



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**BRUNA CRISTINA MOURA DAVID**

**CÉLULAS TRONCO DO CÂNCER**

PIRACICABA  
2021

**BRUNA CRISTINA MOURA DAVID**

**CÉLULAS TRONCO DO CÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Edgard Graner

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO PELA ALUNA BRUNA CRISTINA MOURA DAVID E ORIENTADA PELO PROF. DR. EDGARD GRANER.

PIRACICABA

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

D28c David, Bruna Cristina Moura, 1996-  
Células tronco do câncer / Bruna Cristina Moura David. – Piracicaba, SP :  
[s.n.], 2021.

Orientador: Edgard Graner.  
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Células-tronco neoplásicas. 2. Metabolismo. 3. Metástase. I. Graner,  
Edgard, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

**Palavras-chave em inglês:**

Neoplastic stem cells

Metabolism

Neoplasm metastasis

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 15-10-2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Clodoaldo e Ana, ao meu irmão, Victor, e a minha avó, Servita, por todo incentivo, apoio e amor incondicional que tive ao longo dos anos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Edgard Graner, pela oportunidade, pela orientação e pelo cuidado durante toda a realização deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, por permitir que esse trabalho tenha sido realizado.

## RESUMO

As neoplasias malignas contêm populações heterogêneas de células em vários estados de proliferação e diferenciação. A presença de células tronco do câncer (CTC) e de células iniciadoras de tumor são conceitos recentemente estabelecidos, nos quais células quiescentes e pouco diferenciadas dentro de uma massa tumoral contribuem para a resistência aos medicamentos, e, sob condições permissivas, são responsáveis pelas recidivas e pelas metástases regionais ou à distância. Esse trabalho avaliou o papel das CTC por meio da literatura científica atual. O isolamento das CTC tem permitido estudos aprofundados sobre o seu estado metabólico. Ao contrário das células tronco oriundas de tecidos normais, que dependem fortemente da fosforilação oxidativa (OXPHOS) como fonte primária de energia, ou das células malignas que fazem parte da maior parte da massa tumoral, que são principalmente glicolíticas, as CTC demonstram uma flexibilidade metabólica singular. As CTC podem alternar entre OXPHOS e glicólise na presença de oxigênio para manter a homeostase e, assim, promover e preservar o crescimento tumoral. As CTC são caracterizadas por se localizarem próximo aos vasos sanguíneos, em microambientes tumorais onde outros tipos celulares ali presentes podem favorecer o seu crescimento e multiplicação, e, devido a alterações em seu fenótipo (transição epitelial-mesenquimal e transição mesenquimal-epitelial), são capazes de migrar e de escapar da identificação pelo sistema imune do paciente e de formarem novos focos tumorais à distância. Acredita-se hoje que o controle dos mecanismos responsáveis pela sobrevivência das CTC aos tratamentos oncológicos já existentes seja uma boa alternativa para se evitar a formação de metástases e de recidivas, principais causas de morte dos pacientes oncológicos. Além disto, destacamos estudos sobre outros potenciais alvos terapêuticos, incluindo interações complexas dentro do microambiente e comunicações celulares nos nichos da CTC, para desta forma interferir no crescimento, resistência à agentes terapêuticos e disseminação metastática.

**Palavras-chave:** Células-tronco neoplásicas. Metabolismo. Metástase.

## **ABSTRACT**

Malignant tumors contain heterogeneous populations of cells in distinct states of proliferation and differentiation. The existence of cancer stem cells (CTC) and tumor initiating cells are now recognized and indicate that quiescent and poorly differentiated cells within a tumor mass contribute to drug resistance, and under permissive conditions, are the responsible for tumor recurrence and regional or distant metastasis. The present work evaluated the role of CTC through the analysis of current scientific literature. The isolation of CTC has allowed in-depth studies of their metabolic status. Unlike normal tissue stem cells, which rely mainly on oxidative phosphorylation (OXPHOS) as a primary source of energy, or the malignant cells that form the bulk of solid tumors, which are primarily glycolytic, CTC demonstrate a unique metabolic flexibility and can switch between OXPHOS and glycolysis in the presence of oxygen to maintain homeostasis and thus promote and facilitate tumor growth. CTC are generally found near blood vessels within tumor microenvironments where the interaction with other cell types favor their growth and multiplication, and due to changes in their phenotype (epithelial-mesenchymal transition and mesenchymal-epithelial transition) are able to migrate out of the primary tumor mass, escape from patient's immune system, and form new distant tumor foci. It is now well accepted that the control of mechanisms responsible for the survival of CTC against current cancer treatments is a potential alternative to avoid metastatic spread and relapses, the main causes of death in cancer patients. In addition, here we highlight studies on other potential therapeutic targets, including complex interactions within the microenvironment and cellular communications in the CTC niches in order to interfere with tumor growth, resistance to therapeutic agents and metastasis.

**Key words:** Neoplastic stem cells. Metabolism. Metastasis.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 PROPOSIÇÃO	11
3 REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1 Câncer: Evolução clonal ou modelo hierárquico?	12
3.2 O metabolismo das CTC	14
3.2.1 Via glicolítica	15
3.2.2 Via Mitocondrial (OXPHOS)	16
3.2.3 Plasticidade metabólica das CTC	16
3.2.4 Subpopulações celulares em neoplasias malignas	17
3.3 Os marcadores moleculares e a identificação de CTC	18
3.3.1 Marcadores de superfície de CTC expressos em hESCs, mas raramente expressos em células normais	18
3.3.2 Marcadores de superfície de CTC expressos em células tronco adultas, mas raramente expressas em células normais	20
3.3.3 Marcadores de superfície de CTC expressos tanto em células tronco quanto em células normais	21
3.4 O microambiente tumoral	22
3.4.1. A origem do estroma tumoral	23
3.4.2 Fibroblastos associados a tumores (TAFs) ou fibroblastos associados ao câncer (CAFs)	24
3.4.3 Células do sistema imune no estroma associado às neoplasias malignas	25
3.5 Novas terapias dirigidas contra CTC: Resistência aos agentes quimioterápicos convencionais atualmente em uso clínico	26
4 DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	43

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento científico sobre a formação e progressão do câncer se expandiu de forma explosiva nas duas últimas décadas. Sabe-se que as neoplasias malignas são estruturas complexas, compostas por células tumorais que sofreram mutações genéticas prévias e que necessitam de interações com os tecidos saudáveis adjacentes para garantir a sua sobrevivência (Hanahan e Weinberg, 2011). Os cânceres hoje são considerados como tecidos heterogêneos que contém uma variedade de células originadas a partir de um subconjunto único e raro de células tumorais com capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares (Visvader e Lindeman, 2008). Subconjuntos raros de células malignas com propriedades semelhantes às células-tronco encontradas nos tecidos humanos normais, chamadas de células tronco do câncer (CTC), parecem ser os responsáveis pelo início, progressão e disseminação do câncer para estruturas anatômicas adjacentes ou órgãos distantes (Visvader e Lindeman, 2008).

O câncer agora tende a ser considerado como uma doença de células-tronco. Hoje, é possível classificar as células-tronco do organismo humano em: embrionárias, somáticas ou adultas, e tumorais. Apesar de promoverem uma doença, as CTC compartilham das mesmas habilidades das demais células-tronco do organismo, como a capacidade de autorrenovação, além de serem capazes também de dar origem a uma diversidade de células diferenciadas que resulta na formação e no crescimento tumoral (Girouard e Murphy, 2011).

A presença das CTC é um conceito bem estabelecido onde células quiescentes e pouco diferenciadas dentro de uma massa tumoral contribuem para a resistência e sobrevivência aos medicamentos e tratamentos quimioterápicos atualmente em uso na prática clínica (Mannelli e Gallo, 2012; Okamoto et al., 2009; Nör et al., 2014). Em condições específicas e permissivas, estas células parecem ser responsáveis pelos processos de recidiva e metástase (Rodini et al., 2017), os principais desafios enfrentados durante o tratamento de pacientes com os mais variados tipos de neoplasias malignas. Já na década de 1990, a ideia de uma organização hierárquica dentro dos tumores foi introduzida com o primeiro relato de identificação prospectiva de CTC realizado em leucemia mieloide aguda (LMA), no qual o perfil de marcadores de superfície das células-tronco leucêmicas foi definido como positividade para CD34 e negatividade para CD38 (Bonnet e Dick, 1997).

Nos anos subsequentes, os pesquisadores passaram a utilizar marcadores moleculares para identificar e isolar as CTC de vários tumores de natureza sólida (Langenkamp et al., 2009), o que permitiu a realização dos estudos mais recentes sobre o estado metabólico destas importantes subpopulações celulares. Ainda não há um consenso

geral na literatura sobre os marcadores moleculares de CTC e nem tampouco sobre as suas exatas características e habilidades metabólicas, no entanto, vários estudos indicam que estas células são principalmente glicolíticas (Ciavardelli et al., 2014; Shen et al., 2015), embora outros apontem que o metabolismo mitocondrial como constitui sua principal fonte de energia (Palorini et al., 2013; Pastò et al., 2014). As CTC também parecem adaptar seu metabolismo às mudanças microambientais, deslocando convenientemente a produção de energia de um caminho para outro ou adquirindo fenótipos metabólicos intermediários (Baudot et al., 2010). A determinação do papel do metabolismo das CTC na patogênese das neoplasias malignas tornou-se um foco muito importante na pesquisa básica e clínica sobre o câncer, com muitos esforços dos cientistas e dinheiro das agências de fomento à pesquisa aplicado no sentido de descobrir novos alvos com aplicação clínica direta.

