

❖ CÉLULAS MADRE (STEM) TUMORALES. NUEVOS PROTAGONISTAS DE LA PATOLOGÍA ONCOLÓGICA

**María Agustina Taruselli. Lic en Ciencias Biológicas, UBA. Becaria Doctoral ANPCyT.
Laura Beatriz Todaro. Doctora en Ciencias de la UBA. Profesora Adjunta de la UBA
Miembro de la Carrera de Investigador científico del CONICET.**

Contenido del Capítulo

1. Conceptos generales sobre células stem
2. La resistencia a los tratamientos convencionales. Noveles blancos terapéuticos
3. Marcadores moleculares para células stem
4. Células stem tumorales y células tumorales circulantes
5. Células stem tumorales mamarias

1. CONCEPTOS GENERALES SOBRE CÉLULAS STEM

En los últimos tiempos se ha comenzado la búsqueda y estudio de las llamadas células madre o stem. Las células stem tienen dos características principales:

- Capacidad de auto-renovación: generar copias exactas de sí mismas
- Capacidad de diferenciarse: formar otros tipos de células dentro de un órgano

Se reconocen diferentes tipos de células stem, las llamadas células stem embrionarias y células stem adultas. Las células stem embrionarias son aquellas que forman el embrión y tienen la capacidad de formar prácticamente cualquier otra célula del cuerpo, siendo por esta razón potencialmente útiles para la regeneración de tejidos e incluso para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Por otro lado, las células stem adultas son específicas de tejido y presentan una capacidad de diferenciarse mucho más limitada. Las células stem adultas son un pequeño porcentaje de las células que conforman los sistemas de órganos donde dan lugar a tipos celulares específicos. Se las encuentra en la piel, la glándula mamaria, el intestino y el sistema nervioso, entre otros. La renovación tisular es mantenida por las células stem a través de un proceso finamente regulado de auto-renovación y muerte celular. La desregulación de este proceso es un evento clave en la patogénesis del cáncer.¹

Se ha descrito un tercer tipo de células stem: la célula stem tumoral (de su sigla en inglés CSC). El pensamiento clásico postula que los tumores se desarrollan como resultado de mutaciones aleatorias y que cualquier célula puede convertirse en una célula tumoral. Sin embargo, “la hipótesis de la célula stem tumoral” postula que el cáncer sólo puede formarse a partir de células que ya tienen las propiedades de una célula stem. Estas células pueden ser cualquiera de las células stem normales dentro de cada tejido o pueden ser otras células (no stem) que, a través de mutaciones, han adquirido esa capacidad de auto-renovación. Al igual que las células stem somáticas adultas normales,

las CSC poseen un potencial ilimitado de proliferación que ayuda a la iniciación y propagación del tumor. Las CSC también poseen otra característica distintiva de las células stem normales, la capacidad de auto-renovación, lo que le permite diferenciarse en diferentes tipos de células funcionales que generalmente forman la mayor parte del tumor². El hecho de que los cánceres comprenden células con propiedades de células stem tiene importantes implicancias clínicas³.

Una reciente publicación ha tratado de responder a la pregunta de por qué algunos órganos presentan una tasa de formación de tumores más alta que otros ⁴. Los autores de este trabajo examinaron la relación entre el riesgo de cáncer y el número de renovaciones de las células stem en órganos específicos, encontrando una fuerte correlación entre estos dos factores. Por ejemplo, específicamente en el colon, hay una alta tasa de divisiones de las células stem adultas normales y un alto riesgo de carcinogénesis. Por el contrario, la vesícula biliar presenta un menor número de divisiones de células stem y un menor riesgo de carcinogénesis. Estos datos refuerzan la idea de que las células con capacidad de auto-renovación pueden ser la fuente de los tumores.

Uno de los desafíos más grandes en el desarrollo de tratamientos eficaces contra la patología oncológica es el hecho de que los cánceres son heterogéneos. Existen dos formas de esta heterogeneidad. El modelo clásico postula que la heterogeneidad se desarrolla a partir de la mutación y la selección de las células dentro de un tumor. El segundo modelo de heterogeneidad surge a partir de CSC que son capaces de diferenciarse y formar las diferentes células del tumor. Por otra parte, una CSC puede evolucionar y mutar durante la tumorigénesis, surgiendo así múltiples células stem distintas dentro de un determinado tumor⁵.

