



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGÍA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NIVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS.
ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE CD44 Y ALDH1A

Aurita Verónica Beovide Cortegoso

Porto Alegre 2020

AURITA VERONICA BEOVIDE CORTEGOSO

**COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DEL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE CD44 Y ALDH1A.**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutorado em Patologia Bucal ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre 2020

CIP - Catalogação na Publicação

Beovide Cortegoso, Aurita Verónica
COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DEL CARCINOMA ORAL DE
CÉLULAS ESCAMOSAS. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO DE CD44
Y ALDH1A / Aurita Verónica Beovide Cortegoso. --
2020.
122 f.
Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,
2020.

1. Câncer bucal. 2. Comportamineto biologico . 3.
Células Madre tumorales . 4. CD44. 5. ALDH1A. I.
Varvaki Rados, Pantelis, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedicado a Pablo Federico Sofia Elisa y Rosina

AGRADECIMENTOS

MUITO ESPECIALMENTE AO MEU TUTOR, O PROFESSOR PANTELIS VARVAKI RADOS, POR SUA DISPOSIÇÃO, PACIÊNCIA E POR SEMPRE TER UMA PALAVRA DE AFETO.

AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, QUE ATRAVÉS DA PARCERIA NO CONVÊNIO COM A FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DA REPUBLICA DE URUGUAY TEM CONTRIBUÍDO COM A FORMAÇÃO ACADÊMICA DE PÓS-GRADUAÇÃO DOS DOCENTES, ENTRE AS QUAIS TENHO TENHO O PRAZER DE PERTENCER.

À FACULDADE DE ODONTOLOGIA, A TODOS OS PARCEIROS DE COOPERAÇÃO E À ESCOLA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUE TORNARAM ISSO POSSÍVEL.

AOS MEUS COMPANHEIROS DA CÁTEDRA DE ANATOMÍA PATOLÓGICA: CÉSAR, NATALIA , NATALIA, MARIA LAURA, ROSINA, SOFÍA E NATALIE , QUE SEMPRE ME APOIARAM NESSE CAMINHO DE DESAFIOS E REALIZAÇÕES QUE COMPARTILHO COM TODOS ELES.

AOS MEUS COMPANHEIROS DA FACULDADE FERNANDO E CELESTE QUE COLABORARAM NAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS E NA DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA, FUNDAMENTAIS PARA ESTE TRABALHO.

MUITO OBRIGADA!!

RESUMEN

BEOVIDE CORTEGOSO, A.V. Comportamiento Biológico Del Carcinoma Oral De Células Escamosas. Estudio Inmunohistoquímico De CD44 y ALDH1A. 2020. 122 f. Tese de Doutorado em Patologia Bucal – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020

El presente estudio abarcó un período de 4 a 5 años de trabajo en un proyecto de doctorado donde se abordó la temática del cáncer bucal desde diferentes líneas de estudio. En el primer artículo se realizó una actualización sobre el comportamiento biológico del carcinoma oral de células escamosas, donde se describe la importancia de ese comportamiento agresivo y su implicancia en la invasión tumoral, la diseminación y la producción de metástasis a distancia, características que describen al cáncer bucal. En el segundo artículo se realizó una revisión sobre la importancia de las células madre tumorales y la cancerización de campo en el cáncer oral, allí se describe a esta subpoblación de células como las conductoras de la tumorigénesis y el crecimiento tumoral. Esta subpoblación de células serían las conductoras de la tumorigénesis y el crecimiento tumoral y las encargadas de dirigir los procesos que llevan a la resistencia a las terapias y a la producción de metástasis a distancia. El tercer artículo de pesquisa, donde se realizó un trabajo de identificación de células epiteliales en el carcinomas oral de células escamosas y displasia epitelial mediante inmunohistoquímica con los biomarcadores CD44 y ALDH1A. Donde se observó la asociación de la positividad de ALDH1A en la sobrevida de los

pacientes, como un posible marcador pronóstico y al no poder identificar asociación de la positividad de ALDH1A con las células tumorales y el tejido no tumoral adyacente, se demuestra que es de poco valor para la patogenia del cáncer de cabeza y cuello.

Palabras claves- Cáncer bucal, células madre tumorales, desordenes potencialmente malignos, CD44, ALDH1A

ABSTRACT

BEOVIDE CORTEGOSO, A.V Comportamiento Biológico Del Carcinoma Oral De Células Escamosas. Estudio Inmunohistoquímico De CD44 y ALDH1A-2020. 122 p. Doctorate Thesys – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

The present study comprise a period of 4 to 5 years of work in a doctoral project where the topic of oral cancer was approached from different lines of study. In the first article, an update was made on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma, describing the importance of this aggressive behavior and its implication in tumor invasion, dissemination and the production of distant metastases, characteristics that describe the Oral cancer. In the second article, a review was made on the importance of cancer stem cells and field cancerization in oral cancer. This subpopulation of cells would be the conductors of tumorigenesis and tumor growth and responsible for directing the processes that lead to resistance to therapies and the production of distant metastases. The third research article, where an epithelial cell identification work was performed in oral squamous cell carcinomas and epithelial dysplasia by immunohistochemistry with the CD44 and ALDH1A biomarkers. Where the association of ALDH1A positivity in the survival of patients was observed, as a possible prognostic marker and since it was not possible to identify an association of ALDH1A positivity with tumor cells and adjacent non-tumor tissue, it is shown to be of little value for the pathogenesis of head and neck cancer.

Key Words- Oral Cancer, Cáncer Stem Cells, potentially malignant disorders, CD44, ALDH1A.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH1A Aldheído Deshidrogenasa 1 Miembro de la familia A

ATP adenosin trifosfato

Bcl-2 Linfoma de células B

CD44 Antígeno CD44

COCE Carcinoma Oral de Células Escamosas

CCC Cáncer Cabeza y Cuello

CCECC Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

CCE Carcinoma de Células Escamosas

CM Células Madre

CME Componentes Matriz Extracelular

CMT Células Madre Tumorales

COX-2 Ciclooxygenasa – 2

CSC Del inglés, Cancer Stem Cell

CTL Citotóxicos T Linfocitos

DE Displasia Epitelial

DPM Desórdenes Potencialmente Malignos

EGF Del inglés, Epidermal Growth Factor, traducido como factor de crecimiento epidérmico

EGFR Del inglés, Epidermal Growth Factor Receptor, traducido como

receptor del factor de crecimiento epidérmico

EO Eritroplasia Oral

HA Hialuronidasa

VPH Por sus siglas en inglés, Human Papiloma Virus, traducido como
Virus Papiloma Humano