## **2 PROPOSIÇÃO**

Esse trabalho tem como objetivo principal fazer uma revisão da literatura científica sobre as chamadas células tronco do câncer (CTC), visando organizar e facilitar o entendimento dos conhecimentos alcançados nos últimos anos sobre esta importante hipótese que descreve a organização hierárquica das células dentro de uma neoplasia maligna e suas consequências para seu crescimento e disseminação metastática.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Muitas pesquisas realizadas durante as últimas décadas têm demonstrado que, ao contrário do que se acreditava anteriormente, o câncer é um tecido complexo, formado por células neoplásicas ou tumorais (modificadas do ponto de vista genético e funcional) as quais precisam realizar uma série de interações com células adjacentes do microambiente (morfologicamente normais e teoricamente saudáveis) para obter sustentação e dar prosseguimento ao crescimento neoplásico. Este complexo conjunto de interações entre células e entre células e componentes da MEC faz com que as neoplasias malignas se tornem capazes de crescer de maneira indefinida e ultrapassem as barreiras naturais anatômicas e imunológicas que defendem os organismos que as hospedam.

De um lado temos a teoria mais antiga, que se manteve aceita por décadas pela comunidade científica, a chamada teoria da “evolução clonal” ou também conhecida como teoria “estocástica” (Nowell, 1976). Esta descreve as células das neoplasias malignas como formadoras de uma comunidade ou “tecido” relativamente homogêneo, com capacidade de proliferar e de se modificar com o passar do tempo devido a somatória de mutações ocorridas de forma aleatória, criando subpopulações de origem clonal dentro do tumor. Em outras palavras, de acordo com esta hipótese, não há seletividade ou funções distintas entre as células neoplásicas malignas, uma vez que cada célula possuiria capacidade semelhante de, em decorrência do tipo de mutações sofridas ao longo do tempo, manter o crescimento dos tumores primários e suas recidivas e ainda gerar as metástases regionais ou à distância. Neste modelo, a heterogeneidade do tumor significa que diferentes células malignas carregam características morfológicas e fenotípicas distintas, de acordo com o padrão de expressão gênica, do metabolismo e das características do microambiente onde elas se encontram.

Em contrapartida às ideias já bem sedimentadas e com razoável sentido biológico da teoria da “evolução clonal”, nos deparamos hoje na literatura científica o chamado “modelo hierárquico” ou “modelo das células tronco do câncer (CTC)” (Bonnet e Dick, 1997). Esta ideia, proposta já há vários anos e em bastante evidência nesta última década, pressupõe que as neoplasias malignas são hierarquicamente organizadas, com as CTC ocupando o ápice desta organização como as responsáveis diretas pelo desenvolvimento, manutenção do crescimento e pelo potencial de geração de metástases. Dentro desta hipótese (Clarke et al., 2006), os pesquisadores alegam que as CTC compõem uma subpopulação de células tumorais com capacidade de autorrenovação e de diferenciação celular, sendo as únicas células dentro dos tumores malignos que possuem capacidade ilimitada de multiplicação e que são capazes de produzir novas gerações de células heterogêneas. Segundo os cientistas

que são favoráveis a esta teoria, as CTC são também responsáveis pela geração de células com características fenotípicas específicas que permitem a emissão de metástases, neste caso, chamadas de células iniciadoras de metástases (MICs), que constituem as causas mais frequentes de óbito dos pacientes com câncer.

Está bem estabelecido que os tumores primários derramam constantemente um grande número de células malignas na circulação sanguínea e/ou linfática, mas apenas uma pequena fração destas células é capaz de formar metástases clinicamente evidentes. O ambiente hostil e a tremenda taxa de desgaste que ocorre durante o processo de metástase sugere a existência da singular subpopulação de MICs. As MICs possuem características vantajosas que podem ter origem no tumor primário, mas continuam a evoluir durante os processos da disseminação e de colonização, adquirindo plasticidade celular, reprogramação metabólica, capacidade de entrada e saída de dormência, resistência à apoptose, evasão imunológica e capacidade de agregação com outras células tumorais e estromais (Celià-Terrassa e Kang, 2016).

O conceito de CTC não é, na verdade, recente e foi proposto pela primeira vez por Stevenes (1959). Os primeiros estudos científicos capazes de identificar estas populações celulares foram feitos por Lapidot et al. (1994) e Bonnet e Dick (1997), os quais conseguiram isolar CTC de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda e em seguida implantá-las e mantê-las em camundongos imunocomprometidos. Este tipo de célula maligna foi selecionado com base em marcadores de superfície encontrados em células-tronco normais, que possuem capacidades semelhantes de autorrenovação, de proliferação e de diferenciação, e são capazes de gerar outras linhagens de células com as mesmas propriedades nos tumores provocados *in vivo* em modelos animais.

Depois que as CTC foram identificadas também em tumores malignos sólidos originários na glândula mamária, na próstata e no cólon, Prince et al. (2007) foram capazes de sugerir marcadores moleculares específicos para a superfície das CTC, como por exemplo a molécula CD44 (uma glicoproteína transmembrana envolvida na adesão celular). Em teoria, as células tumorais que expressam este marcador na superfície externa de suas membranas têm características semelhantes às células-tronco existentes nos tecidos normais, sendo por esta razão capazes de recriar ou reproduzir o tumor doador em camundongos imunossuprimidos, após a implantação em condições experimentais favoráveis.

Por conta da grande gama de características atribuídas às CTC, a Associação Americana para Pesquisa sobre o Câncer (AACR) passou a considerar, no ano de 2006, que estas células estão realmente presentes dentro dos tumores malignos e que possuem a

capacidade de autorrenovação e de diferenciação para gerar todas as linhagens heterogêneas de células que os compõem (Clarke et al., 2006).

### **3.2 O metabolismo das CTC**

Mesmo após as muitas pesquisas já realizadas sobre as CTC, ainda não há consenso geral sobre dois aspectos muito importantes: 1) sua origem, ou seja, se são provenientes unicamente da transformação de células-tronco normais (Satpute et al., 2013) ou se também podem ser derivadas de células já diferenciadas que adquiriram, com o passar do tempo, propriedades de autorrenovação como consequência de alterações genéticas e epigenéticas (Visvader e Lindeman, 2008), e 2) suas características metabólicas, se baseadas principalmente na via glicolítica ou se têm o metabolismo mitocondrial como a principal fonte de energia.

Embora as CTC compartilhem certas características biológicas com as células-tronco dos tecidos normais, como por exemplo a capacidade de autorrenovação, elas têm propriedades que contribuem para os processos de progressão tumoral, de resistência aos diversos agentes quimioterápicos clinicamente em uso e também de recidiva das neoplasias malignas. Uma vez que estas características biológicas forem precisamente identificadas, experimentalmente confirmadas e tiverem seus mecanismos biológicos subjacentes compreendidos, será possível desenvolver novas terapias com foco na eliminação das CTC sem danificar, pelo menos com gravidade, as células normais e alcançar a cura definitiva dos pacientes portadores de vários tipos de câncer.

Em particular, as possíveis diferenças existentes entre as propriedades metabólicas das CTC e as demais células que compõe a massa tumoral (também conhecidas como “bulk” tumoral) podem representar alvos muito promissores para o tratamento. Ao contrário das células tronco dos tecidos humanos normais, que dependem fortemente da fosforilação oxidativa (OXPHOS) como fonte primária de energia, ou mesmo das demais células tumorais, que são principalmente glicolíticas, as CTC parecem demonstrar uma interessante flexibilidade metabólica. Desta forma, as CTC podem alternar entre OXPHOS e glicólise na presença de oxigênio para manter a homeostase (Baudot et al., 2010), embora estudos mais recentes demonstrem também a via neolipogênica como base de sustentação para o crescimento tumoral, pois não só satisfaz a demanda de energia como também contribui para a ativação de várias importantes vias de sinalização oncogênica (Chae e Kim, 2018; Yi et al., 2018). É importante ressaltar que células com diferentes fenótipos terão necessidades

metabólicas substancialmente distintas, o que, por sua vez, pode resultar em respostas variadas frente as terapias metabólicas.

### 3.2.1 Via glicolítica

O processo de glicólise é muito bem conhecido e envolve a quebra da glicose por meio de uma série de reações enzimáticas para produzir piruvato, duas moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Em condições normóxicas, o piruvato é transportado para as mitocôndrias onde é convertido em acetil coenzima A (acetil-CoA). Acetil-CoA, por sua vez, entra no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) para produzir elevadas quantidades de energia sob a forma de moléculas de NADH e flavina-dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>). Os íons de hidrogênio de NADH desencadeiam a cadeia de transporte de elétrons e permitem a geração de até 32 moléculas de ATP por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (San-Millán e Brooks, 2016). Uma vez que o OXPHOS produz mais moléculas de ATP do que glicólise, as células normais dependem principalmente deste mecanismo como fonte eficiente de produção de energia, que pode ter o funcionamento prejudicado em condições hipóxicas, devido à escassez de oxigênio.

Estudos realizados em vários tipos de neoplasias malignas humanas, como as de mama, pulmão, ovário e cólon, têm sugerido que as CTC tendem a ser mais glicolíticas do que as outras células malignas mais diferenciadas que compõe a massa tumoral, as quais metabolizam preferencialmente a glicose através da respiração mitocondrial ou OXPHOS (Ciavardelli et al., 2014). Há também pesquisas demonstrando que a expressão elevada de algumas enzimas glicolíticas (transportador de glicose 1 - GLUT1, hexoquinase-1 - HK-1 e piruvato desidrogenase quinase - PDK-1) e o conseqüente aumento da importação da glicose para o citoplasma são fatores importantes para aumentar proliferação celular (Kondoh et al., 2005). A glicólise também foi identificada como a via metabólica preferida das CTC dos carcinomas nasofaríngeo e hepatocelular (Shen et al., 2015).