2. LA RESISTENCIA A LOS TRATAMIENTOS CONVENCIONALES. NOVELES BLANCOS TERAPÉUTICOS

A pesar de los avances en el tratamiento del cáncer, muchas terapias fallan al curar al paciente, lo que resulta en progresión de la enfermedad, recurrencia y reducción de la supervivencia general. Históricamente, los estudios se han centrado en los mecanismos genéticos y bioquímicos que causan la resistencia a los medicamentos. Sin embargo, se sabe que el cáncer es una enfermedad heterogénea y existe una conciencia creciente de que la heterogeneidad intratumoral contribuye a la falla en las terapias y la progresión de la enfermedad ⁶.

Las CSC son una pequeña parte dentro del tumor, presentan una tasa de proliferación muy baja y son insensibles a los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radiación, que principalmente reducen la masa tumoral removiendo células proliferantes ⁷. Este hecho presenta un gran desafío tanto para la investigación básica como para el desarrollo de nuevas terapias contra la patología tumoral. Algunos trabajos han demostrado además, que las CSC son las semillas malignas que causan la metástasis ⁸. Por lo tanto, muchas de las terapias que han sido desarrolladas pueden reducir el tamaño del tumor, pero no son curativas cuando el cáncer es metastásico.

Hay numerosas propiedades que hacen a las CSC resistentes a diferentes tratamientos. En primer lugar, tienen diferente cinética del ciclo celular; en realidad son células en reposo y numerosas terapias tienen como blanco terapéutico células que están proliferando rápidamente. En segundo lugar, las CSC expresan proteínas anti-apoptóticas,

como BCL-2 y Bcl-X y resisten a la muerte celular. En tercer lugar, las CSC tienen mecanismos de reparación del ADN más eficiente que las otras células que conforman el tumor y los niveles de antioxidantes que las protegen contra la radioterapia se pueden encontrar aumentados. Además, esta subpoblación expresa proteínas transportadoras con la capacidad de bombear los agentes quimioterápicos fuera de las células⁷.

Finalmente, las CSC expresan altos niveles de la enzima aldehído deshidrogenasa: ALDH (utilizada como uno de los marcadores de células stem) que es capaz de metabolizar algunos agentes quimioterapéuticos⁹. Claramente, las CSC tienen un amplio arsenal de mecanismos que les permiten resistir la quimioterapia y la radiación.

Para muchos tipos de tumores como el cáncer de mama, la reducción del tumor primario no se correlaciona bien con la supervivencia del paciente. Por lo que se requiere de un profundo análisis que contemple la existencia de CSC, antes del desarrollo de terapias adyuvantes. Sin embargo, este es un gran desafío, porque algunas de las vías de señalización utilizadas por las CSC también pueden ser utilizadas por las células stem de tejidos adultos normales, que son esenciales para el mantenimiento de los órganos

Una de las primeras evidencias sobre la resistencia a la quimioterapia fue reportada por Li y colaboradores en 2008, en pacientes con cáncer de mama. Los autores evaluaron la proporción de CSC mamarias (CD44+/CD24-) en biopsias obtenidas de pacientes antes, durante y después de la quimioterapia neoadyuvante (para los tumores HER2 negativos) o la terapia con Lapatinib (para los tumores HER2 positivos). En aquellos pacientes con cáncer HER2 negativo que recibieron quimioterapia neoadyuvante, el porcentaje de CSC aumentó aun cuando el tumor se redujo. En los pacientes con cáncer HER2 positivo que recibieron terapia con Lapatinib, la proporción de CSC disminuyó ligeramente junto con la reducción del tumor¹⁰. Estas evidencias llevaron a pensar que la eficacia clínica encontrada pudo deberse a la capacidad del agente bloqueante del receptor HER2 para actuar sobre las CSC mamarias. Por otro lado, en los pacientes que recibieron quimioterapia citotóxica, el porcentaje de CSC aumentó, como consecuencia de la resistencia que presentan estas células a este tipo de tratamiento. Es decir que la quimioterapia y la radioterapia podrían tener una consecuencia no deseada.

¿Cómo ocurre esto? La quimioterapia induce la muerte de las células cancerosas y éstas secretan citocinas como la interleucina (IL)-8. Se ha descubierto que las CSC expresan receptor para IL-8 denominado CXCR1. Cuando IL-8 se une a CXCR1, se produce el bloqueo de la apoptosis y la inducción de señales intracelulares que desencadenan el proceso de auto-renovación. Se cree que este mecanismo pudo haberse desarrollado para conservar a las células stem normales dentro de los tejidos lesionados, conduciéndolas a proliferar con el fin de reparar el tejido. Sin embargo, cuando esto sucede en el ambiente del tumor, el resultado final es un aumento del número de CSC¹¹.

