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.,** v. 76, n. 3, p. 889-895, 2010.

DONTU, G. et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes Dev.**, v. 17, n. 10, p. 1253-1270, 2003.

DONTU, G.; WICHA, M. S. Survival of mammary stem cells in suspension culture: implications for stem cell biology and neoplasia. **J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia**, v. 10, n. 1, p. 75-86, 2005.

DUELLMAN, S. J. et al. A bioluminescence assay for aldehyde dehydrogenase activity. **Anal Biochem.,** v. 434, n. 2, p. 226-232, 2013.

DUESTER, G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. **Eur. J. Biochem.,** v. 267, n. 14, p. 4315-4324, 2000.

EISTERER, W. et al. Different subsets of primary chronic myeloid leukemia stem cells engraft immunodeficient mice and produce a model of the human disease. **Leukemia,** v. 19, n. 3, p. 435-441, 2005.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology,** v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science,** v. 240, n. 4854, p. 889-895, 1988.

EZEH, U. I. et al. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. **Cancer,** v. 104, n. 10, p. 2255-2265, 2005.

FANG, D. et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Res.,** v. 65, n. 20, p. 9328-9337, 2005.

FARNIE, G. et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 99, n. 8, p. 616-627, 2007.

FEDERICO, M. **Methods in Molecular Biology**. v. 229. Lentivirus gene engineering protocols. New York City: Humana Press, 2003.

FELLI, N. et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 102, n. 50, p. 18081-18086, 2005.

FELICETTI, F. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. **Cancer Res.,** v. 68, n. 8, p. 2745-2754, 2008.

FILLMORE, C. M.; KUPERWASSER, C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. **Breast Cancer Res.,** v. 10, n. 2, p. R25, 2008.

FRAME, F. M.; MAITLAND, N. J. Cancer stem cells, models of study and implications of therapy resistance mechanisms. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v. 720, p. 105-118, 2011.

GALARDI, S. et al. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. **J. Biol. Chem.,** v. 282, n. 32, p. 23716-23724, 2007.

GEE, H. E. et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. **Br. J. Cancer,** v. 104, n. 7, p. 1168-1177, 2011.

GENTRY, T. et al. Isolation of early hematopoietic cells, including megakaryocyte progenitors, in the ALDH-bright cell population of cryopreserved, banked UC blood. **Cytotherapy,** v. 9, n. 6, p. 569-576, 2007.

GEOGGOULIAS, V. et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemo- therapy-resistant CK19 mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. **Ann. Oncol.,** v. 23, n. 7, p. 1744-1750, 2012.

GIBBS, C. P. et al. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. **Neoplasia,** v. 7, n. 11, p. 967-976, 2005.

GINESTIER, C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell,** v. 1, n. 5, p. 555-567, 2007.

GLINSKY, G. V. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. **Stem Cell Rev.,** v. 3, n. 1, p. 79-93, 2007.

GONG, C. et al. Up-regulation of miR-21 mediates resistance to trastuzumab therapy for breast cancer. **J. Biol. Chem.,** v. 286, n. 21, p. 19127-19137, 2011.

GREGORY, P. A. et al. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat. Cell Biol.,** v. 10, n. 5, p. 593-601, 2008.

GU, G. et al. Prostate cancer cells with stem cell characteristics reconstitute the original human tumor in vivo. **Cancer Res.,** v. 67, n. 10, p. 4807-4815, 2007.

GUO, L.; LU, Z. The fate of miRNA strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? **PLoS One,** v. 5, n. 6, p. e11387, 2010.

HARRIS, L. N. et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-positive early breast cancer. **Clin. Cancer Res.,** v. 13, n. 4, p. 1198-1207, 2007.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev. Genet.,** v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HEISER, W. C. Delivery of DNA to cells in culture using particle bombardment. **Methods Mol. Biol.,** v. 245, p. 175-184, 2004.

HESS, D. A. et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. **Blood,** v. 104, n. 6, p. 1648-1655, 2004.

HESS, D. A. et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. **Blood,** v. 107, n. 5, p. 2162-2169, 2006.

HONETH, G. et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res.,** v. 10, n. 3, p. R53, 2008.

HOPE, K. J.; JIN, L.; DICK, J. E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nat. Immunol.,** v. 5, n. 7, p. 738-743, 2004.