As células malignas da massa tumoral conseguem gerar moléculas de ATP via glicólise mesmo sob condições normóxicas, o que é conhecido na literatura como o efeito Warburg (Warburg, 1956). Assim, a absorção de glicose, expressão de enzimas glicolíticas, produção de lactato e de ATP são significativamente aumentadas nas CTC, em comparação com as outras células tumorais. Este fenótipo predominantemente glicolítico parece estar associado a uma diminuição da OXPHOS mitocondrial.

### **3.2.2 Via Mitochondrial (OXPHOS)**

Trabalhos de pesquisa relativamente recentes têm apontado o metabolismo oxidativo mitocondrial como sendo a forma preferida de produção de energia pelas CTC, que consome menos glicose, produz menos lactato e termina com níveis mais elevados de ATP (Pastò et al., 2014; Palorini et al., 2013).

Um estudo recente mostrou que as células-tronco normais repartem as mitocôndrias envelhecidas assimetricamente entre as suas células filhas, que de fato terão destinos diferentes: as células filhas que recebem menos mitocôndrias antigas mantêm características de células-tronco, enquanto que as células filhas com um maior conteúdo de mitocôndrias envelhecidas estão mais propensas ao processo de diferenciação (Katajisto et al., 2015). Esta divisão assimétrica das mitocôndrias requer o funcionamento preciso do trabalho de fissão mitocondrial, que restringe espacialmente as antigas mitocôndrias à região perinuclear da célula mãe. De fato, o aumento da fissão mitocondrial parece ser uma característica das CTC e a sua inibição farmacológica ou genética pode levar à perda das suas características originais ou de diferenciação (Katajisto et al., 2015; Xie et al., 2015). Assim, os mecanismos de controle envolvidos na ordenação assimétrica de mitocôndrias mais velhas e as jovens, tais como a fissão mitocondrial, também parecem desempenhar um papel importante na manutenção das CTC.

Além disto, as CTC podem também utilizar a oxidação dos ácidos graxos mitocondriais (OAG) para a geração de ATP e NADH (Pastò et al., 2014;). A OAG é fundamental nos processos de autorrenovação de células tronco-normais e CTC iniciadoras de leucemia, bem como na sobrevivência de células epiteliais malignas durante o seu descolamento na MEC (Prigione et al., 2010).

### **3.2.3 Plasticidade metabólica das CTC**

Como descrito nos parágrafos anteriores, as diferenças observadas e descritas no perfil metabólico das CTC originárias de vários tipos de neoplasias malignas são multifatoriais e muito pouco compreendidas até o momento, sendo atribuídas à plasticidade metabólica presente nestas células (Peiris-Pagès et al., 2016). Uma causa para este fenômeno pode ser a falta de uniformidade e de precisão na própria definição dos critérios utilizados para a seleção e identificação das CTC. Desta forma, técnicas laboratoriais diferentes utilizadas no momento do isolamento, tais como escolha de marcadores moleculares específicos, seleção com base na coloração Hoechst, na resistência a quimioterápicos ou mesmo reoxigenação

após um período sob hipóxia, podem afetar o fenótipo das células selecionadas ou mesmo isolar células de natureza completamente distinta (Tang et al., 2007).

Outro potencial fator que pode adicionar complexidade ao entendimento do metabolismo das CTC e explicar os eventuais resultados contraditórios existentes na literatura científica é o tipo de microambiente ao qual as CTC estão expostas. É possível distinguir-se o perfil metabólico das CTC em três regiões distintas dentro das neoplasias malignas: a) regiões nas quais as células malignas estão em normóxia, b) áreas nas quais as células estão em estado hipóxico, e, por fim, c) áreas metastáticas. Por exemplo, a maioria dos estudos *in vitro* são realizados em concentrações não fisiológicas muito elevadas de glicose e de oxigênio, o que favorece o estabelecimento de um fenótipo mais glicolítico. As condições experimentais ideais para preservar ou manter intactos os traços metabólicos das CTC seriam mais preservados pelo isolamento direto dos tumores provenientes dos pacientes seguido da análise imediata ou dentro dos primeiros passos da cultura *in vitro*. De fato, quando são estudadas CTC derivadas de pacientes em culturas celulares de poucas passagens em laboratório, a OXPHOS parece ser a via metabólica preferencial para a produção de energia (Chen et al., 2016; Tang et al., 2007).

Por outro lado, outros estudos associam a plasticidade metabólica à aquisição de resistência terapêutica, mostrando que embora a maioria das CTC tenham uma maleabilidade metabólica limitada e dependam predominantemente de OXPHOS, uma subpopulação de CTC resistente à metformina, um inibidor do complexo OXPHOS I, é capaz de adquirir um fenótipo glicolítico intermediário e adaptar-se à nova condição (Sancho et al., 2015). Esta plasticidade metabólica adaptativa pode permitir às CTC sobreviver em ambientes mutáveis, por vezes hostis, ou a circunstâncias desfavoráveis naturalmente desenvolvidas pela própria progressão e crescimento do tumor.

### **3.2.4 Subpopulações celulares em neoplasias malignas**

Com base nos dados disponíveis até o momento na literatura científica, podemos observar que o fenótipo das CTC pode variar muito entre os tipos de câncer e entre populações dentro de tumores semelhantes. As vias metabólicas preferenciais para a produção de energia dependem de vários fatores, incluindo o sítio onde as metástases ocorreram, o que pode, por sua vez, realçar ou modificar vias metabólicas (Yi et al., 2018). Publicações recentes implicam a existência de células malignas, principalmente em metástases, com a preferência pelo padrão epitelial após sofrerem a chamada transição mesenquimal para epitelial - MET a partir de células com fenótipo mais mesenquimal ou migratório, que passaram pelo fenômeno de transição epitelial para mesenquimal – EMT

dentro do tumor primário. Os fatores determinantes dos fenômenos de EMT/MET parecem também regular o metabolismo celular e seus metabólitos associados, como por exemplo glutamina, glutamato, alanina, além de elevadas concentrações de lactato, que parecem estar ligados à capacidade de sobrevivência e ao potencial metastático de carcinomas mamários (Chae e Kim, 2018).

As CTC com fenótipo de EMT parecem favorecer a glicólise e ter redução acentuada no consumo de oxigênio, diminuição da massa mitocondrial e do potencial de membrana, menor produção de ERO e maior capacidade antioxidante em comparação com as células com o fenótipo MET (Yi et al., 2018). Finalmente, estudos recentes mostraram que as células altamente metastáticas aumentam tanto a glicólise como as vias de OXPHOS, em comparação com células com o mesmo “background” genético que carecem de potencial metastático (Ye et al., 2011; Dupuy et al., 2015). O metabolismo das CTC parece assim ser bastante heterogêneo, com programas metabólicos distintos e ativados em diferentes subpopulações de células malignas, dependendo da composição do microambiente onde estas se encontram.

### **3.3 Os marcadores moleculares e a identificação de CTC**

A maioria dos marcadores usados para identificar CTC são derivados de marcadores de superfície presentes em células-tronco embrionárias humanas (hESCs) ou de células-tronco de tecidos adultos. Mais especificamente, aproximadamente 73% das moléculas atualmente reconhecidas como marcadores de superfície de CTC estão nestas células e raramente são expressos em células dos tecidos humanos normais adultos e diferenciados. Outros marcadores de superfície sugeridos para CTC são expressos mesmo em células normais, e, alguns deles, amplamente validados como marcadores de superfície CTC por vários grupos de pesquisa.

#### **3.3.1 Marcadores de superfície de CTC expressos em hESCs, mas raramente expressos em células normais**

CD133 (Prominina-1) é uma proteína glicosilada, com cinco domínios transmembrânicos e dois grandes “loops” extracelulares (Grosse-Gehling et al., 2012). A função biológica exata de CD133 ainda permanece desconhecida, mas esta proteína de superfície parece contribuir para a organização da topologia da membrana celular (Irollo e Pirozzi, 2013). CD133 foi inicialmente descoberto como um alvo para o anticorpo monoclonal

AC133 (MAb), específico para a população CD34 positiva de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) (Yin et al., 1997). O CD133 é expresso na superfície dos hESCs (Sundberg et al., 2009) e de células tronco neurais (NSCs) (Uchida et al., 2000), o que é significativamente reduzido durante o processo de diferenciação dos hESCs, reforçando a hipótese de que a expressão CD133 seria restrita a hESCs indiferenciadas (Sundberg et al., 2009). Esta molécula representa um dos marcadores de superfície mais frequentemente estudados em neoplasias malignas sólidas (Grosse-Gehling et al., 2012) e consegue identificar populações de CTC em tumores de mama, cérebro, pulmão, pâncreas, fígado, próstata, ovário, cólon e também de cabeça e pescoço, as quais são capazes de gerar tumores em camundongos imunocomprometidos de forma mais eficiente que a contrapartida negativa para CD133 (Grosse-Gehling et al., 2012). A utilização de CD133 como alvo terapêutico parece ter efeitos colaterais mínimos no organismo humano, sugerindo que a expressão do CD133 deve ser baixa em células-tronco normais (Schmohl e Vallera, 2016).