Actualmente, numerosos investigadores plantean la hipótesis de que los tratamientos dirigidos a la población CSC podrían ser más efectivos que las terapias existentes, y podrían transformar drásticamente los resultados del tratamiento en oncología. Vías de señalización como Notch, Wnt y Hedgehog desempeñan un papel clave en la auto-renovación y mantenimiento de estas células stem¹². Estas vías, y otras vías intrínsecas y extrínsecas, son el blanco de múltiples agentes terapéuticos¹³.

2. MARCADORES MOLECULARES PARA LAS CÉLULAS STEM

Parte de la importancia de las CSC radica en el hecho de ser consideradas como semillas de la metástasis. Charafe-Jauffret y colaboradores realizaron un análisis retrospectivo de 109 pacientes con cáncer de mama inflamatorio y hallaron que la expresión del marcador ALDH se encuentra asociado a una menor supervivencia y aumento de metástasis¹⁴. Por otro lado, las células stem tumorales también pueden contribuir a la latencia o “dormancy” del tumor. La evidencia sugiere que células stem latentes en la médula ósea podrían reactivarse y causar recurrencia muchos años después¹⁵.

En los últimos años se han identificado muchos marcadores de células stem tumorales diferentes, examinando varios tumores malignos. En la tabla 1 resumimos los principales marcadores de CSC conocidos actualmente en diferentes tipos de tumores¹⁶⁻²³. Podemos notar que muchos de los marcadores se conservan entre diferentes CSC debido a que éstos representan células más primitivas que comparten vías comunes.

Un concepto importante es que las CSC no constituyen una población homogénea dentro de un mismo tumor. Se ha estudiado que, en los tumores de mama, las CSC situadas en el borde de un tumor invasivo eran distintas de las del interior. Concretamente, las células CD44+/CD24- estaban ubicados en el borde invasivo, en la periferia del tumor, mientras que las células que expresan el marcador ALDH se encontraron en el interior. En base a su morfología y expresión de marcadores, estas subpoblaciones de células stem son llamadas mesenquimales o tipo epitelial respectivamente. Se cree que las células mesenquimales, al estar ubicadas en el borde invasivo son responsables de la metástasis y que las células stem epiteliales albergan la capacidad proliferativa para el desarrollo de un nuevo tumor en el sitio metastásico, lo que explica cómo un tumor latente se podría reactivar después de muchos años¹⁷.

La identificación certera de las células stem es un gran desafío. Por ejemplo, las células stem normales y tumorales de la glándula mamaria han sido identificadas en base a la expresión combinada de marcadores de superficie tales como Sca-1, CD24⁻, CD49f, ALDH⁺, CD44⁺, CD133⁺. Pero aún hoy en día no se puede definir un grupo de marcadores que caractericen completamente una de estas dos poblaciones, dado que todos los marcadores reportados en la actualidad son compartidos también por células progenitoras normales parcialmente diferenciadas e incluso por células totalmente diferenciadas. Es importante mencionar que la diferencia sería principalmente de índole cuantitativa, y que lo que varía entre las distintas sub-poblaciones sería el grado de expresión de estos marcadores. Por ello, se considera que el marcador final que determina la característica de célula stem mamaria es la capacidad de generar una glándula mamaria completa *in vivo*, demostrando así su potencial de auto-renovación y su habilidad para diferenciarse a todos los tipos celulares que conforman la glándula mamaria.

3. CÉLULAS TUMORALES STEM Y CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES

Las células tumorales circulantes (CTC) se definen como aquellas células que se desprenden de un tumor e ingresan al torrente sanguíneo. Las CTCs son eventos

heterogéneos que se encuentran en muy baja concentración en sangre y su génesis está dada por el proceso de transición epitelio-mesenquimática (TEM). Si bien la TEM cumple un rol fundamental en la embriogénesis normal, también es un proceso muy importante durante la progresión del tumor primario, cuando algunas células adquieren un fenotipo invasivo que les permite llegar al torrente sanguíneo ²⁴.