HOUBAVIY, H.B.; MURRAY, M.F.; SHARP, P.A. Embryonic stem cell-specific microRNAs. **Dev. Cell.**, v. 5, n. 2, p. 351–358, 2003.

HU, T. et al. Octamer 4 small interfering RNA results in cancer stem cell-like cell apoptosis. **Cancer Res.,** v. 68, n. 16, p. 6533-6540, 2008.

HU, Y.; FU, L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. **Am. J. Cancer Res.,** v. 2, n. 3, p. 340-356, 2012.

HUANG, Q. et al. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. **Nat. Cell Biol.,** v. 10, n. 2, p. 202-210, 2008.

HYNES, N. E.; LANE, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat. Rev. Cancer,** v. 5, n. 5, p. 341-354, 2005.

HYNES, N. E.; MACDONALD, G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 21, n. 2, p. 177-184, 2009.

IARC. World Cancer Report, 2008. Disponível em: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf. Acesso em: 05 de Maio de 2013.

ISAACS, J.T. Role of programmed cell death in carcinogenesis. **Environ. Health Perspect**., v. 101, suppl. 5, p. 27-34, 1993.

ITHIMAKIN, S. et al. HER2 drives luminal breast cancer stem cells in the absence of HER2 amplification: implications for efficacy of adjuvant trastuzumab. **Cancer Res.,** v. 73 n. 5, p. 1635-1646, 2013.

IORIO, M. V. et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Res**., v. 65, p. 7065–7070, 2005.

IZUMI, Y. et al. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. **Nature,** v. 416, n. 6878, p. 279-280, 2002.

JAISWAL, S. et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 100, n. 17, p. 10002-10007, 2003.

JAMIESON, C. H. et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. **N. Engl. J. Med.,** v. 351, n. 7, p. 657-667, 2004.

JIANG, F. et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. **Mol. Cancer Res.,** v. 7, n. 3, p. 330-338, 2009.

JIN, X., et al. Aldehyde dehydrogenase 1 can be used as a new marker of cancer stem cells in laryngeal cancer cells in vitro. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi., v**. 33, n. 12, p. 900-904, 2011.

KANG, L. et al. A positive cross-regulation of HER2 and ER-α36 controls ALDH1 positive breast cancer cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.,** v. 127, n. 3-5, p. 262-268, 2011.

KELLY, L. M.; GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.,** v. 3, p. 179-198, 2002.

KHEIRELSEID, E. A. et al. Identification of endogenous control genes for normalisation of real-time quantitative PCR data in colorectal cancer. **BMC Mol Biol,** v. 11, p. 12, 2010.

KIM, S. J. et al. MicroRNA let-7a suppresses breast cancer cell migration and invasion through downregulation of C-C chemokine receptor type 7. **Breast Cancer Res.,** v. 14, n. 1, p. R14, 2012.

KONDO, T.; SETOGUCHI, T.; TAGA, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 101, n. 3, p. 781-786, 2004.

KORKAYA, H. et al. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. **Oncogene,** v. 27, n. 47, p. 6120-6130, 2008.

KOYAMA, Y. et al. In vivo molecular imaging to diagnose and subtype tumors through receptor-targeted optically labeled monoclonal antibodies. **Neoplasia,** v. 9, n. 12, p. 1021-1029, 2007.

KRIVTSOV, A. V. et al. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. **Nature,** v. 442, n. 7104, p. 818-822, 2006.

KRIZHANOVSKY, V.; LOWE, S. W. Stem cells: The promises and perils of p53. **Nature,** v. 460, n. 7259, p. 1085-1086, 2009.

KWON, M. J.; SHIN, Y. K. Regulation of ovarian cancer stem cells or tumor-initiating cells. **Int. J. Mol. Sci.,** v. 14, n. 4, p. 6624-6648, 2013.

LABRECQUE, J.; BHAT, P. V.; LACROIX, A. Purification and partial characterization of a rat kidney aldehyde dehydrogenase that oxidizes retinal to retinoic acid. **Biochem. Cell Biol.,** v. 71, n. 1-2, p. 85-89, 1993.

LE SAGE, C. et al. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. **EMBO J.,** v. 26, n. 15, p. 3699-3708, 2007.