CD24 é uma sialoproteína fortemente glicosilada, ancorada por glicosil fosfatidilinositol (GPI) e raramente expressa em tecidos normais, exceto nos precursores das células B, neutrófilos, neurônios e alguns tipos de células epiteliais (Kristiansen et al., 2003). Embora CD24 seja expresso em linhagens neuronais humanas, ele é produzido em grandes quantidades por hESCs indiferenciadas (Bianco e Salomon, 2010). O fato desta molécula ser detectada em uma grande variedade de cânceres humanos faz com que ela seja proposta por alguns estudiosos no assunto como um marcador para seleção de CTC (Al-Hajj et al., 2003; Zhang et al., 2011). A combinação de CD24 com CD44 é usada para identificar as CTC existentes em tumores da glândula mamária, já que as células positivas para CD44 e com baixa expressão de CD24 (CD44+/CD24<sup>low</sup>) parecem possuir atividade tumorigênica e apresentar propriedades semelhantes às células-tronco normais. (Al-Hajj et al., 2003).

CD10, CD117 e CD26 são moléculas alvo de drogas já aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA). CD10 é uma metalopeptidase ligada à membrana celular que inativa vários hormônios peptídeos, incluindo glucagon, substância P, oxitocina e bradicinina (Galy et al., 1995). Os progenitores hematopoiéticos positivos para CD10 são progenitores linfóides comuns que podem se diferenciar em células T, B, ou células “natural killer” (NK) (Galy et al., 1995). A molécula CD10 é expressa em hESCs indiferenciadas, o que é reduzido durante o processo de diferenciação neural (Bianco e Salomon, 2010). Estudos recentes mostraram que em células de carcinomas de cabeça e pescoço (HNSCC) e carcinomas mamários CD10 parece atuar como um marcador de resistência terapêutica e da presença de CTC (Fukusumi et al., 2014). A proteína CD117 (c-Kit) é um membro da família de receptores tirosina-quinase fator de células-tronco, tendo expressão muito baixa em células normais.

Subpopulações de hESCs (aproximadamente 24%) são positivas para CD117 (Bianco e Salomon, 2010; Carpenter et al., 2004), nas quais esta molécula está envolvida na transdução de sinais de sobrevivência e de autorrenovação (Miettinen e Lasota, 2005). As células positivas tanto para CD44 como para CD117 (CD44+CD117+) isoladas de uma linhagem de células epiteliais derivada de carcinoma ovariano humano (SKOV-3) possuem propriedades de CTC, exibindo maior resistência à quimioterapia (Chen et al., 2013).

### **3.3.2 Marcadores de superfície de CTC expressos em células tronco adultas, mas raramente expressas em células normais**

A proteína CD34, primeiramente detectada na superfície de células progenitoras hematopoiéticas (Civin et al., 1984), é pouco expressa em tecidos humanos normais, exceto em células progenitoras da linhagem hematopoiética (Sutherland et al., 1990). Como mencionado em tópico anterior deste trabalho, as primeiras evidências da existência das CTC surgiram de estudos sobre leucemia mieloide aguda (LMA) humana, nos quais células-tronco leucêmicas foram identificadas como uma subpopulação de células positivas para CD34 e negativas para CD38 (CD34+/CD38-) (Bonnet e Dick, 1997).

CD114, por sua vez, é um receptor de citocinas que desempenha um papel importante na granulopoiese durante o processo inflamatório. Está presente nas células precursoras da medula óssea e inicia a proliferação e diferenciação celular em granulócitos maduros e macrófagos, em resposta à estimulação por G-CSF (Ward, 2007). O CD114 foi identificado como um potencial marcador para CTC de tumores derivados da crista neural, como os melanomas malignos e neuroblastomas (Zage et al., 2017).

As proteínas CD20 e CD96 são expressas em células das linhagens B e T, respectivamente. A função do CD20 não está ainda elucidada durante o desenvolvimento das células B (O'Keefe, 1998), no entanto, esta molécula de superfície tem sido proposta como um marcador para o melanoma maligno (Smith, 2003). Os melanomas têm uma subpopulação celular que é positiva para CD20 e que contribui para a heterogeneidade deste tipo de tumor e parece favorecer o seu processo de tumorigênese (Fang et al., 2005). CD96, por sua vez, funciona como um receptor específico para células T (Wang, 1992) e consiste numa glicoproteína transmembrânica presente tanto em células T como NK humanas e de camundongos (Martinet e Smyth, 2015), não sendo expresso pela maior parte das HSCs normais, porém produzida por células-tronco leucêmicas (Garg et al., 2013).

### 3.3.3 Marcadores de superfície de CTC expressos tanto em células tronco quanto em células normais

CD9 (MRP-1) é uma glicoproteína da família das tetraspaninas que modula os processos de adesão, migração e proliferação celular (Zöller, 2009) e atua como um proposto marcador de superfície celular para hESCs indiferenciadas (Carpenter et al., 2004). A expressão da proteína CD9 pode ser detectada na maioria dos tecidos humanos normais, entretanto, sua expressão é muito fraca ou ausente em células da vesícula biliar, do fígado e de tecidos linfoides. Esta molécula parece ser um marcador útil para identificar CTC em leucemia linfoblástica aguda (B-ALL), onde é expressa pela maioria das células, correlaciona-se com a expressão de CD34 e está associada a várias vias de sinalização envolvidas na regulação das propriedades das CTC em B-ALL (Yamazaki et al., 2011). CD166 (molécula de adesão celular leucocitária ativada) é uma glicoproteína de membrana tipo I que pertence a superfamília das imunoglobulinas. É fracamente expressa em hESCs indiferenciadas (Bianco e Salomon, 2010) e está presente nas células-tronco do tecido adiposo humano e em células-tronco intestinais (Zannettino et al., 2007). Embora CD166 seja um marcador para CTC de carcinomas colorretais (Levin et al., 2010) também foi apontado como um marcador de superfície para CTC provenientes de carcinomas de pulmão de células não pequenas (NSCLC) (Tachezy et al., 2014).

Já CD44, um receptor de superfície para ácido hialurônico, é um dos marcadores para CTC mais frequentemente estudado em várias neoplasias malignas, sendo uma molécula multiestrutural e multifuncional cujo papel é governado por várias e complexas modificações de natureza pós-traducional (Thapa e Wilson, 2016). A família CD44 tem muitas isoformas que são expressas por meio de “splicing alternativo” do seu pré-mRNA (Thapa e Wilson, 2016). A proteína CD44 padrão ou também conhecida como “standard” (CD44s) é uma glicoproteína transmembrânica de 85-90-kDa derivada da expressão de 10 exons do seu gene, enquanto as formas variantes (CD44v1-10) consistem neste conjunto padrão de exons com combinações dos 10 exons conhecidos como variáveis. Sua função está implicada na adesão e migração celular, mas um papel proeminente do CD44 é a ligação ao ácido hialurônico da MEC. O CD44 foi detectado em HSCs humanas (Lapidot et al., 2005) e em células-tronco derivadas de tecido adiposo (Zuk et al., 2002) e tem sido amplamente utilizado em combinação com outros marcadores para o isolamento de CTC de vários tumores sólidos (Thapa e Wilson, 2016; Zöller, 2011). Esta proteína de superfície é expressa em diversos tipos de células normais; entretanto, sua importância como um marcador de CTC pode ser, por esta razão, limitada (Jaggupilli e Elkord, 2012). Estudos recentes demonstram que resultados conflitantes podem ser atribuídos à expressão das formas variantes, como por exemplo a isoforma CD44 9 (CD44v9) que despontou como um novo marcador para CTC em uma ampla

variedade de tumores sólidos humanos (Nagano et al., 2013; Ishimoto et al., 2001). Outras variantes de CD44 também já foram sugeridas como marcadores de CTC em neoplasias malignas humanas (Thapa e Wilson, 2016).

### **3.4 O microambiente tumoral**

Anteriormente considerado simplesmente como um conjunto de células alteradas em proliferação descontrolada dentro de um organismo hospedeiro, atualmente o câncer é melhor compreendido como um dos componentes do chamado microambiente tumoral (Borovski et al., 2011). Crescendo dentro e modificando constantemente este último, as interações entre elementos celulares e moleculares são determinantes para sobrevivência dos tumores sólidos, considerados de uma maneira geral como um “parasita” que não possui um modo adequado ou ideal de funcionamento, ou seja, sua presença sempre prejudica, de uma forma ou de outra, a homeostase do organismo hospedeiro. Ainda neste contexto, a dinâmica das células neoplásicas passa a ser avaliada como parte integrante deste nicho tumoral, dentro do qual a presença de sinais proliferativos e de autorrenovação mantém as CTC em estado indiferenciado (Kuhn e Tuan, 2010).

Desta forma, as neoplasias malignas podem ser vistas como entidades que se mantêm de uma maneira análoga aos tecidos saudáveis, com modificações na homeostasia tecidual original, na qual células “normais” adjacentes ao tumor acabam funcionando de acordo com a nova dinâmica tecidual ditada pelas células malignas em franco crescimento (Prince et al., 2007). As CTC têm o papel de contribuir para o crescimento do tumor, conferindo a este último a capacidade de resistir aos tratamentos oncológicos tradicionais e promovendo a emissão e instalação de focos metastáticos regionais ou à distância. As demais células que compõem a maior parte dos tumores malignos (“bulk” tumoral – células não CTC) são mais diferenciadas, apesar de malignas, que não preservam mais a capacidade de proliferação ilimitada. Dentro do microambiente tumoral encontram-se também células inflamatórias, células estromais, além de vasos sanguíneos e linfáticos (Fuchs et al., 2004). Destaca-se ainda a existência de subpopulações enriquecidas com células-tronco hematopoiéticas (Goodell et al., 1997), identificadas inicialmente a partir de células derivadas da medula óssea (Goodell et al., 1996).