IHQ Inmunohistoquímica

LO Leucoplasia Oral

LOH Por sus siglas en inglés (Loss of Heterozygosity) Pérdida de
Heterocigosidad

ME Matriz extracelular

MT Microambiente Tumoral

PD-L1 Ligando 1 de muerte celular programado

PD-1 Receptor Ligando 1 de muerte celular programado

PI Profundidad de Invasión

TEM Transición Epitelio Mesenquima

UFRGS Universidad Federal de Rio Grande del Sur

UdelaR Universidad de la República

SUMARIO

| | |
|--------------------------------------------------|------------|
| RESUMEN | 6 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1. INTRODUCCION..... | 12 |
| 2. OBJETIVO GENERAL | 17 |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 19 |
| ARTICULO 1 | 25 |
| ARTICULO 2..... | 51 |
| ARTICULO 3..... | 83 |
| 6 ANEXOS Y APÉNDICES..... | 120 |
| 6.1. APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA UDELAR | 120 |
| 6.2. CONSENTIMIENTO INFORMADO | 122 |

1. INTRODUCCION

El cáncer oral (CO) es el 6to. más común en el mundo, con 600.000 nuevos casos por año (SHIELD et al., 2017; SOLOMON; YOUNG; RISCHIN, 2018), siendo una de las neoplasias más agresivas entre los tumores malignos de cabeza y cuello. El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) comprende la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello (CCC). El CCECC está constituido por un grupo heterogéneo de tumores que emergen del epitelio escamoso de la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe, donde el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la variante histológica más frecuente, constituyendo el 90% de todos los cánceres de la región de cabeza y cuello (LI et al., 2018a; WESTRA; LEWIS, 2017). La clasificación de los tumores de la cavidad bucal por subsitio es útil, porque los patrones de diseminación y resultados clínicos varían de acuerdo con su localización, esto se relaciona a la variabilidad de la diseminación linfática en relación al sitio anatómico del tumor (IANCU; IANCU, 2015). La presentación clínica del COCE varía según el sitio de origen, más del 40% de los pacientes presentan involucramiento de los nódulos linfáticos regionales en el momento inicial de la enfermedad y el 10% presenta metástasis a distancia (MARUR; FORASTIERE, 2016). Esto es importante para entender el comportamiento biológico de los tumores malignos de la boca (HUANG; O'SULLIVAN, 2017).

La mortalidad por esta enfermedad sigue siendo alta debido al desarrollo de metástasis a distancia y la aparición de recurrencias locales y regionales, eventualmente inoperables que tienen una baja capacidad de respuesta a la radiación y/o a la quimioterapia. Por lo tanto, a pesar de las mejoras significativas en cirugía, radiación y quimioterapia, las tasas de supervivencia a largo plazo en pacientes con CCECC en estadios avanzados no han aumentado significativamente en los últimos 30 años (HANAHAN et al., 2011; SASAHIRA; KIRITA, 2018) .

Incluso en el estadio I de la enfermedad donde el 90% de los pacientes pueden curarse, el 10% recae en un desenlace fatal. En etapas más avanzadas, el subconjunto de pacientes que no responden a la terapia o sufren recurrencias aumenta, por razones hasta ahora desconocidas. Por lo tanto, es deseable desarrollar una comprensión más profunda de la biología de esta enfermedad para adaptar las estrategias terapéuticas actuales y desarrollar terapias que sean más efectivas (BAIS, 2019b; FERLAY et al., 2015).

A pesar de los avances en el diagnóstico del cáncer y tratamiento, la tasa de supervivencia general a los 5 años para COCE sigue siendo la más baja entre las malignidades, de hecho los valores de supervivencia no ha variado en las últimas tres décadas con valores <50% (International Agency for Research on Cancer et al., 2008; Siegel et al., 2017; Bais, 2019).

Los COCE de la mucosa bucal asociados con una exposición crónica al tabaco y al alcohol, presentan una alta carga mutacional, los carcinomas asociados con el virus tienen una patogénesis distinta, incorporan el material genómico del virus (HOLMES; WENIG, 2018). Los COCE asociados al HPV afectan a una población de pacientes que se superpone, pero es divergente de aquellos no relacionados al virus. Los pacientes con COCE positivos al HPV tienen más probabilidades de ser hombres, blancos, de mayor estatus socio-económico y 2 a 4 años más jóvenes que los carcinomas negativos al HPV (Stenmark et al., 2017; Holmes & Wenig, 2018).

A pesar de monitorear al paciente, luego de una terapia quirúrgica y no quirúrgica, la tasa de mortalidad general se mantiene sin cambios, probablemente debido a la recurrencia del tumor ya sea localmente o en un sitio remoto. El desarrollo de recurrencias y segundos tumores primarios, incluso cuando los márgenes quirúrgicos están histopatológicamente libres de tumor, esto se asocia al concepto de cancerización

de campo (Slaughter et al., 1953; Feller et al., 2013).

La evaluación precisa del estado de los ganglios linfáticos es de gran importancia para el pronóstico y la decisión terapéutica (SHAH JP, 2009). Si bien el manejo del cuello en COCE con nódulos positivo está claramente definido, es más discutible en COCE que se presenta sin evidencia clínica de enfermedad cervical (DA SILVA SD, HIER M, MLYNAREK A, KOWALSKI LP, 2012). En los casos de COCE T3-T4, existe un consenso en cuanto a tratar el cuello de manera electiva, ya que la probabilidad de metástasis ocultas en los ganglios linfáticos es alta y el acceso a los vasos del cuello a menudo es necesario para la reconstrucción del colgajo libre. En la enfermedad local temprana T1-T2, el riesgo de metástasis oculta en el cuello es más bajo, alrededor del 20% - 40%, y es menos probable la necesidad de la reconstrucción con un colgajo libre (STOECKLI SJ., 2007; D'CRUZ AK, VAISH R, KAPRE N, 2015).

Actualmente es recomendado por algunos autores la evaluación de la profundidad de invasión (PI) del tumor primario (BALASUBRAMANIAN D, EBRAHIMI A, GUPTA R, 2014) (MADANA J, LALIBERTE F, MORAND GB, 2015). El impacto de la PI en el pronóstico del COCE ha sido abordado en la edición más reciente del sistema de clasificación TNM, por la American Joint Committee on cancer (AJCC) (LYDIATT WM, PATEL SG, O'SULLIVAN B, 2017), donde establece que un tumor con una PI de más de 10 mm se clasifica nuevamente como T3, donde 4-5 mm PI se utiliza como umbral para la cirugía electiva de cuello (LYDIATT WM, PATEL SG, O'SULLIVAN B, 2017).