LEIS, O. et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. **Oncogene,** v. 31, n. 11, p. 1354-1365, Mar 2012.

LI, C. et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Res,** v. 67, n. 3, p. 1030-107, 2007.

LI, X. et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 100, n. 9, p. 672-679, 2008.

LI, T., et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients' outcome. **Lab. Invest.,** v. 90, n. 2, p. 234–244, 2010.

LIANG, D., SHI, Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. **Med. Oncol**., v. 29, n. 2, p. 633-639, 2012.

LIU, S. et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. **Cancer Res.,** v. 66, n. 12, p. 6063-6071, 2006.

LIU, S.; WICHA, M. S. Targeting breast cancer stem cells. **J. Clin. Oncol.,** v. 28, n. 25, p. 4006-4012, 2010.

LOHBERGER, B., et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a potential marker for cancer stem cells in human sarcoma. **PLoS One**, v. 7, n. 8, e43664, 2012.

LOWE, S. W.; LIN, A. W. Apoptosis in cancer. **Carcinogenesis,** v. 21, n. 3, p. 485-495, 2000.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature,** v. 435, n. 7043, p. 834-838, 2005.

LU, Y. et al. Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 93, n. 24, p. 1852-1857, 2001.

LYNCH, M. D.; CARIATI, M.; PURUSHOTHAM, A. D. Breast cancer, stem cells and prospects for therapy. **Breast Cancer Res.,** v. 8, n. 3, p. 211, 2006.

MA, I.; ALLAN, A. L. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. **Stem Cell Rev.,** v. 7, n. 2, p. 292-306, 2011.

MA, L.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WEINBERG, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature,** v. 449, n. 7163, p. 682-688, 2007.

MACHIDA, C.A. **Methods and Protocols.** New York City: Humana Press, 2003.

MAGNI, M. et al. Induction of cyclophosphamide-resistance by aldehyde-dehydrogenase gene transfer. **Blood,** v. 87, n. 3, p. 1097-1103, 1996.

MAGNIFICO, A. et al. Tumor-initiating cells of HER2-positive carcinoma cell lines express the highest oncoprotein levels and are sensitive to trastuzumab. **Clin. Cancer Res.,** v. 15, n. 6, p. 2010-2021, 2009.

MANI, S. A. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell,** v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.

MARCHITTI, S. A. et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.,** v. 4, n. 6, p. 697-720, 2008.

MATSUI, W. et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. **Blood,** v. 103, n. 6, p. 2332-2336, 2004.

MCNEILL, R. E.; MILLER, N.; KERIN, M. J. Evaluation and validation of candidate endogenous control genes for real-time quantitative PCR studies of breast cancer. **BMC Mol. Biol.,** v. 8, p. 107, 2007.

MEDINA, R. et al. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. **Cancer Res.,** v. 68, n. 8, p. 2773-80, 2008.

MESHORER, E. et al. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. **Dev. Cell,** v. 10, n. 1, p. 105-116, 2006.

MILLER, A. D.; CHEN, F. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. **J. Virol.,** v. 70, n. 8, p. 5564-5571, 1996.

MIRBASE. Browse miRBase by species: Release 19, 2012. Disponível em: <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa> . Acesso em: 01 de Jun 2013.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene,** v. 26, n. 45, p. 6469-6487, 2007.

MOLOFSKY, A. V.; PARDAL, R.; MORRISON, S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 16, n. 6, p. 700-707, 2004.

MOREB, J. S. Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v. 3, n. 4 p. 237–246, 2008.

MORIMOTO, K. et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. **Cancer Sci.,** v. 100, n. 6, p. 1062-1068, 2009.

MUROHASHI, M. et al. Gene set enrichment analysis provides insight into novel signalling pathways in breast cancer stem cells. **Br. J. Cancer,** v. 102, n. 1, p. 206-12, 2010.

NAHTA, R.; ESTEVA, F. J. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. **Breast Cancer Res.,** v. 8, n. 6, p. 215, 2006.

NAKSHATRI, H.; SROUR, E. F.; BADVE, S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. **Curr. Stem Cell Res. Ther.,** v. 4, n. 1, p. 50-60, 2009.

NASSIRPOUR, R., et al. miR-221 Promotes Tumorigenesis in Human Triple Negative Breast Cancer Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 4, in press, 2013.