As CTC também parecem ter uma participação no processo conhecido como de “cancerização em campo”, ou seja, nas células ainda não malignas adjacentes ao tumor primário, porém que já sofreram algum tipo de transformação genética ou fenotípica. Independentemente do modelo de cancerização (monoclonal ou policlonal), a cancerização em campo é causada por células já alteradas que se encontram em estágio um pré-maligno

de displasia, que se origina a partir de células-tronco saudáveis do epitélio que recebe de maneira crônica agressões carcinogênicas. Diante da presença de novas modificações induzidas por agentes químicos, biológicos ou de natureza genética, estas células podem dar origem a novos tumores primários na mesma região anatômica do tumor inicial (Simple et al., 2015).

A população do microambiente tumoral, composta de células residentes ou recrutadas pelo tumor (Kidd et al., 2012), modula a remodelação da MEC, a migração celular e invasão das células malignas, a resistência a drogas e também a capacidade de evasão da imunovigilância do hospedeiro por meio da produção de vários fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (Hanahan e Coussens, 2012). Existem evidências de que as células de tumores de cabeça e pescoço que compõem as populações mais externas ou laterais da massa tumoral em crescimento tendem a ter um comportamento mais agressivo, com maior probabilidade de gerarem metástases, além de exibirem uma sinalização da via de transdução de sinais Wnt anormal e serem resistentes à quimioterapia convencional (Song et al., 2010).

As interações entre o estroma do organismo hospedeiro e as células tumorais desempenham um papel fundamental no crescimento e progressão da neoplasia maligna. Embora a composição do estroma possa variar bastante entre os tumores em diversas localizações anatômicas (Kidd et al., 2012), pouco se sabe ainda sobre os mecanismos biológicos que governam o processo de recrutamento, por meio do qual as células tumorais cooperam com o estroma hospedeiro, e sobre os mecanismos de comunicação molecular entre este último e as células tumorais.

#### **3.4.1. A origem do estroma tumoral**

As interações entre o estroma hospedeiro e as células tumorais desempenham um papel fundamental para o crescimento e progressão do tumor. Como descrito por Dvorak (Dvorak, 1986), a geração e construção de um estroma tumoral apresenta muitas semelhanças com o processo fisiológico de cicatrização de feridas, que envolve os fenômenos de neoangiogênese, de infiltração de fibroblastos e de células do sistema imune, além de remodelação importante da MEC. Células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea (CEMs), adipócitos e células endoteliais recrutadas pelo tumor secretam uma ampla variedade de mediadores químicos e fatores de crescimento que, por sua vez, facilitam a sua progressão (Dvorak, 1986).

Como acima mencionado, vários tipos de tecido hospedeiro foram identificados como alvos para o recrutamento de células do estroma por tumores malignos: a medula óssea, que contribui com células mesenquimais indiferenciadas, os vasos sanguíneos e linfáticos, que

forneem células endoteliais em grande quantidade, o sistema imunológico que permeia o tumor com diferentes tipos de células de defesa, além do tecido adiposo com adipócitos e do tecido conjuntivo com fibroblastos (Kidd et al., 2012). De fato, dados recentes indicam fortemente que o estroma associado ao tumor é um pré-requisito fundamental para que este possa invadir os tecidos hospedeiros e metastatizar (Kojima et al., 2010; Spaeth et al., 2009; Xiong et al., 2015).

### **3.4.2 Fibroblastos associados a tumores (TAFs) ou fibroblastos associados ao câncer (CAFs)**

Os fibroblastos regulam a estrutura e a função dos tecidos saudáveis por meio da remodelação da MEC e da reparação transitória do tecido durante a cicatrização da ferida (Öhlund et al., 2014). Entretanto, um conjunto crescente de evidências demonstra que os fibroblastos são peças chave no processo de tumorigênese e constituem na maioria das células do estroma de um tumor sólido, particularmente os cânceres de mama, próstata, pâncreas e também de boca (Öhlund et al., 2014).

Os TAFs/CAFs são fibroblastos ativados que compartilham muitas semelhanças biológicas com os fibroblastos normais encontrados durante o processo inflamatório e cicatrização de feridas (Cirri e Chiarugi, 2011). Durante a progressão tumoral, os TAFs/CAFs mostram taxas crescentes de proliferação, promovem o crescimento tumoral através de uma variedade de mecanismos e podem modular os mecanismos de resistência terapêutica (Cirri e Chiarugi, 2011).

Erez e seus colaboradores (Erez et al. 2010) demonstraram que os TAFs/CAFs no estroma do tumor atuam como promotores de inflamação sustentada por meio do aumento de citocinas pró-inflamatórias, da neoangiogênese e do recrutamento de macrófagos, favorecendo o crescimento tumoral. Os TAFs/CAFs também são conhecidos por promoverem a angiogênese pela secreção de fatores que estimulam pericitos e células endoteliais, além de também serem implicados na remodelação da MEC (Hanahan e Coussens, 2012).

CAFs são abundantes dentro do microambiente tumoral e exibem papéis cruciais durante a progressão do tumor e a geração de metástases. Múltiplas classes de moléculas, incluindo fatores de crescimento, citocinas e proteases, são produzidas pelos CAFs para atuar como mediadores das interações com as células malignas. Um dos principais canais para este tipo de comunicação está associado às chamadas vesículas extracelulares (EV) (Dourado et al., 2019), que são partículas secretadas e carregadas com proteínas e informações genéticas. A análise da expressão gênica das células cancerosas tratadas com

EV liberadas pelos CAFs demonstrou mudanças nas vias associadas ao metabolismo do tumor e à regulação dos genes cuja expressão é responsável pela invasão tumoral em células de carcinoma de células escamosas de boca (OSCC) (Dourado et al., 2019).

### **3.4.3 Células do sistema imune no estroma associado às neoplasias malignas**

As células imunológicas também foram identificadas como importantes personagens do microambiente associado aos tumores malignos. Macrófagos, células dendríticas, células “natural killer” (NK), células supressoras derivadas de linhagem mieloide e células T reguladoras (Tregs) têm demonstrado importante contribuição para a criação de um microambiente pró-tumorigênico. Macrófagos associados ao tumor (“tumor-associated macrophages” - TAMs) compõe uma população distinta de macrófagos conhecidos como macrófagos M2-polarizados, capazes de favorecer imunossupressão, angiogênese, migração e invasão de células neoplásicas (Medrek et al., 2012).

Células supressoras derivadas da medula óssea se diferenciam em TAMs e células dendríticas durante a progressão tumoral e contribuem para a tumorigênese por facilitarem a evasão imunológica das células tumorais, a remodelação de MEC e também o processo de EMT (Yu et al., 2013). A atividade das células dendríticas é frequentemente desregulada no câncer, o que pode levar a redução do número de células dendríticas maduras e aumento do número de células dendríticas com capacidade de gerar tolerância imunológica, imunossupressão, ou mesmo a completa inibição de sua diferenciação (Steinman et al., 2003).

Duas subpopulações distintas de células NK, chamadas de células assassinas naturais infiltrantes de tumores (TINKs) e de células assassinas naturais associadas ao tumor (TANKs) foram descritas em neoplasias malignas (Bruno et al., 2014). Estas exibem expressões alteradas de citocinas, incluindo níveis aumentados de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator-1 derivado do estroma (SDF-1), favorecendo assim a angiogênese sustentada e conseqüentemente a progressão tumoral (Bruno et al., 2013).

Finalmente, as Tregs também estão envolvidas na progressão tumoral por se infiltrarem no tecido tumoral e reduzirem a resposta imune antitumoral (Curiel et al., 2004). Além disto, há relatos recentes indicando que Tregs produzem VEGF-A, o que leva a angiogênese sustentada em um modelo experimental de câncer de ovário em camundongos. Em conjunto, estas evidências sugerem que respostas provenientes de células imunes dentro

do estroma do tumor podem, em algumas circunstâncias, ajudar a impulsionar de maneira significativa o seu desenvolvimento (Facciabene et al., 2011).

### **3.5 Novas terapias dirigidas contra CTC: Resistência aos agentes quimioterápicos convencionais atualmente em uso clínico**

Mesmo com todos os esforços dirigidos pela comunidade científica e pelos clínicos para o tratamento contra o câncer, existem evidências enfatizando que uma das causas para as frequentes e tão indesejadas falhas do tratamento oncológico podem estar diretamente ligadas à presença das CTC munidas com seus eficientes mecanismos de escape de todo arsenal de modalidades terapêuticas farmacológicas e/ou radioterápicas hoje disponíveis (Mannelli e Gallo, 2012). Esta dificuldade no tratamento pode estar ligada à própria resistência inerente às células-tronco adultas dos tecidos saudáveis, uma vez que estas devem ser capazes de sobreviver a diversos fatores estressantes pelos quais passam os tecidos, como a ausência de nutrientes, a hipóxia, a presença de toxinas e até mesmo radiações, dependendo das circunstâncias (Facompre et al., 2012). A hipótese das CTC, descrita e discutida no presente Trabalho de Conclusão de Curso, analisa a possibilidade de tais células possuírem ou conservarem características semelhantes àquelas das células-tronco dos tecidos normais, o que asseguraria a elas a propriedade de resistência aos tratamentos oncológicos convencionais e também favoreceria a formação das recidivas pós-tratamento.