Los tumores epiteliales, incluido el COCE, presentan una heterogeneidad celular, que se explica por las mutaciones que se producen debido a la inestabilidad genética y a factores ambientales. La hipótesis que explica la heterogeneidad funcional es que no todas las células cancerosas en los tumores sólidos tienen la misma o similar capacidad para impulsar la formación de tumores (REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F.,

& WEISSMAN, 2001). Esta observación se sustenta con la presencia de un subconjunto de células llamadas células madre tumorales (CMT), que sugiere que un tumor puede verse como un órgano alterado que se sostiene, de manera similar a los tejidos normales, por una célula madre que impulsa la carcinogénesis además de una gran población de células diferenciadas que constituye la mayor parte del volumen tumoral, pero que carecen de potencial tumorigénico (PRINCE et al., 2007a).

Un concepto jerárquico actual de la carcinogénesis propone que las CMT se sitúen jerárquicamente por encima de una población de células heterogéneas dentro del tumor, y las CMT se definan funcionalmente como un subconjunto de células que muestran características de células madre, incluida la capacidad de dividirse asimétricamente, lo que resulta en la autorenovación y la producción de poblaciones de células cancerosas heterogéneas que están por debajo en la escala jerárquica (SABRINA DANIELA DA SILVA ET AL., 2011).

La incorporación de las CMT en el análisis de la información molecular no solo proporcionaría una determinación más sensible y específica de los restos de células tumorales, sino que también permitiría la detección del campo "defectuoso" o alterado que no se pueden definir histológicamente, y por lo tanto permitiría una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad y la recurrencia del tumor (CLARK; MAO, 2017). Fue reportado que estos campos pueden tener un diámetro bastante grande, y un estudio observó un campo "defectuoso" de más de 7 cm, que incluía alteraciones genéticas en la mucosa histológicamente normal (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, [s.d.]; TABOR MP, BRAKENHOFF RH; AL., 2002).

Las CMT son un tipo de CM que se diferencian de manera aberrante y puede producir poblaciones de células tumorales que son fenotípicamente diferentes, las CMT conducen la tumorigénesis y el crecimiento tumoral. Sin embargo, el conocimiento de

las proporciones de CMT y CM normales en el tejido sano o tumoral se ve dificultado por la falta de marcadores específicos de CM y CMT, especialmente en COCE y los CCC (BOMAN BM, 2008). Fue informado que un COCE contiene menos de una CMT por cada 2500 células (ISHIZAWA K, RASHEED Z, 2010).

Las proteínas son interesantes como biomarcadores potenciales debido al hecho de que posiblemente participan más diversamente en las actividades celulares que el ADN y el ARN. Por lo tanto, se sugiere que las proteínas pueden ser biomarcadores ideales, particularmente aquellas que son moléculas reguladoras en vías celulares relevantes. Los métodos para medir las proteínas mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunohistoquímica (IHQ) están bien establecidos (SCHAAIJ-VISSER TB, BRAKENHOFF RH, LEEMANS CR, HECK AJ, 2010).

El destino de las CMT está determinado por sus interacciones con las células del microambiente tumoral, incluidos los fibroblastos y las células hematopoyéticas, los componentes de la matriz extracelular (CME), como la fibronectina, la laminina, el colágeno, la osteopontina o el hialuronidasa (HA). Estas señales extracelulares contribuyen a la formación de un nicho que regula la quiescencia, la proliferación y la diseminación de las CMT.

CD44 es una proteína de la superficie celular que interactúa con una variedad de componentes de la CME, citoquinas y factores de crecimiento secretados por células presentes en el microambiente del tumor. Por lo tanto, CD44 ha sido identificado como un marcador de CMT en una variedad de tumores (MORATH; HARTMANN; ORIAN-ROUSSEAU, 2016) . El primer marcador de CMT que se usó en el cáncer de mama fue CD44, Prince et al. en 2007 identificaron un grupo de células CD44 + consideradas como CMT en COCE que podrían reproducir en serie in vivo el tumor original (PRINCE et al., 2007a).

ALDH1A es una isoforma de la aldehído deshidrogenasa, que se expresa en los humanos como una isoenzima detoxificante citosólica que oxida los aldehídos intracelulares y contribuye a la oxidación del retinol a ácido retinoico en la diferenciación temprana de las células madre (MARCATO P, DEAN CA, 2011). Estudios previos han demostrado que ALDH1A es un marcador específico para la identificación de CMT de CCC, y desempeña un papel crucial en el mantenimiento de las propiedades de autorenovación y tumorigenicidad de las CMT derivadas de COCE (CHEN YC, CHEN YW, HSU HS, TSENG LM, HUANG PI, LU KH, CHEN DT, TAI LK, YUNG MC, 2009; CLAY MR, TABOR M, OWEN JH, CAREV TE, BRADFORD CR, GOLF GT, 2010). La sobreexpresión de ALDH1A y podoplanin fueron evaluadas en LO, y concluyeron son buenos marcadores de transformación maligna y los asociaron con el riesgo de transformación de las LO (HABIBA et al., 2017).

Las CMT se consideran importantes en la iniciación y progresión del cáncer y ejercen sus funciones de tumorigénesis afectando vías celulares y moleculares. Varios estudios documentaron que estas subpoblaciones de células cancerosas están asociadas a diferentes propiedades del cáncer, como metástasis, tumorigenicidad y recurrencia. Por lo cual apuntar a las CMT sería una de las opciones de tratamiento más alentadoras, cuyo objetivo es mejorar la eficacia y la especificidad para erradicar los tumores. Las investigaciones sobre los tratamientos dirigidos hacia las CMT serían uno de los campos en pleno desarrollo. Por lo tanto, una mayor y mejor comprensión de las acciones de las CMT puede brindar oportunidades únicas para desarrollar nuevas plataformas terapéuticas para atacar las CMT (BANIEBRAHIMI; MIR; KHANMOHAMMADI, 2020).