NG, E. K. et al. Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. **PLoS One,** v. 8, n. 1, p. e53141, 2013.

NICHOLS, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell,** v. 95, n. 3, p. 379-391, 1998.

NICOLINI, A. et al. Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. **Curr. Pharm. Biotechnol.,** v. 12, n. 2, p. 196-205, 2011.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet.,** v. 24, n. 4, p. 372-376, 2000.

O'BRIEN, C. A. et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature,** v. 445, n. 7123, p. 106-110, 2007.

OAK, P. S. et al. Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells. **Int J Cancer,** v. 131, n. 12, p. 2808-2819, 2012.

OLIVERAS-FERRAROS, C. et al. Pathway-focused proteomic signatures in HER2-overexpressing breast cancer with a basal-like phenotype: new insights into de novo resistance to trastuzumab (Herceptin). **Int. J. Oncol.,** v. 37, n. 3, p. 669-678, 2010.

OZBEK, E., et al. Stem cell markers aldehyde dehydrogenase type 1 and nestin expressions in renal cell cancer. **Arch. Ital. Urol. Androl.,** v. 84, n. 1, p. 7-11, 2012.

PAIK, S.; KIM, C.; WOLMARK, N. HER2 status and benefit from adjuvant trastuzumab in breast cancer. **N. Engl. J. Med**., v. 358, n. 13, p. 1409-1411, 2008.

PANDOLFI, P. P. Breast cancer--loss of PTEN predicts resistance to treatment. **N. Engl. J. Med.,** v. 351, n. 22, p. 2337-2338, 2004.

PARDAL, R.; CLARKE, M. F.; MORRISON, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. **Nat. Rev. Cancer,** v. 3, n. 12, p. 895-902, 2003.

PASSEGUÉ, E. et al. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 100 Suppl. 1, p. 11842-11849, 2003.

PEARCE, D. J. et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. **Stem Cells,** v. 23, n. 6, p. 752-760, 2005.

PENG, S.; MAIHLE, N. J.; HUANG, Y. Pluripotency factors Lin28 and Oct4 identify a sub-population of stem cell-like cells in ovarian cancer. **Oncogene,** v. 29, n. 14, p. 2153-2159, 2010.

PEREZ, E. A. et al. HER2 and chromosome 17 effect on patient outcome in the N9831 adjuvant trastuzumab trial. **J. Clin. Oncol.,** v. 28, n. 28, 4307–4315, 2010.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature,** v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PERSSON, H. et al. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. **Cancer Res.,** v. 71, n. 1, p. 78-86, 2011.

PHILLIPS, T. M.; MCBRIDE, W. H.; PAJONK, F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 98, n. 24, p. 1777-1785, 2006.

PICCART-GEBHART, M. J. et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.,** v. 353, n. 16, p. 1659-1672, 2005.

PINEAU, P. et al. miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 107, n 1, p. 264-269, 2010.

POESCHLA, E. M. Non-primate lentiviral vectors. **Curr. Opin. Mol. Ther,** v. 5, n. 5, p. 529-540, 2003.

POLANOVSKI, O. L.; LEBEDENKO, E. N.; DEYEV, S. M. ERBB oncogene proteins as targets for monoclonal antibodies. **Biochemistry (Mosc),** v. 77, n. 3, p. 227-245, 2012.

POLYAK, K.; HAHN, W. C. Roots and stems: stem cells in cancer. **Nat. Med.,** v. 12, n. 3, p. 296-300, 2006.

PONTI, D. et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. **Cancer Res.,** v. 65, n. 13, p. 5506-5511, 2005.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res.,** v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 104, n. 3, p. 973-978, 2007.

PRUD'HOMME, G. J. et al. Breast cancer stem-like cells are inhibited by a non-toxic aryl hydrocarbon receptor agonist. **PLoS One,** v. 5, n. 11, p. e13831, 2010.

PÁLYI-KREKK, Z. et al. Hyaluronan-induced masking of ErbB2 and CD44-enhanced trastuzumab internalisation in trastuzumab resistant breast cancer. **Eur. J. Cancer,** v. 43, n. 16, p. 2423-2433, 2007.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature,** v. 414, n. 6859, p. 105-111, 2001.