Frequentemente, apesar das elevadas doses administradas nos tratamentos de rádio e quimioterapia e também do fato de que algumas terapias-alvo já existentes serem capazes de extinguir muitas das células tumorais, estas podem não ser suficientes para eliminar por completo as CTC (Rodini et al., 2017). Isto pode resultar em uma aparente eliminação clínica do tumor ou sucesso do tratamento, o qual muito provavelmente recidivará posteriormente devido às CTC residuais que começarão a proliferar e promoverão a recomposição da estrutura hierárquica da neoplasia com o passar do tempo. Neste contexto, embora tais células pareçam muito difíceis de serem extintas, tratamentos específicos precisam ser gerados com o objetivo de inibir mecanismos e funções que conferem a estas subpopulações resistência aos tratamentos convencionais (Jian et al., 2017). Por outro lado, a realização de tratamentos oncológicos somente com terapias-alvo voltadas para a inativação/destruição das CTC tem a chance de não ser suficiente para a completa cura do câncer, ou sua remissão por longos períodos de tempo, uma vez que as células malignas do “bulk” tumoral (que, em tese, não sofreram efeitos citotóxicos do tratamento) podem ter a

capacidade de sobreviver e sustentar a neoplasia por longos períodos de tempo (Jian et al., 2017), mesmo na ausência total ou parcial das CTC.

Uma opção de tratamento oncológico para complementar os tratamentos utilizados na rotina pelos oncologistas, como a radioterapia e a quimioterapia em seus mais variados protocolos de aplicação, seria o desenvolvimento e a implementação de imunoterapia, já utilizada para alguns tipos de tumor como os melanomas malignos, para diversas neoplasias malignas sólidas, inclusive tumores de cabeça e pescoço. O tratamento imunoterápico atinge direta e especificamente as células tumorais pelas suas propriedades antigênicas, evitando-se desta forma efeitos colaterais indesejáveis para os pacientes (Qian et al., 2015). No entanto, deve-se considerar sempre que, embora o sistema imunológico seja capaz de reconhecer as CTC e desenvolver uma resposta efetiva contra elas, estas últimas podem ter um papel imunossupressor como consequência de suas interações dentro do biologicamente complexo microambiente tumoral (Wei et al., 2010; Liao et al., 2013).

Terapias-alvo contra as CTC com base nas EROs (Qian et al., 2018) também têm sido investigadas. Estes compostos estão ligados ao desenvolvimento tumoral e a formação de metástases (Rodic e Vincent, 2018) e podem ser detectados em alguns tipos de neoplasias malignas, inclusive nos CEC de cabeça e pescoço. EROs, apesar de observadas durante o desenvolvimento dos tumores malignos, em concentrações muito altas podem desencadear supressão do crescimento da lesão e morte celular (Zhang et al., 2016; Lin et al., 2018). Aparentemente, CTC que possuem baixas concentrações intracelulares de EROs tendem a ser resistentes aos tratamentos com radioterapia ou quimioterapia e também menos susceptíveis aos ataques empreendidos pelo sistema imunológico do hospedeiro enquanto que as células pertencentes ao “bulk” tumoral, com elevadas concentrações de EROs seriam, em tese, mais facilmente eliminadas.

A hipóxia, ou redução da concentração de oxigênio, é também um fenômeno fundamental dentro do microambiente tumoral, pois pode levar ao aumento do potencial metastático e dificuldades no tratamento por induzir a expressão de genes que podem conferir resistência a medicamentos, diminuir a expressão de genes supressores de tumor e também causar instabilidade genômica (Moharil et al., 2017). Há estudos na literatura sugerindo que a instalação da hipóxia dentro dos tumores durante seu crescimento pode regular os mecanismos de diferenciação celular, o que por sua vez poderia facilitar ainda mais a permanência e sobrevivência das CTC (Harris e Sinha, 2013).

Ohnishi et al. (2018) optaram por avaliar drogas já utilizadas em tratamentos quimioterápicos, como cetuximabe e lapatinib sobre o processo de proliferação celular e vias

de transdução de sinais envolvidas na migração de células de CEC orais. Estes autores observaram que o cetuximabe é capaz de bloquear a migração e, quando utilizado juntamente com o inibidor HGF/c-Met pode ser mais eficiente ainda no sentido de impedir a saída das CTC da massa que compõe o tumor primário e consequente formação de metástases. Além disto, nesta mesma pesquisa foi demonstrado que o lapatinib é capaz de atenuar a proliferação celular e assim impedir o crescimento dos chamados esferóides *in vitro* (uma forma de crescimento de células malignas de maneira agregada, em placas de cultura celular, que reflete o potencial oncogênico das células estudadas), tanto aqueles formados pelas células mais diferenciadas (“bulk”) do tumor primário quanto dos esferóides produzidos por células com capacidade metastática.

Setúbal Destro Rodrigues et al. (2018) analisaram os efeitos de cetuximabe e do erlotinibe sobre as CTC derivadas CECs de cabeça e pescoço, mais especificamente, como tais compostos seriam capazes de bloquear o receptor de membrana para o fator de crescimento epidérmico (EGFR), pois o aumento da atividade deste último parece estar associado ao fenômeno de resistência ao tratamento oncológico e pior prognóstico para os pacientes portadores deste tipo de neoplasia maligna (Argiris et al., 2017). Estes autores observaram que o bloqueio de EGFR provoca alterações morfológicas e moleculares específicas, como por exemplo a redução na expressão da molécula de superfície CD44 e diferenciação das CTC, além de bloquear a divisão celular. Por fim, verificaram que ambas as drogas são capazes de modificar o processo de TEM, podendo limitar a capacidade de invasão tecidual local e a formação de metástases (Setúbal Destro Rodrigues et al., 2018).

Apesar de todo o progresso que pode ser observado no desenvolvimento de terapias mais específicas para restringir crescimento do tumor primário e seu espalhamento pelo organismo que o hospeda, modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* são ainda de extrema importância dado que as CTC compartilham as mesmas vias moleculares de transdução de sinal com células-tronco dos tecidos saudáveis de origem e, portanto, terapias oncológicas desenhadas para destruir esta categoria de células malignas podem eventualmente impactar sobre as células normais e provocar efeitos colaterais para os pacientes (Sayed et al., 2011).

## 4 DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, evidências experimentais consistentes sobre a existência das CTC têm fortalecido a visão de que estas células são as responsáveis pelo desenvolvimento e espalhamento do câncer pelo organismo do hospedeiro (Visvader e Lindeman, 2008). As CTC têm a capacidade de renovação permanente, anteriormente atribuída à todas as células que formam a massa tumoral e, ao mesmo tempo, e produzem as células progenitoras que perdem paulatinamente a habilidade de proliferar e que darão origem, em última instância, à massa tumoral clinicamente perceptível ou detectável nos exames de diagnóstico por imagem (Girouard e Murphy, 2011). Além disto, as pesquisas mais recentes publicadas sobre este tipo celular destacam que o metabolismo das CTC não está simplesmente subordinado à sua fisiologia, mas, na verdade, pode orquestrar o seu papel biológico. As terapias convencionais utilizadas atualmente no tratamento contra o câncer visam impedir a rápida proliferação das células malignas que compõem a maior parte do tumor, sem necessariamente ter um efeito citotóxico ou específico sobre as subpopulações de CTC, uma vez que estas são quiescentes, pouco diferenciadas e contribuem de maneira decisiva para a resistência e sobrevivência das neoplasias malignas frente aos medicamentos utilizados (Mannelli e Gallo, 2012; Nör et al., 2014).

O microambiente tumoral é um componente fundamental para a completa compreensão da patogênese do câncer (Borovski et al., 2011). Está se tornando cada vez mais evidente que o microambiente tumoral é uma mistura bastante heterogênea de células tumorais com células normais do organismo hospedeiro que evolui à medida que a doença progride. É importante salientar que as células do compartimento estromal do tumor, que incluem fibroblastos, células endoteliais provenientes de vasos sanguíneos ou linfáticos, pericitos, adipócitos e uma variedade de células do sistema imunológico (Fuchs et al., 2004), estão sendo cada vez mais reconhecidas como atores centrais no desenvolvimento tumoral, na geração das metástases regionais ou distantes e na resistência à quimioterapia.

As CTC apresentam características metabólicas especiais que as distinguem da maioria das células tumorais e que podem, por si só, constituir a base para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para erradicá-las e, conseqüentemente, impedir a formação de metástases. Do ponto de vista clínico, o ataque com fármacos antimetabólicos ou anticorpos monoclonais as particularidades biológicas das CTC podem resultar na cura completa do câncer ou, pelo menos, numa sobrevida longa livre da doença e com qualidade de vida para os pacientes, pois estas são responsáveis pelo espalhamento metastático, principal causa dos óbitos relacionados ao câncer (Mannelli e Gallo, 2012). O interesse

científico e das grandes companhias farmacêuticas na exploração do metabolismo da CTC para a criação de medicamentos mais modernos e eficientes está ganhando, a cada ano, terreno. No entanto, para que estes ousados e relevantes objetivos sejam alcançados, um retrato muito bem definido, detalhado e preciso de todas as particularidades existentes no metabolismo das CTC que permeiam as diversas neoplasias malignas humanas ainda precisa ser traçado, pois o tema, apesar dos recentes avanços científicos, ainda continua muito controverso, como pôde ser observado na revisão da literatura apresentada no presente trabalho.

Portanto, a ciência precisa ainda superar vários obstáculos antes de conseguir de maneira eficiente localizar e destruir especificamente as CTC com novos tratamentos oncológicos. Em primeiro lugar, para se reconhecer precisa e adequadamente as CTC dentro das massas tumorais e diferenciá-las de outros tipos de células malignas ou do microambiente, devem ser direcionados esforços no sentido de identificá-las por meio de marcadores moleculares específicos, pois até o momento nenhum dos marcadores propostos é único para CTC. Na mesma linha de pensamento, novas e eficientes combinações de marcadores moleculares podem melhorar muito a seleção das CTC e conseqüentemente a pesquisa de novos fármacos. É importante notar que as CTC estão geralmente instaladas em nichos formados por vários outros tipos de células e que a heterogeneidade populacional dentro da massa tumoral é nitidamente maior do que se acreditava há alguns anos atrás. Por fim, os estudos sobre o metabolismo das CTC em ambientes experimentais extremamente artificiais que não refletem a arquitetura complexa natural dos tumores, devem ser complementados com melhores modelos que permitam a preservação do estado fisiológico e do fenótipo destas células.