La progresión tumoral que conduce a la metástasis es un proceso complejo de varias etapas. Las células metastásicas deben someterse a la TEM, separarse de la masa tumoral primaria, invadir la matriz extracelular, extravasar, sobrevivir en el torrente sanguíneo y diseminarse en órganos distantes. Afortunadamente, este proceso es altamente ineficiente y solo un pequeño número de CTCs es capaz de producir metástasis exitosas. Aquellas células que logren colonizar el órgano blanco deben exhibir características propias de las células tumorales stem (CSCs), como la alta invasividad, es por ello que se las denomina células madre tumorales circulantes ²⁵.

Siendo las CTCs muy escasas y la cantidad de muestra que puede tomarse del paciente es limitada, el estudio de las CTCs plantea grandes desafíos técnicos. A pesar de estos desafíos, los investigadores han desarrollado una variedad de técnicas para capturar e identificar estas células. CellSearch™ es actualmente la única plataforma válida y autorizada por la FDA para el uso pronóstico en cáncer de mama, próstata y colon ²⁶.

Por otro lado, la presencia de células tumorales circulantes se constituye en un indicador de mal pronóstico en diversos carcinomas. Por ejemplo la presencia de 5 o más CTCs en cáncer de mama, próstata o pulmón o de 3 o más CTCs en cáncer colorectal cada 7,5ml de sangre periférica son indicadores de una disminución de la supervivencia libre de progresión tumoral y de la supervivencia total ²⁷.

Todas estas evidencias revelan la enorme importancia de las técnicas para la detección de las CTC, basadas en la expresión de los múltiples antígenos que caracterizan a las diferentes subpoblaciones. Las tres familias más conocidas de antígenos que pueden estar presentes solos o en combinación en las CTC son ²⁸:

- Marcadores epiteliales: Molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), Citoqueratinas (Cks) y E-Cadherina
- Marcadores mesenquimales: N-Cadherina, Vimentina y Twist1
- Marcadores de células Stem: ALDH1, CD44+/CD24bajo/- y Proteínas ABC (proteínas de la bomba de extrusión de xenobióticos)

Finalmente, para que sea posible considerar a las CTCs como biomarcadores de tumores y que aporten al avance de la medicina personalizada deben estandarizarse los métodos de recolección de la muestra, de aislamiento y detección.

4. CÉLULAS STEM TUMORALES MAMARIAS

El cáncer de mama es el tipo más común de cáncer en las mujeres y es la segunda causa de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo. Recientemente se identificó a las células stem tumorales mamarias como uno de los principales factores responsables de la resistencia a la terapia, la recaída y metástasis ²⁹.

El epitelio mamario está compuesto por dos tipos celulares, las células luminales y mioepiteliales (células basales), que están organizadas en una serie de conductos ramificados que terminan en alvéolos secretorios. Las células luminales y basales se originan a partir de células stem mamarias pluripotenciales (MaSCs) durante el desarrollo del epitelio mamario. La jerarquía del epitelio mamario sugiere que las células stem tumorales mamarias podrían derivar de las MaSCs normales, transformadas por la desregulación de la auto-renovación ³⁰.

En los primeros estudios sobre células stem se demostró que sólo una pequeña fracción de células en una leucemia humana eran capaces de transferir la leucemia a ratones inmunosuprimidos ³¹. En forma análoga, otro grupo de investigadores quiso estudiar si lo mismo ocurría en el cáncer de mama. Como se indicó previamente, las CSC mamarias fueron identificadas como CD44 positivas y CD24 negativas. La inoculación de tan solo 200 de estas células en la glándula mamaria de un ratón inmunosuprimido resultó suficiente para el desarrollo de un tumor, mientras que 20.000 células que no expresan estas proteínas marcadoras no fueron tumorigénicas. Se concluyó que las células con este patrón biomarcador, característico de CSC mamarias representan sólo el 1% - 5% de las células que componen los cánceres de mama humanos ³².

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la línea celular de tumor mamario murino LM38-LP (modelo desarrollado en el Área Investigación de nuestro instituto), presenta una población de CSC cercanas al 4%. Estas células no solo pueden regenerar *in vitro* la línea completa con todos sus componentes celulares (luminales y mioepiteliales) sino que inoculadas en forma ortotópica (o sea en la propia glándula mamaria) en ratones singéneos BALB/c también regeneran un tumor con iguales características al tumor parental M38, surgido en el bioterio de este instituto ³³.