REYNOLDS, B.A.; WEISS, S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. **Dev. Biol.,** v. 175, n. 1, p. 1–13, 1996.

RICARDO, S. et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **J. Clin. Pathol.,** v. 64, n. 11, p. 937-946, 2011.

RICCI-VITIANI, L. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature,** v. 445, n. 7123, p. 111-115, 2007.

RICCI-VITIANI, L. et al. Absence of caspase 8 and high expression of PED protect primitive neural cells from cell death. **J. Exp. Med.,** v. 200, n. 10, p. 1257-1266, 2004.

ROLLINS-RAVAL, M.A., et al. ALDH, CA I, and CD2AP: Novel, Diagnostically Useful Immunohistochemical Markers to Identify Erythroid Precursors in Bone Marrow Biopsy Specimens. **Am. J. Clin. Pathol**., v. 137, n. 1, p. 30-38, 2012.

ROBERTSON, F. M. et al. Imaging and analysis of 3D tumor spheroids enriched for a cancer stem cell phenotype. **J. Biomol. Screen,** v. 15, n. 7, p. 820-9, 2010.

RODRIGUEZ-PINILLA, S. M. et al. Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. **Mod. Pathol.,** v. 20, n. 4, p. 474-81, 2007.

ROESLER, R. et al. HER2 as a cancer stem-cell target. **Lancet Oncol.,** v. 11, n. 3, p. 225-226, 2010.

ROMOND, E. H. et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.,** v. 353, n. 16, p. 1673-1684, 2005.

ROSS, J. S. et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. **Oncologist,** v. 8, n. 4, p. 307-325, 2003.

RUVKUN, G. Clarifications on miRNA and cancer. **Science,** v. 311, n. 5757, p. 36-37, 2006.

SAHOVIC, E.A., Role for aldehyde dehydrogenase in survival of progenitors for murine blast cell colonies after treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide in vitro. **Cancer Res.,** v. 48, n. 5, p.1223-1226, 1988.

SANADA, Y. et al. Histopathologic evaluation of stepwise progression of pancreatic carcinoma with immunohistochemical analysis of gastric epithelial transcription factor SOX2: comparison of expression patterns between invasive components and cancerous or nonneoplastic intraductal components. **Pancreas,** v. 32, n. 2, p. 164-170, 2006.

SBI (System Biosciences) [internet]. Mountain View. Human and Mouse Lenti-miR ™ MicroRNA Precursor Clone Collections (2010). Disponível em: <http://www.systembio.com/microrna-research/microrna-overexpression>. Acesso em 06 de Maio de 2013.

SEIDMAN, A. D. et al. Weekly trastuzumab and paclitaxel therapy for metastatic breast cancer with analysis of efficacy by HER2 immunophenotype and gene amplification. **J Clin Oncol.,** v. 19, n. 10, p. 2587-2595, 2001.

SELL, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.,** v. 51, n. 1, p. 1-28, 2004.

SEMPERE, L. F. et al. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. **Cancer Res.,** v. 67, n. 24, p. 11612-11620, 2007.

SETOGUCHI, T.; TAGA, T.; KONDO, T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. **Cell Cycle,** v. 3, n. 4, p. 414-415, 2004.

SHAH, M.Y.; CALIN, G.A. MicroRNAs miR-221 and miR-222: a new level of regulation in aggressive breast cancer. **Genome Med**., v. 3, n. 8, p. 56, 2011.

SHIMONO, Y. et al. Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. **Cell,** v. 138, n. 3, p. 592-603, 2009.

SIDDIQA, A. et al. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. **BMC Cancer,** v. 8, p. 129, 2008.

SINGH, S. K. et al. Cancer stem cells in nervous system tumors. **Oncogene,** v. 23, n. 43, p. 7267-7273, 2004a.

SINGH, S. K. et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature,** v. 432, n. 7015, p. 396-401, 2004b.

SINGH, A.; SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene,** v. 29, n. 34, p. 4741-4751, 2010.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science,** v. 235, n. 4785, p. 177-182, 1987.

SLAMON, D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N. Engl. J. Med.,** v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SLÁDEK, N. E. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. **J. Biochem. Mol. Toxicol.,** v. 17, n. 1, p. 7-23, 2003.