2. OBJETIVO GENERAL

- 2.1. Identificar las células epiteliales CD44 + y ALDH1AA +, en distintas etapas de la carcinogénesis oral.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1. Actualizar y revisar los aspectos relacionados con la carcinogénesis y la relación de la células madre tumorales en el cáncer de cabeza y cuello.
- 3.2. Identificar y localizar la inmunexpresión positiva de CD44 y ALDH1A, en las células epiteliales de las lesiones con y sin displasia epitelial.
- 3.3. Identificar y localizar la inmunexpresión positiva de CD44 y ALDH1A, en las células epiteliales de los carcinomas de células escamosas de la mucosa bucal y el tejido epitelial no tumoral adyacente.
- 3.4. Identificar y localizar la inmunexpresión positiva de CD44 y ALDH1A, en las células epiteliales de las lesiones benignas de la mucosa bucal (grupo control).
- 3.5. Analizar la asociación entre la inmunexpresión positiva de CD44 y ALDH1A en las distintas etapas de la carcinogénesis oral con los parámetros clínico-patológicos.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BAIS, M. V. Impact of Epigenetic Regulation on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Dental Research**, [s. l.], p. 268–276, 2019.

BALASUBRAMANIAN D, EBRAHIMI A, GUPTA R, Et al. Tumour thickness as a predictor of nodal metastases in oral cancer: comparison between tongue and floor of mouth subsites. **Oral Oncol.**, [s. l.], v. 50(12), p. 1165–1168, 2014.

BANIEBRAHIMI, Ghazaleh; MIR, Fatemeh; KHANMOHAMMADI, Razieh. Cancer stem cells and oral cancer: Insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12935-020-01192-0>>

BOMAN BM, Wicha MS. Cancer stem cells: a step toward the cure. **J Clin Oncol**, [s. l.], v. 26, p. 2795–2799, 2008.

CHEN YC, CHEN YW, HSU HS, TSENG LM, HUANG PI, LU KH, CHEN DT, TAI LK, YUNG MC, Chang SC. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. **Biochem Biophys Res Commun**, [s. l.], v. 385, p. 307–313, 2009.

CLARK, David J.; MAO, Li. Understanding the Surgical Margin. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 245–258, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2017.03.002>>

CLAY MR, TABOR M, OWEN JH, CAREV TE, BRADFORD CR, GOLF

GT, Wicha MS and Prince ME. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. **Head Neck**, [s. l.], v. 32, p. 1195–1201, 2010.

D'CRUZ AK, VAISH R, KAPRE N, Et al. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. **N Engl J Med.**, [s. l.], v. 373(6), p. 521–529., 2015.

DA SILVA SD, HIER M, MLYNAREK A, KOWALSKI LP, Alaoui-Jamali MA. Recurrent oral cancer: current and emerging therapeutic approaches. **Front Pharmacol.**, [s. l.], v. 3, p. 149, 2012.

FELLER, Liviu L. et al. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: Pathobiology. **Cancer Cell International**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–8, 2013.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 136, n. 5, 2015.

HABIBA, Umma et al. ALDH1A and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. **Oncology Letters**, [s. l.], v. 13, p. 321–328, 2017.

HANAHAN, Douglas et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2328%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1038/nrc3080%5Cnhttp://iopscience.iop.org/0034->

4885/777/076602/article/%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>

HOLMES, Brittany J.; WENIG, Bruce M. Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification. **Annals of Diagnostic Pathology**, [s. l.], v. 38, n. October 2018, p. 29–42, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109291341830323X>>

HUANG, Shao Hui; O’SULLIVAN, Brian. **Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer Current Treatment Options in Oncology**, 2017.

IANCU, D. T.; IANCU, Roxana Irina. Oral Cavity Cancers – General Review. **Romanian Journal of Functional & Clinical, Macro- & Microscopical Anatomy & of Anthropology I**, [s. l.], v. XIV, n. 4, 2015.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER; BOYLE, Peter; LEVIN, Bernard. World Cancer report 2008. **Cancer Control**, [s. l.], v. 199, p. 512, 2008.

ISHIZAWA K, RASHEED Z, Karisch R. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 7, p. 279–282, 2010.

LI, Chia Cheng et al. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. **Dental Clinics of North America**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 29–46, 2018.

LYDIATT WM, PATEL SG, O’SULLIVAN B, Et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J Clin.**, [s. l.], v. 67(2), p. 122–137, 2017.

MADANA J, LALIBERTE F, MORAND GB, Et al. Computerized

tomography based tumor-thickness measurement is useful to predict postoperative pathological tumor thickness in oral tongue squamous cell carcinoma. **J Otolaryngol Head Neck Surg.**, [s. l.], p. 44:49, 2015.

MARCATO P, DEAN CA, Giacomantonio CA and Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: Its role as a cancer stem cell marker comes down to. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 10, p. 1378–1384, 2011.

MARUR, Shanthi; FORASTIERE, Arlene A. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 386–396, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.12.017>>

MORATH, I.; HARTMANN, T. N.; ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44: More than a mere stem cell marker. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [s. l.], v. 81, p. 166–173, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272516302710>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **PNAS**, [s. l.], v. 104, p. 973–978, 2007.

REYA, T., MORRISON, S. J., CLARKE, M. F., & WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, [s. l.], v. 414, p. 105–111, 2001.

SASAHIRA, Tomonori; KIRITA, Tadaaki. **Hallmarks of cancer-related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma**International

Journal of Molecular Sciences, 2018.

SCHAAIJ-VISSER TB, BRAKENHOFF RH, LEEMANS CR, HECK AJ, Slijper M. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. **J Proteomics.**, [s. l.], p. 1790–803, 2010.

SHAH JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. **Oral Oncol**, [s. l.], v. 45(4-5), p. 394–401, 2009.

SHIELD, Kevin D. et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 51–64, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21384>>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer Statistics, 2017. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 67, n. 1, 2017.

SILVA, Sabrina Daniela Da et al. Advances and applications of oral cancer basic research. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 783–791, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.004>>

SLAUGHTER, Danely P.; SOUTHWICK, Harry W.; SMEJKAL, Walter. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 963–968, 1953.

SOLOMON, Benjamin; YOUNG, Richard J.; RISCHIN, Danny. **Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments** **Seminars in Cancer Biology**, 2018.

STENMARK, Matthew H. et al. Influence of human papillomavirus on the

clinical presentation of oropharyngeal carcinoma in the United States.

Laryngoscope, [s. l.], v. 127, n. 10, p. 2270–2278, 2017.

STOECKLI SJ. Sentinel node biopsy for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck. **Laryngoscope.**, [s. l.], v. 117(9), p. 1539–1551, 2007.

TABOR MP, BRAKENHOFF RH, Ruijter-Schippers HJ; AL., Et. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. **Am J Pathol**, [s. l.], v. 161(3), p. 1051–60, 2002.