Podría decirse que el mayor avance en el tratamiento del cáncer de mama durante la última década ha sido el desarrollo de terapias dirigidas contra HER2. Hasta un 60% de los pacientes con cáncer de mama HER2 positivo experimentan una respuesta terapéutica completa. La eficacia clínica notable de los agentes que bloquean HER2 se debe a la capacidad de estos agentes para actuar sobre las CSC de mama ³⁴. En estudios realizados sobre líneas celulares tumorales mamarias que expresaban el receptor HER2 y tratadas con trastuzumab, se demostró una disminución de la población de CSC. Por supuesto, que el desarrollo de agentes contra HER2 ha sido anterior a la hipótesis de las CSC, pero la evaluación retrospectiva permite inferir que su eficacia también se debe a la participación del receptor HER2 en el mantenimiento de las CSC ³⁵.

Principales marcadores de Células Tumorales Stem humanas (CSC)

En el pasado, el tratamiento del cáncer de mama con terapias contra HER2 se limitó a pacientes con tumores HER2 positivos, ya que se pensaba que sería el único grupo que se beneficiaría. Paik y colaboradores analizando en forma retrospectiva biopsias pertenecientes a pacientes que habían recibido trastuzumab y quimioterapia adyuvante para el cáncer de mama HER2 positivo, encontraron que el 18% de los pacientes inicialmente clasificados de esta manera eran en realidad HER2 negativo. Este grupo no encontró correlación entre la eficacia del tratamiento con trastuzumab y la expresión de HER2. De hecho, los pacientes que eran HER2 negativo también se beneficiaron con el tratamiento, mostrando una reducción del 66% en la recurrencia ³⁶. Este resultado contradictorio a la intuición podría deberse al hecho de que HER2 se expresa selectivamente en la población CSC. Esto puede explicar por qué trastuzumab, que es capaz de reducir la población de células stem que expresan HER2, puede tener un beneficio clínico incluso en pacientes clasificados como HER2 "negativo". Estos datos sugieren que es posible que se hayan desarrollado terapias adyuvantes utilizando el paradigma equivocado

Tipo de Tumor	Marcadores de Superficie de CSC
Tumores Sólidos	
Cerebro ¹⁶	CD133+ CD49f+ CD90+
Mama ¹⁷	ALDH+ CD44+ CD24-/o bajo
Colon ¹⁸	CD133+ CD44+ CD24+
Pulmón ¹⁹	CD133+ CD44+ CD166+ CD90+
Melanoma ²⁰	CD271+ CD20+ CD133
Pancreas ²¹	CD133+ CD44+ ESA++ CD24+
Prostata ²²	CD133+ CD44+ CD117/c-kit
Tumores Hematológicos	
Leucemia Mielocítica aguda ²³	CD34+ CD38+

1. Islam, F., Qiao, B., Smith, R. A., Gopalan, V. & Lam, A. K. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp. Mol. Pathol.* (2015). doi:10.1016/j.yexmp.2015.02.002
2. Ahmad, G. & Amiji, M. M. Cancer stem cell-targeted therapeutics and delivery strategies. *Expert Opin. Drug Deliv.* **0**, (2017).
3. Bruttel, V. S. & Wischhusen, J. Cancer stem cell immunology: Key to understanding tumorigenesis and tumor immune escape? *Front. Immunol.* **5**, 1–13 (2014).
4. Tomasetti, C., Li, L. & Vogelstein, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer stiology, and cancer prevention. *Cancer Etiol.* **80**, 1330–1334 (2017).
5. Meacham, C. E. & Morrison, S. J. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* **501**, 328–337 (2013).
6. Kreso, A. & Dick, J. E. Review Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Stem Cell* **14**, 275–291 (2014).
7. Muders, M. H. & Dubrovskaja, A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* (2014). doi:10.1016/j.semcancer.2014.06.004
8. Sampieri, K. & Fodde, R. Cancer stem cells and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 187–193 (2012).
9. Colak, S. & Medema, J. P. Cancer stem cells – important players in tumor therapy resistance. *FEBS J.* **281**, 4779–4791 (2014).
10. Li, X. *et al.* Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI* **100**, 672–679 (2008).
11. Charafe-jauffret, E. *et al.* Breast cancer cell lines contain functional Cancer Stem Cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* **69**, 1302–1313 (2009).
12. Takebe, N. *et al.* Pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat. Publ. Gr.* (2015). doi:10.1038/nrclinonc.2015.61
13. Prud, G. J. Cancer Stem Cells and Novel Targets for Antitumor Strategies. 2838–2849 (2012).
14. Charafe-Jauffret, E. *et al.* Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 45–55 (2010).
15. Ono, M. *et al.* Exosomes from bone marrow mesenchymal stem cells contain a microRNA that promotes dormancy in metastatic breast cancer cells. **7**, 1–11 (2014).
16. Climate, B., Dyck, V., Phylogenies, T. F. & Compare, E. P. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432**, (2004).
17. Liu, S. *et al.* Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports* **2**, 78–91 (2014).
18. Jing, F. *et al.* Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int. J. Oncol.* **46**, 1582–1588 (2015).
19. Leon, G., Macdonagh, L., Finn, S. P., Cuffe, S. & Martin, P. Cancer Stem Cells in