## 5 CONCLUSÃO

Diante do exposto no presente trabalho, pode-se concluir que um melhor entendimento do comportamento das CTC com relação ao seu metabolismo e potencial de diferenciação é essencial para que novas aplicações clínicas do tratamento oncológico cheguem aos pacientes e impeçam de maneira eficiente o crescimento tumoral e a sua disseminação metastática. Pontos importantes como 1) o desenvolvimento e a padronização dos métodos de identificação das CTC, 2) a detalhada compreensão das interações que ocorrem entre as CTC e o seu microambiente e 3) o conhecimento dos fatores que determinam a escolha das vias metabólicas preferenciais das CTC nas diversas neoplasias malignas humanas ainda devem ser extensivamente abordados do ponto de vista experimental, para que futuros tratamentos com citotoxicidade dirigida contra CTC sejam desenvolvidos com sucesso.

## REFERÊNCIAS\*

- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. doi: 10.1073/pnas.0530291100.
- Argiris A, Harrington KJ, Tahara M, Schulten J, Chomette P, Ferreira Castro A, et al. Evidence-Based Treatment Options in Recurrent and/or Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Front Oncol*. 2017 May 9;7:72. doi: 10.3389/fonc.2017.00072.
- Baudot A, de la Torre V, Valencia A. Mutated genes, pathways and processes in tumours. *EMBO Rep*. 2010 Oct;11(10):805-10. doi: 10.1038/embor.2010.133.
- Bianco C, Salomon DS. Targeting the embryonic gene Cripto-1 in cancer and beyond. *Expert Opin Ther Pat*. 2010 Dec;20(12):1739-49. doi: 10.1517/13543776.2010.530659.
- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997 Jul;3(7):730-7. doi: 10.1038/nm0797-730.
- Borovski T, De Sousa E Melo F, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res*. 2011 Feb 1;71(3):634-9. doi: 10.1158/0008-5472.
- Brandt WD, Matsui W, Rosenberg JE, He X, Ling S, Schaeffer EM, et al. Urothelial carcinoma: stem cells on the edge. *Cancer Metastasis Rev*. 2009 Dec;28(3-4):291-304. doi: 10.1007/s10555-009-9187-6.
- Bruno A, Ferlazzo G, Albini A, Noonan DM. A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Sep 1;106(8):dju200. doi: 10.1093/jnci/dju200.
- Bruno A, Focaccetti C, Pagani A, Imperatori AS, Spagnoletti M, Rotolo N, et al. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia*. 2013 Feb;15(2):133-42. doi: 10.1593/neo.121758.
- Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn*. 2004 Feb;229(2):243-58. doi: 10.1002/dvdy.10431.

---

\* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Celià-Terrassa T, Kang Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. *Genes Dev.* 2016 Apr 15;30(8):892-908. doi: 10.1101/gad.277681.116.

Chae YC, Kim JH. Cancer stem cell metabolism: target for cancer therapy. *BMB Rep.* 2018 Jul;51(7):319-26. doi: 10.5483/bmbrep.2018.51.7.112.

Chen CL, Uthaya Kumar DB, Punj V, Xu J, Sher L, Tahara SM, et al. NANOG Metabolically Reprograms Tumor-Initiating Stem-like Cells through Tumorigenic Changes in Oxidative Phosphorylation and Fatty Acid Metabolism. *Cell Metab.* 2016 Jan 12;23(1):206-19. doi: 10.1016/j.cmet.2015.12.004.

Chen J, Wang J, Chen D, Yang J, Yang C, Zhang Y, et al. Evaluation of characteristics of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells in three dimensional basement membrane extract scaffold versus two dimensional monocultures. *BMC Cell Biol.* 2013 Jan 31;14:7. doi: 10.1186/1471-2121-14-7.

Ciavardelli D, Rossi C, Barcaroli D, Volpe S, Consalvo A, Zucchelli M, et al. Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death Dis.* 2014 Jul 17;5(7):e1336. doi: 10.1038/cddis.2014.285.

Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):482-97.

Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol.* 1984 Jul;133(1):157-65.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006 Oct 1;66(19):9339-44. doi: 10.1158/0008-5472.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9. doi: 10.1038/nm1093.

Dourado MR, Korvala J, Åström P, De Oliveira CE, Cervigne NK, Mofatto LS, et al. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. *J Extracell Vesicles.* 2019 Feb 13;8(1):1578525. doi: 10.1080/20013078.2019.1578525.

Dupuy F, Tabariès S, Andrzejewski S, Dong Z, Blagih J, Annis MG, et al. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):577-89. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.007.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 1986 Dec 25;315(26):1650-9. doi: 10.1056/NEJM198612253152606.

Erez N, Truitt M, Olson P, Arron ST, Hanahan D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF- $\kappa$ B-Dependent Manner. *Cancer Cell.* 2010 Feb 17;17(2):135-47. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.041.

Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 2011 Jul 13;475(7355):226-30. doi: 10.1038/nature10169.

Facompre N, Nakagawa H, Herlyn M, Basu D. Stem-like cells and therapy resistance in squamous cell carcinomas. *Adv Pharmacol.* 2012;65:235-65. doi: 10.1016/B978-0-12-397927-8.00008-7.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9328-37. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1343.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar 19;116(6):769-78. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00255-7.

Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014 Jul 29;111(3):506-14. doi: 10.1038/bjc.2014.289.

Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995 Oct;3(4):459-73. doi: 10.1016/1074-7613(95)90175-2.

Garg S, Madkaikar M, Ghosh K. Investigating cell surface markers on normal hematopoietic stem cells in three different niche conditions. *Int J Stem Cells.* 2013 Nov;6(2):129-33. doi: 10.15283/ijsc.2013.6.2.129.

Girouard SD, Murphy GF. Melanoma stem cells: not rare, but well done. *Lab Invest*. 2011 May;91(5):647-64. doi: 10.1038/labinvest.2011.50.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996 Apr 1;183(4):1797-806. doi: 10.1084/jem.183.4.1797.

Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997 Dec;3(12):1337-45. doi: 10.1038/nm1297-1337.

Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, et al. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol*. 2013 Feb;229(3):355-78. doi: 10.1002/path.4086.

Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):309-22. doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.022.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

Harris BN, Sinha UK. Cancer stem Cells: A review of the literature and the implications in head and neck cancer. *J Cancer Res Cells Updates* 2013;2:186-93.

Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res*. 2013 Sep 25;5(6):563-81.

Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, et al. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011 Mar 8;19(3):387-400. doi: 10.1016/j.ccr.2011.01.038.

Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:708036. doi: 10.1155/2012/708036.

Jian Z, Strait A, Jimeno A, Wang XJ. Cancer Stem Cells in Squamous Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2017 Jan;137(1):31-7. doi: 10.1016/j.jid.2016.07.033.

Katajisto P, Döhla J, Chaffer CL, Pentinmikko N, Marjanovic N, Iqbal S, et al. Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. *Science*. 2015 Apr 17;348(6232):340-3. doi: 10.1126/science.1260384.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, et al. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*. 2012;7(2):e30563. doi: 10.1371/journal.pone.0030563.

Kojima Y, Acar A, Eaton EN, Melody KT, Scheel C, Ben-Porath I, et al. Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 16;107(46):20009-14. doi: 10.1073/pnas.1013805107.

Kondoh H, Leonart ME, Gil J, Wang J, Degan P, Peters G, et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res*. 2005 Jan 1;65(1):177-85.

Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3804-9. doi: 10.1172/JCI157099.

Kristiansen G, Sammar M, Altevogt P. Tumour biological aspects of CD24, a mucin-like adhesion molecule. *J Mol Histol*. 2004 Mar;35(3):255-62. doi: 10.1023/b:hijo.0000032357.16261.c5.

Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*. 2010 Feb;222(2):268-77. doi: 10.1002/jcp.21940.

Langenkamp U, Siegler U, Jörger S, Diermayr S, Gratwohl A, Kalberer CP, et al. Human acute myeloid leukemia CD34+CD38- stem cells are susceptible to allorecognition and lysis by single KIR-expressing natural killer cells. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1590-4. doi: 10.3324/haematol.2009.005967.

Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005 Sep 15;106(6):1901-10. doi: 10.1182/blood-2005-04-1417.

Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8. doi: 10.1038/367645a0.

Levin TG, Powell AE, Davies PS, Silk AD, Dismuke AD, Anderson EC, et al. Characterization of the intestinal cancer stem cell marker CD166 in the human and mouse gastrointestinal tract. *Gastroenterology*. 2010 Dec;139(6):2072-2082.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2010.08.053.

Liao T, Kaufmann AM, Qian X, Sangvatanakul V, Chen C, Kube T, et al. Susceptibility to cytotoxic T cell lysis of cancer stem cells derived from cervical and head and neck tumor cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Jan;139(1):159-70. doi: 10.1007/s00432-012-1311-2.

Lin S, Li Y, Zamyatnin AA Jr, Werner J, Bazhin AV. Reactive oxygen species and colorectal cancer. *J Cell Physiol*. 2018 Jul;233(7):5119-32. doi: 10.1002/jcp.26356.

Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev*. 2012 Aug;38(5):515-39. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.007.