WESTRA, William H.; LEWIS, James S. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. **Head and Neck Pathology**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2017.

ARTICULO 1

“Actualización sobre el comportamiento biológico del carcinoma oral de células escamosas”

“Update on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma”

*** Estandarizado para su envío a la revista — Acta Odontológica Venezolana**

“Actualización sobre el comportamiento biológico del carcinoma oral de células escamosas”

“Update on the biological behavior of oral squamous cell carcinoma”

Aurita Verónica Beovide Cortegoso 1 ¹ 0000-0003-0888-507X

Pantelis Varvaki Rados 2 ⁰⁰⁰⁰⁻⁰⁰⁰¹⁻⁹³⁰⁷⁻¹⁹⁸⁰

1 Universidad de la República Facultad de Odontología .Laboratorio de Anatomía Patológica Montevideo, Uruguay. Dufort y Alvarez 3419.

Autor de correspondencia beovide@gmail.com, 099758369

2 Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS/Brasil. UFRGS.

DCI- Declaro no tener conflictos de intereses financieros ni personales que puedan influir inapropiadamente en el desarrollo de esta revisión.

Resumen

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello comprende la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello. Es un tumor agresivo que surge a partir de una mucosa sana o en relación a los cambios y/o alteraciones del epitelio bucal como es la displasia epitelial (DE), que sufre modificaciones genéticas y epigenéticas para progresar a la malignidad. **Metodología-** Para la actualización del tema se revisaron las bases de datos, MEDLINE / PubMed, fue realizada una búsqueda de artículos entre los años 2010 a 2020, la revisión fue complementada con búsqueda manual de las listas de referencias de cada artículo seleccionado, utilizando como palabras claves “carcinoma oral de células escamosas”, “comportamiento biológico”, “carcinogénesis” y “biomarcadores moleculares”. **Discusión-** Fueron discutidos características importantes del desarrollo del carcinoma oral de células escamosas en relación a su comportamiento biológico, desde el tumor propiamente dicho como el microambiente en donde se desarrolla y conecta. **Conclusiones-** Podemos concluir que el microambiente tumoral donde participan una variedad de células, dentro de ellas las células madre tumorales, las cuales serían las encargadas de dirigir los procesos que conducen a la resistencia a las terapias y a la producción de metástasis a distancia. La invasión tumoral, la diseminación y la producción de metástasis a distancia, son las características que describen su comportamiento agresivo.

Palabras clave: “carcinoma oral de células escamosas”, “comportamiento biológico”, “carcinogénesis” y “biomarcadores moleculares.”

Abstract

Squamous cell carcinoma of the head and neck comprises most head and neck cancers. It is an aggressive tumor that arises from a healthy mucosa or in relation to changes and / or alterations in the oral epithelium, such as epithelial dysplasia, which undergoes genetic and epigenetic modifications to progress to malignancy. **Methodology-** To update the topic, the databases, MEDLINE / PubMed, were reviewed, an article search was performed between the years 2010 to 2020, the review was complemented with a manual search of the reference lists of each selected article, using as key words "oral squamous cell carcinoma", " biological behavior", "carcinogenesis" and "molecular biomarkers". **Discussion-** Important characteristics of the development of oral squamous cell carcinoma in relation to its biological behavior were discussed, from the tumor itself as the microenvironment where it develops and connects. **Conclusions-** We can conclude that the tumor microenvironment where a variety of cells participate, including cancer stem cells, which would be in charge of directing the processes that lead to resistance to therapies and the production of distant metastases. Tumor invasion, dissemination, and distant metastasis are the characteristics that describe his aggressive behavior.

Key words: "oral squamous cell carcinoma", " biological behavior", "carcinogenesis" and "molecular biomarkers."

1. Introducción

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) comprende la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello (CCC). El CCECC está constituido por un grupo heterogéneo de tumores que emergen del epitelio escamoso de la cavidad oral, orofaringe, laringe e hipofaringe, donde el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la variante histológica más frecuente, constituyendo el 90% de todos los cánceres de la región de cabeza y cuello (1,2).

El COCE es un cáncer agresivo que surge a partir de una mucosa sana o en relación a los cambios y/o alteraciones del epitelio bucal como es la displasia epitelial (DE), que sufre modificaciones genéticas y epigenéticas para progresar a la malignidad. Las modificaciones epigenéticas llevan como resultado la adquisición de resistencia terapéutica, lo que resulta en pobres resultados para los pacientes con COCE, la tasa de sobre-vida a los 5 años para estos pacientes es de solo 50% (3).

En el COCE el proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones graduales (cambios en las capas mucosas) que presumiblemente ocurren en toda la superficie epitelial de la cavidad oral y son seguidas por la invasión de células tumorales (4). La carcinogénesis es un proceso complejo de múltiples pasos o escalones con una maquinaria compleja, iniciado por señales oncogénicas anormales en diferentes vías de la señalización celular (5,6).

El proceso que lleva a las células del epitelio normal del tracto aerodigestivo superior a transformarse en células malignas, son las mutaciones en genes específicos y la alteración de su expresión. Estos genes controlan la reparación del ADN, la proliferación, la inmortalización, la apoptosis, la invasión y la angiogénesis. Tanto la activación de oncogenes como la inactivación de proteínas supresoras de tumores que

participan en estas vías (6,7).

El objetivo del presente trabajo fue proporcionar información actualizada sobre el comportamiento biológico del carcinoma oral de células escamosas de la mucosa bucal.

2. Metodología

Para la actualización del tema se revisaron las bases de datos, MEDLINE / PubMed buscando publicaciones científicas de actualidad, la revisión fue complementada con búsqueda manual de las listas de referencias de cada artículo seleccionado. Fue realizada una búsqueda de artículos entre los años 2010 a 2020 utilizando como palabras clave “carcinoma oral de células escamosas”, “comportamiento biológico”, “carcinogénesis” y “biomarcadores moleculares”, siendo también incluidos en la revisión otros artículos encontrados en las citas bibliográficas de éstos, solo si eran relevantes para este trabajo. Los criterios de inclusión de los artículos se establecieron siguiendo las palabras claves y que fueran investigaciones científicas, revisiones sistemáticas y meta- análisis. Se excluyeron series de casos, resultados duplicados debido a combinaciones de los términos de búsqueda.

Se examinaron los títulos y resúmenes de todos los artículos identificados por medio de búsquedas electrónicas. Se obtuvo el artículo completo de los estudios que parecían reunir los criterios de inclusión y ser relevantes.