- Drug Resistant Lung Cancer: Targeting Cell Surface Markers and Signaling Pathways. *Pharmacol. Ther.* (2015). doi:10.1016/j.pharmthera.2015.12.001
20. Parmiani, G. Melanoma Cancer Stem Cells : Markers and Functions. 4–8 (2016). doi:10.3390/cancers8030034
 21. Fitzgerald, T. L. & Mccubrey, J. A. Advances in Biological Regulation Pancreatic cancer stem cells : Association with cell surface markers , prognosis , resistance , metastasis and treatment. *Adv. Biol. Regul.* 1–6 (2014). doi:10.1016/j.jbior.2014.05.001
 22. Harris, K. S. & Kerr, B. A. Prostate Cancer Stem Cell Markers Drive Progression , Therapeutic Resistance , and Bone Metastasis. *Stem Cell Int.* **2017**, (2017).
 23. Ho, T. *et al.* Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood* **128**, 1671–1679 (2018).
 24. Krasnapolski, M. A., Todaro, L. B., Bal, E. & Joffé, D. K. Is the Epithelial-to-Mesenchymal Transition Clinically Relevant for the Cancer Patient? *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12**, 1891–1899 (2011).
 25. Yang, M., Imrali, A. & Heeschen, C. Circulating cancer stem cells : the importance to select. *Chinese J. Cancer Res.* **27**, 437–449 (2015).
 26. Zhou, L., Dicker, D. T., Matthew, E., El-deiry, W. S. & Alpaugh, R. K. Circulating tumor cells : silent predictors of metastasis. *F1000Research* **6**, 1–8 (2017).
 27. Krebs MG, Sloane R, Priest L, Lancashire L, Hou JM, Greystoke A, Ward TH, Ferraldeschi R, Hughes A, Clack G, Ranson M, Dive C, B. F. Evaluation and prognostic significance of circulating tumor cells in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **12**, (2011).
 28. Barriere, G. *et al.* Circulating tumor cells and epithelial , mesenchymal and stemness markers : characterization of cell subpopulations. *Ann. Transl. Med.* **2**, 1–8 (2014).
 29. Chen, K., Huang, Y. & Chen, J. Understanding and targeting cancer stem cells : therapeutic implications and challenges. *Nat. Publ. Gr.* 1–9 (2013). doi:10.1038/aps.2013.27
 30. Pindiprolu, S. K. S. S., Krishnamurthy, P. T. & Chintamaneni, P. K. Pharmacological targets of breast cancer stem cells : a review. *Naunyn-Schmiedeberg's Pharmacol* (2018).
 31. Lapidot Tsvee, Sirard Christian, Vormoor Josef, Murdoch Barbara, Hoang Trang, Caceres-Cortes Julio, Minden Mark, Paterson Bruce, Caliguri Michael, D. J. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367**, 645–648 (1994).
 32. Al-hajj, M., Wicha, M. S., Benito-hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Cell Biol.* **100**, 3983–3988 (2003).
 33. Berardi, D. E. *et al.* Myoepithelial and luminal breast cancer cells exhibit different responses to all-trans retinoic acid. *Cell. Oncol.* **38**, 289–305 (2015).
 34. Valachis, A. *et al.* Trastuzumab combined to neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast* **20**, 485–90 (2011).

35. Korkaya, H., Paulson, A., Iovino, F. & Wicha, M. S. HER2 regulates the mammary stem/progenitor cell population driving tumorigenesis and invasion. *Oncogene* **27**, 6120–30 (2008).
36. Paik, S. *et al.* Real-world performance of HER2 testing--National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project experience. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 852–4 (2002).