Martinet L, Smyth MJ. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol*. 2015 Apr;15(4):243-54. doi: 10.1038/nri3799.

Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012 Jul 23;12:306. doi: 10.1186/1471-2407-12-306.

Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2005 Sep;13(3):205-20. doi: 10.1097/01.pai.0000173054.83414.22.

Moharil RB, Dive A, Khandekar S, Bodhade A. Cancer stem cells: An insight. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2017 Sep-Dec;21(3):463. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_132\_16.

Nagano O, Okazaki S, Saya H. Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene*. 2013 Oct 31;32(44):5191-8. doi: 10.1038/onc.2012.638.

Nör C, Zhang Z, Warner KA, Bernardi L, Visioli F, Helman JI, et al. Cisplatin induces Bmi-1 and enhances the stem cell fraction in head and neck cancer. *Neoplasia*. 2014 Feb;16(2):137-46. doi: 10.1593/neo.131744.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8. doi: 10.1126/science.959840.

Öhlund D, Elyada E, Tuveson D. Fibroblast heterogeneity in the cancer wound. *J Exp Med*. 2014 Jul 28;211(8):1503-23. doi: 10.1084/jem.20140692.

Ohnishi Y, Yasui H, Nozaki M, Nakajima M. Molecularly-targeted therapy for the oral cancer stem cells. *Jpn Dent Sci Rev*. 2018 May;54(2):88-103. doi: 10.1016/j.jdsr.2017.11.001.

Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2009 Jul;45(7):633-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.10.003.

O'Keefe TL, Williams GT, Davies SL, Neuberger MS. Mice carrying a CD20 gene disruption. *Immunogenetics*. 1998 Jul;48(2):125-32. doi: 10.1007/s002510050412.

Palorini R, Votta G, Balestrieri C, Monestiroli A, Olivieri S, Vento R, et al. Energy metabolism characterization of a novel cancer stem cell-like line 3AB-OS. *J Cell Biochem*. 2014 Feb;115(2):368-79. doi: 10.1002/jcb.24671.

Pastò A, Bellio C, Pilotto G, Ciminale V, Silic-Benussi M, Guzzo G, et al. Cancer stem cells from epithelial ovarian cancer patients privilege oxidative phosphorylation, and resist glucose deprivation. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4305-19. doi: 10.18632/oncotarget.2010.

Peiris-Pagès M, Martinez-Outschoorn UE, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer stem cell metabolism. *Breast Cancer Res*. 2016 May 24;18(1):55. doi: 10.1186/s13058-016-0712-6.

Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010 Apr;28(4):721-33. doi: 10.1002/stem.404.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 16;104(3):973-8. doi: 10.1073/pnas.0610117104.

Qian X, Ma C, Nie X, Lu J, Lenarz M, Kaufmann AM, et al. Biology and immunology of cancer stem(-like) cells in head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2015 Sep;95(3):337-45. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.03.009.

Qian X, Nie X, Yao W, Klinghammer K, Sudhoff H, Kaufmann AM, et al. Reactive oxygen species in cancer stem cells of head and neck squamous cancer. *Semin Cancer Biol*. 2018 Dec;53:248-57. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.06.001.

Rodic S, Vincent MD. Reactive oxygen species (ROS) are a key determinant of cancer's metabolic phenotype. *Int J Cancer*. 2018 Feb 1;142(3):440-8. doi: 10.1002/ijc.31069.

Rodini CO, Lopes NM, Lara VS, Mackenzie IC. Oral cancer stem cells - properties and consequences. *J Appl Oral Sci.* 2017 Nov-Dec;25(6):708-15. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0665.

Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, et al. MYC/PGC-1 $\alpha$  Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):590-605. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.015.

San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis.* 2017 Feb 1;38(2):119-33. doi: 10.1093/carcin/bgw127.

Satpute PS, Hazarey V, Ahmed R, Yadav L. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(10):5579-87. doi: 10.7314/apjcp.2013.14.10.5579

Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, Garg A, Pathak KA, Nutting CM, et al. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2011 Apr;47(4):237-43. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.02.009.

Schmohl JU, Vallera DA. CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer. *Toxins (Basel).* 2016 May 28;8(6):165. doi: 10.3390/toxins8060165.

Setúbal Destro Rodrigues MF, Gammon L, Rahman MM, Biddle A, Nunes FD, Mackenzie IC. Effects of Cetuximab and Erlotinib on the behaviour of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2018 Feb 5;9(17):13488-500. doi: 10.18632/oncotarget.24416.

Shen YA, Wang CY, Hsieh YT, Chen YJ, Wei YH. Metabolic reprogramming orchestrates cancer stem cell properties in nasopharyngeal carcinoma. *Cell Cycle.* 2015;14(1):86-98. doi: 10.4161/15384101.2014.974419.

Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2015 Jul;51(7):643-51. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.04.006.

Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7359-68. doi: 10.1038/sj.onc.1206939.

Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One*. 2010 Jul 6;5(7):e11456. doi: 10.1371/journal.pone.0011456.

Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992. doi: 10.1371/journal.pone.0004992.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711. doi: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040.

Sundberg M, Jansson L, Ketolainen J, Pihlajamäki H, Suuronen R, Skottman H, et al. CD marker expression profiles of human embryonic stem cells and their neural derivatives, determined using flow-cytometric analysis, reveal a novel CD marker for exclusion of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*. 2009 Mar;2(2):113-24. doi: 10.1016/j.scr.2008.08.001.

Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ. Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 May;87(9):3584-8. doi: 10.1073/pnas.87.9.3584.

Tachezy M, Zander H, Wolters-Eisfeld G, Müller J, Wicklein D, Gebauer F, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166): an "inert" cancer stem cell marker for non-small cell lung cancer? *Stem Cells*. 2014 Jun;32(6):1429-36. doi: 10.1002/stem.1665.

Tang C, Ang BT, Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *FASEB J*. 2007 Dec;21(14):3777-85. doi: 10.1096/fj.07-8560rev.

Thapa R, Wilson GD. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2087204. doi: 10.1155/2016/2087204.

Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 19;97(26):14720-5. doi: 10.1073/pnas.97.26.14720.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 2008 Oct;8(10):755-68. doi: 10.1038/nrc2499.

Wang PL, O'Farrell S, Clayberger C, Krensky AM. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol*. 1992 Apr 15;148(8):2600-8.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14. doi: 10.1126/science.123.3191.309.

Ward AC. The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. *Front Biosci*. 2007 Jan 1;12:608-18. doi: 10.2741/2086.

Wei J, Barr J, Kong LY, Wang Y, Wu A, Sharma AK, et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res*. 2010 Jan 15;16(2):461-73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1983.

Xie Q, Wu Q, Horbinski CM, Flavahan WA, Yang K, Zhou W, et al. Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. *Nat Neurosci*. 2015 Apr;18(4):501-10. doi: 10.1038/nn.3960.

Xiong Y, McDonald LT, Russell DL, Kelly RR, Wilson KR, Mehrotra M, et al. Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment. *World J Stem Cells*. 2015 Mar 26;7(2):253-65. doi: 10.4252/wjsc.v7.i2.253.

Yamazaki H, Xu CW, Naito M, Nishida H, Okamoto T, Ghani FI, et al. Regulation of cancer stem cell properties by CD9 in human B-acute lymphoblastic leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 May 27;409(1):14-21. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.04.098.

Ye XQ, Li Q, Wang GH, Sun FF, Huang GJ, Bian XW, et al. Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells. *Int J Cancer*. 2011 Aug 15;129(4):820-31. doi: 10.1002/ijc.25944.

Yi M, Li J, Chen S, Cai J, Ban Y, Peng Q, et al. Emerging role of lipid metabolism alterations in Cancer stem cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jun 15;37(1):118. doi: 10.1186/s13046-018-0784-5. Erratum in: *J Exp Clin Cancer Res*. 2018 Jul 16;37(1):155.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997 Dec 15;90(12):5002-12.

Yu J, Du W, Yan F, Wang Y, Li H, Cao S, et al. Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *J Immunol*. 2013 Apr 1;190(7):3783-97. doi: 10.4049/jimmunol.1201449.

Zage PE, Whittle SB, Shohet JM. CD114: A New Member of the Neural Crest-Derived Cancer Stem Cell Marker Family. *J Cell Biochem.* 2017 Feb;118(2):221-31. doi: 10.1002/jcb.25656.

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Feb;214(2):413-21. doi: 10.1002/jcp.21210.

Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011 Nov;137(11):1679-86. doi: 10.1007/s00432-011-1038-5.

Zhang L, Li J, Zong L, Chen X, Chen K, Jiang Z, et al. Reactive Oxygen Species and Targeted Therapy for Pancreatic Cancer. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1616781. doi: 10.1155/2016/1616781.

Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer.* 2011 Apr;11(4):254-67. doi: 10.1038/nrc3023.

Zöller M. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009 Jan;9(1):40-55. doi: 10.1038/nrc2543.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95. doi: 10.1091/mbc.e02-02-0105.

## ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

### TCC BRUNA DAVID Revisado 2

#### RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



#### FONTES PRIMÁRIAS

<b>1</b>	<b>breast-cancer-research.biomedcentral.com</b> Fonte da Internet	<b>5</b> %
<b>2</b>	<b>koreascience.or.kr</b> Fonte da Internet	<b>3</b> %
<b>3</b>	<b>www.frontiersin.org</b> Fonte da Internet	<b>2</b> %
<b>4</b>	<b>www.bmbreports.org</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>www.ncbi.nlm.nih.gov</b> Fonte da Internet	<b>&lt;1</b> %

Excluir citações      Desligado  
Excluir bibliografia      Desligado

Excluir correspondências      Desligado