3. Desarrollo

3.1. Origen del Carcinoma Oral de Células Escamosas

El epitelio oral está en un proceso constante de recambio. Los epitelios delgados

no queratinizados, como el epitelio del piso de la boca y la cara ventral de lengua, se renuevan más rápidamente que los epitelios queratinizados de mayor espesor, como los del paladar duro y la encía. Esto se debe a que la tasa de proliferación de los queratinocitos basales es mayor en los epitelios no queratinizados que en los epitelios queratinizados. El riesgo de mutaciones citogenéticas y la posterior transformación cancerosa es mayor en los queratinocitos basales con una mayor tasa de división celular, que en aquellos con una menor tasa de división celular, por lo tanto, presentan un mayor riesgo de mutaciones citogenéticas en el epitelio no queratinizado (8,9) . En las capas basales y parabasales del epitelio oral, se produce la proliferación de las células, se conocen como el compartimento de las células progenitoras. Este compartimento de células progenitoras comprende dos poblaciones de células funcionalmente distintas: una población más pequeña de células madre específicas de tejido y una población más grande de células de transición amplificadoras (9).

Las células madre específicas del tejido ocupan un nicho especializado en relación con las células vecinas. Las células madre tienen la información genómica del epitelio oral, no están diferenciadas, pero tienen la capacidad de diferenciarse. Se dividen con poca frecuencia, tienen la capacidad de auto-renovación ilimitada, mantienen la expresión activa de la telomerasa y no se someten fácilmente a la apoptosis (8–10).

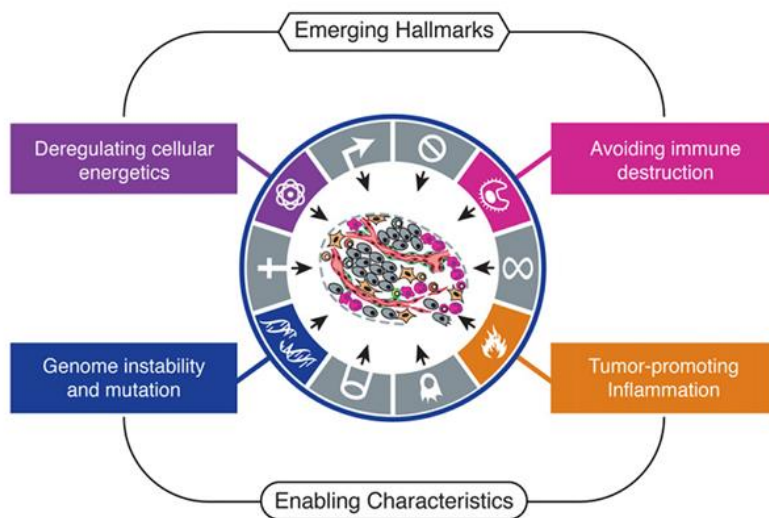
Se observó con el uso de técnicas de biología molecular, la presencia de variaciones genómicas en los COCE, destacándose dos observaciones importantes: i. los tumores con el mismo origen varían considerablemente con respecto a sus variaciones genómicas y ii. los tumores que muestran patrones similares de variaciones genómicas tienen diferentes orígenes. Estos hallazgos hacen que el tratamiento de estos sea un desafío. Por lo tanto, el investigador busca la inestabilidad genética o los cambios en el número y estructura de los cromosomas, por considerarse una

característica importante en la oncogénesis. La inestabilidad genética se adquiere en las células tumorales debido a defectos en la segregación de los cromosomas, alteraciones en el número de copias, pérdida de heterocigosidad, estabilidad de los telómeros, regulación de los puntos de control del ciclo celular y reparación de daños en el ADN (11,12).

Las modificaciones epigenéticas ocurren dentro de la cromatina nuclear. La cromatina se divide en 2 categorías: la heterocromatina contiene genes inactivos, está muy condensada y se puede replicar tarde; la eucromatina contiene la mayoría de los genes activos y es relativamente abierta. El balance de reguladores epigenéticos es crítico para mantener células y tejidos sanos, la desregulación, la mutación, la sobreexpresión o la atenuación de los reguladores epigenéticos son la clave para cambiar el equilibrio hacia la transformación oncogénica, lo que lleva al crecimiento de CCC y la producción de metástasis (3).

El tejido canceroso es considerado como un "órgano" complejo. El microambiente del tumor está compuesto por una variedad de células, incluidas las células tumorales, las células madre tumorales (CMT), las células inflamatorias y los fibroblastos asociados al cáncer, junto con los vasos sanguíneos. Es posible que las CMT participen en los procesos que conducen a la resistencia a la terapia y al producción de metástasis a distancia (13).

Hanahan y Weinberg en 2011, propusieron los siguientes "10 sellos del cáncer" que son fundamentales para la progresión tumoral: mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, evitar la destrucción inmune, activar la invasión y la metástasis, promoción de la inflamación por el tumor, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis, la inestabilidad y mutación del genoma, resistir la muerte celular y la desregulación energética (6,14).Esquema 1



Esquema 1- Características distintivas emergentes de los sellos del cáncer. Capacidad para modificar o reprogramar, el metabolismo celular que promueve la proliferación neoplásica. Evasión de las células cancerígenas a la respuesta inmunológica de destrucción. La inestabilidad genómica. Respuesta inflamatoria promotora del tumor. Tomado de Hanahan y Weinberg 2011 (14).

3.2. Los sellos del cáncer y su relación con los factores pronósticos

Además de las células cancerosas, los tumores exhiben otra dimensión de complejidad: contienen una colección de células ostensiblemente normales reclutadas que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos al crear el "microambiente tumoral". El reconocimiento de la aplicabilidad generalizada de estos conceptos afectará cada vez más el desarrollo de nuevos medios para el tratamiento del cáncer humano (14) .

3.2.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa

Las células sanas regulan las señales de crecimiento a través de factores de crecimientos solubles unidos a la membrana; las células cancerosas tienen un crecimiento autónomo y caótico debido a la desregulación de las señales de crecimiento (14). La familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF) son receptores

transmembrana tirosina quinasa que comprenden el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o el receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER1), HER2, HER3 y HER4 (15). Los estudios han establecido una correlación entre la expresión de EGFR, EGFR fosforilada (pEGFR), HER2 o HER4 y una pobre supervivencia de los pacientes con COCE (16,17).