SO, E. N.; CROWE, D. L. Characterization of a retinoic acid responsive element in the human ets-1 promoter. **IUBMB Life,** v. 50, n. 6, p. 365-370, 2000.

SODROSKI, J.G. Vector containing HIV packaging sequences, packging defective HIV vectors, and uses thereof. US patent #5,665,577. 1997.

SOPHOS, N. A.; VASILIOU, V. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. **Chem. Biol. Interact.,** v. 143-144, p. 5-22, 2003.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SPINK, K. E.; POLAKIS, P.; WEIS, W. I. Structural basis of the Axin-adenomatous polyposis coli interaction. **EMBO. J.,** v. 19, n. 10, p. 2270-2279, 2000.

STINSON, S. et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. **Sci. Signal.**, v. 4; n. 177, p. ra41, 2011.

SUH, M. R. et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. **Dev. Biol.,** v. 270, n. 2, p. 488-498, 2004.

TAI, M. H. et al. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. **Carcinogenesis,** v. 26, n. 2, p. 495-502, 2005.

TAIPALE, J.; BEACHY, P. A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. **Nature,** v. 411, n. 6835, p. 349-354, 2001.

VALASTYAN, S. et al. A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. **Cell,** v. 137, n. 6, p. 1032-1046, 2009.

VAN RHENEN, A. et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. **Clin. Cancer Res.,** v. 11, n. 18, p. 6520-6527, 2005.

VAZQUEZ-MARTIN, A. et al. The anti-diabetic drug metformin suppresses the metastasis-associated protein CD24 in MDA-MB-468 triple-negative breast cancer cells. **Oncol. Rep,** v. 25, n. 1, p. 135-40, 2011.

VERMEULEN, L. et al. Cancer stem cells--old concepts, new insights. **Cell Death Differ.,** v. 15, n. 6, p. 947-958, 2008.

VISONE, R. et al. MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. **Endocr. Relat. Cancer,** v. 14, n. 3, p. 791-798, 2007.

VISWANATHAN, S. R.; DALEY, G. Q.; GREGORY, R. I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. **Science,** v. 320, n. 5872, p. 97-100, 2008.

VOGEL, C. L. et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.,** v. 20, n. 3, p. 719-726, 2002.

WAKAMATSU, Y., et al. Expression of cancer stem cell markers ALDH1, CD44 and CD133 in primary tumor and lymph node metastasis of gastric cancer. **Pathol. Int**., v. 62, n. 2, p. 112-119, 2012.

WANG, C., et al. Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. **Oncol. Rep.,** v. 28, n. 4, p. 1301-1308, 2012.

WEISSMAN, I. L. Normal and neoplastic stem cells. **Novartis Found. Symp.,** v. 265, p. 35–50, 2005.

WICHA, M.S., LIU S., DONTU, G. Cancer stem cells: An oldidea—A paradigm shift. **Cancer Res**., v. 66, n. 4, p. 1883–1890, 2006.

WOLFF, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.,** v. 131, n. 1, p. 18-43, 2007.

WU, A. et al. Aldehyde dehydrogenase 1, a functional marker for identifying cancer stem cells in human nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Let**t., v. 330, n. 2, p. 181-189, 2013.

XI, R.; XIE, T. Stem cell self-renewal controlled by chromatin remodeling factors. **Science,** v. 310, n. 5753, p. 1487-1489, 2005.

YANG, X. et al. Double-negative feedback loop between reprogramming factor LIN28 and microRNA let-7 regulates aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells. **Cancer Res.,** v. 70, n. 22, p. 9463-9472, 2010.

YOSHIDA, A. et al. Human aldehyde dehydrogenase gene family. **Eur. J. Biochem.,** v. 251, n. 3, p. 549-557, 1998.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science,** v. 318, n. 5858, p. 1917-1920, 2007.

YU, F. et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. **Cell,** v. 131, n. 6; p. 1109–1123, 2007.

ZHAO, J. J. et al. MicroRNA-221/222 negatively regulates estrogen receptor alpha and is associated with tamoxifen resistance in breast cancer. **J. Biol. Chem.,** v. 283, n. 45, p. 31079-31086, 2008.

ZHOU, M. et al. MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression. **J. Biol. Chem.,** v. 285, n. 28; 21496-21507, 2010.