3.2.2. Evasión de los supresores del crecimiento

En las células tumorales, varios genes supresores tumorales están asociados con señales anti-crecimiento que se inactivan por mutación, delección y metilación. Ya fue establecido que el guardián del genoma humano p53 desempeña un papel fundamental en la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, la reparación del ADN y la apoptosis. Las mutaciones somáticas en p53 se detectan en el 60–80% de los COCE y en el 10% en la displasia oral (18). Recientemente, los datos del Genome Wide Association Study han demostrado que generalmente p53 se muta en casos de COCE HPV negativo (19,20).

3.2.3. Evitar la destrucción inmune

Entre los linfocitos, las células T citotóxicas CD8 + (CTL) sirven como células inmunitarias antitumorales en cooperación con las células tipo 1 cooperadoras CD4 + T (células Th1). Sin embargo, las quimiocinas pueden reclutar células CD4 + Th2 y células reguladoras de CD4 + T (Treg) en el microambiente tumoral, lo que provoca inhibición de la respuestas de CTL (21).

Los niveles de secreción y expresión de interleucina -8 (IL) están implicados con deficientes resultados clínicos a través de la generación de macrófagos M2 positivos para D163 en COCE (22). El ligando 1 de muerte celular programado (PD-L1) y su receptor PD-1 juegan un papel central en el escape inmune del tumor y en la formación de un microambiente tumoral (23). La sobreexpresión de PD-L1 en células tumorales y

PD-1 en linfocitos infiltrantes en el tumor se correlaciona con un mal pronóstico en varios cánceres humanos (24). El mal pronóstico en los casos de COCE y la metástasis ganglionar fue demostrado con la expresión de PD-L1 / PD-1 (25).

3.2.4. Activación de la invasión y las metástasis del COCE

La metástasis se produce principalmente a través de los ganglios linfáticos cervicales del lado afectado. Existe una secuencia de pasos que son fundamentales para la invasión, diseminación y metástasis de las células cancerosas: 1. Disminución de la adhesión celular y desprendimiento de las células cancerosas; 2. Interrupción de la membrana basal; 3. Movilidad de las células cancerosas e infiltración estromal; 4. Intravasación; 5. Migración intravascular; 6. Extravasación; 7. Crecimiento de células cancerosas en los focos metastásicos (18).

3.2.5. Inflamación como promotor del tumor

Aparentemente, las células inflamatorias promueven el desarrollo, el avance y la metástasis al producir citoquinas. La inflamación puede alterar el microambiente tumoral al inducir el crecimiento, la supervivencia, la producción de factores pro-angiogénicos y especies reactivas de oxígeno. También puede modificar la matriz extracelular, promoviendo así la angiogénesis, la invasión y la metástasis (14). Además, los fibroblastos estromales pueden jugar un papel vital en la reacción desmoplásica al secretar matriz extracelular. Eltohami y col. (26), informaron que la puntuación de la inflamación sistémica, se basa en la suma de albúmina y la proporción de linfocitos y monocitos, esto está estrechamente relacionado con la progresión local, el estadio clínico, la profundidad del tumor, la invasión perineural, la extensión extranodal, y una peor supervivencia. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima pro-inflamatoria que convierte el ácido araquidónico en prostaglandina, promoviendo la invasión de células y la metástasis del COCE (27).

3.2.6. Inmortalidad replicativa

La longitud de los telómeros es mantenida por la telomerasa, y su actividad está regulada por la expresión de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), como la subunidad catalítica de la telomerasa (28). Además, el telómero desempeña un papel crucial en la tumorigénesis y la progresión del COCE. La disfunción del telómero es un predictor válido de radio resistencia en el COCE. Además, los niveles altos de expresión de hTERT están involucrados en la fase temprana de la carcinogénesis oral y con los resultados desfavorables para los pacientes con COCE (28).

3.2.7. Inducción de angiogénesis

Aunque el cáncer causa hipoxia tisular, la provisión de oxígeno y nutrientes y la extracción de productos de desecho son esenciales para las células tumorales. La angiogénesis, es la formación de nuevos vasos sanguíneos y la linfangiogénesis, es la proliferación de nuevos vasos linfáticos, estos son esenciales para el crecimiento, la invasión y la metástasis de las células malignas. Un estudio reciente sugirió que la terapia génica anti-angiogénica podría ser útil para la prevención y el tratamiento temprano de tumores malignos (29,30).

Dentro de los reguladores de la angiogénesis están las proteínas de señalización, que se unen a los receptores inhibidores o estimulantes en la superficie celular de las células endoteliales, éstos son el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A) y la tromboespondina 1 (TSP-1) (14)

3.2.8. Inestabilidad del genoma y mutación

Es sabido que el COCE surge de múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas provocadas por la exposición crónica a carcinógenos como el alcohol, el tabaco, las sustancias químicas tóxicas, las infecciones virales y la inflamación; estas alteraciones genéticas incluyen deleciones, mutaciones puntuales, metilación, amplificación del

oncogén e inactivación de genes supresores tumorales (18). La pérdida de heterocigosidad (LOH) en los cromosomas 3p, 9p (inactivación de p16) y 17p (inactivación de p53) se correlaciona con la fase temprana de la carcinogénesis oral; a la inversa, las alteraciones genéticas en los cromosomas 4q, 8p, 11q y 13q se correlacionan con la fase tardía de la carcinogénesis oral (31).

La capacidad de los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y resolver defectos en el ADN, aseguran que las tasas de mutación espontánea sean generalmente muy bajas durante cada generación celular (14)

3.2.9. Resistencia a la muerte celular

El escape a la apoptosis permite que las células malignas sobrevivan más tiempo, lo que proporciona más tiempo para acumular mutaciones (32). La apoptosis puede ocurrir a través de las vías tanto extrínseca (muerte iniciada por el receptor) como intrínseca (mitocondriales). La vía extrínseca se desencadena por la unión del factor de necrosis tumoral γ (TNF γ), activando así la caspasa-8 y -3. La vía intrínseca está regulada por la familia de proteínas del linfoma de células B (Bcl-2). La sobreexpresión de Bcl-2 está fuertemente relacionada con un mal pronóstico de los pacientes con COCE (32). La pérdida del control de la apoptósis permite que las células cancerosas sobrevivan más tiempo y acumulen mutaciones y aumenten la invasividad durante la progresión tumoral, estimulan la angiogénesis, desregulan la proliferación celular (32).

3.2.10. Desregulación energética

En condiciones aeróbicas, las células sanas producen adenosintrifosfato (ATP) a partir de la glucosa en las mitocondrias y la fosforilación oxidativa en el sistema de transferencia de electrones. Además, el ATP se produce a través de la vía glucolítica anaeróbica, que descompone la glucosa en el citoplasma y produce ácido láctico (18). Sin embargo, las células cancerosas pueden producir energía a través de la glucólisis

aeróbica en presencia de oxígeno (efecto Warburg) (14,33). Otro factor crucial relacionado con la energía celular es el factor 1α (HIF1 α) inducido por hipoxia que modula la transactivación del gen diana en condiciones hipóxicas (34). Además, la expresión de HIF1- α se correlacionó con la angiogénesis, la linfangiogénesis y el mal pronóstico del COCE (35).

3.3. Células madre tumorales y carcinoma oral de células escamosas

En el modelo convencional de evolución clonal de la carcinogénesis, una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos puede tener un impacto en cualquier célula epitelial oral, produciendo un clon con ventajas proliferativas que puedan desarrollar características de invasividad. De acuerdo con la hipótesis de las células madre tumorales (CMT) recientemente propuesta, solo las células que sobreviven por mucho tiempo, como las células madre (CM), pueden acumular suficientes alteraciones oncogénicas para que se desencadene la carcinogénesis. Por lo tanto, las CMT transformadas estarían involucradas en la aparición, progresión y diseminación del tumor. Si este es el caso, los malos resultados de las terapias contra el cáncer oral podrían ser atribuidos a su orientación a toda la masa tumoral en lugar de a las células específicas responsables de su desarrollo, crecimiento y propagación. Por otro lado, se ha atribuido a las CMT mecanismos de defensa molecular y otras características que puedan protegerlas contra el tratamiento radio y quimioterapéutico convencional (36,37).

El concepto de CMT se basa en el supuesto de que las neoplasias malignas se organizan de manera jerárquica, y las CMT representan una subpoblación tumorigénica que se perpetúa en el tiempo para preservar su identidad y tienen la característica de autorrenovación y la capacidad de diferenciación para dar lugar a células diferenciadas en masa con disminución potencial de propagación del tumor (38,39). Desde una perspectiva diferente, el modelo CMT implica que la heterogeneidad morfológica y

fenotípica intratumoral observada en un espectro muy amplio de cánceres, refleja la diversidad funcional entre las células malignas, con solo un subconjunto de ellas capaz de alimentar el crecimiento del tumor dando lugar a un volumen mayor de células (a través de la diferenciación) y, al mismo tiempo, manteniendo la población de CMT a través de la auto-renovación (40).

En general, la forma más simplista y completa de definir de manera descriptiva el concepto de CMT es que, al igual que los tejidos normales, los crecimientos malignos se organizan de manera jerárquica con células madre neoplásicas dotadas de auto-renovación y diferenciación capaces de dar lugar a más células progenitoras comprometidas, además de dar nuevas células madre cancerosas alimentando así continuamente el crecimiento del tumor (40,41).

Los tumores epiteliales, incluido el COCE, presentan una heterogeneidad celular, que se explica por las mutaciones que se producen debido a la inestabilidad genética y a factores ambientales. La hipótesis que explica la heterogeneidad funcional es que no todas las células cancerosas en los tumores sólidos tienen la misma o similar capacidad para impulsar la formación de tumores (41). Esta observación se sustenta con la presencia de las CMT, que sugiere que un tumor puede verse como un órgano alterado que se sostiene, de manera similar a los tejidos normales, por una célula madre que impulsa la carcinogénesis además de una gran población de células diferenciadas que constituye la mayor parte del volumen tumoral, pero que carecen de potencial tumorigénico (42).

Un concepto jerárquico actual de la carcinogénesis propone que las CMT se sitúen jerárquicamente por encima de una población de células heterogéneas dentro del tumor, y las CMT se definan funcionalmente como un subconjunto de células que muestran características de células madre, incluida la capacidad de dividirse

asimétricamente, lo que resulta en la autorenovación y la producción de poblaciones de células cancerosas heterogéneas que están por debajo en la escala jerárquica (43).

La incorporación de las CMT en el análisis de la información molecular no solo proporcionaría una determinación más sensible y específica de los restos de células tumorales, sino que también permitiría la detección del campo "defectuoso" o alterado que no se pueden definir histológicamente, y por lo tanto permitiría una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad y la recurrencia del tumor (44). Fue reportado que estos campos pueden tener un diámetro bastante grande, y un estudio observó un campo "defectuoso" de más de 7 cm, que incluía alteraciones genéticas en la mucosa histológicamente normal (45,46).

Las CMT son un tipo de CM que se diferencian de manera aberrante y puede producir poblaciones de células tumorales que son fenotípicamente diferentes, las CMT conducen la tumorigénesis y el crecimiento tumoral. Sin embargo, el conocimiento de las proporciones de CMT y CM normales en el tejido sano o tumoral se ve dificultado por la falta de marcadores específicos de CM y CMT, especialmente en COCE y los CCC (47). Fue informado que un COCE contiene menos de una CMT por cada 2500 células (48).

Existe la necesidad, por lo tanto, de eliminar las CMT además de las células tumorales masivas o "bulk" (no CMT). La transición epitelio mesénquima (TEM) es un programa regulador implicado para la reversión de CM no tumorales a CMT. Durante la TEM, las células epiteliales pierden la adhesión intercelular, se acompañan de un aumento de las propiedades invasivas y de migración, que es un requisito previo para la metástasis. Aunque las terapias dirigidas a CMT resultan en su eliminación, y las CM no tumorales no se ven afectadas, si no se eliminan, estas células tienen la capacidad de convertirse espontáneamente en CMT mediante la inducción de TEM. Las terapias

que erradican las CMT e inhiben la TEM, se convirtieron en una estrategia atractiva para prevenir la recaída tumoral, la resistencia a los medicamentos y la metástasis (49,50) .

3.4. Marcadores moleculares de identificación de las células madre tumorales en el COCE

Los biomarcadores tumorales pueden ser cualquier molécula única o una combinación de más de una molécula celular, incluyendo ADN, ARN, proteínas, péptidos, carbohidratos o pequeños metabolitos que son específicos de la enfermedad y podrían medirse para analizar y monitorear la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los estudios de biomarcadores de proteínas han sido reconocidos por su importancia y, por lo tanto, se han utilizado enfoques proteómicos para el descubrimiento de biomarcadores de diversas enfermedades (51).

Las proteínas son interesantes como biomarcadores potenciales debido al hecho de que posiblemente participan más diversamente en las actividades celulares que el ADN y el ARN. Por lo tanto, se sugiere que las proteínas pueden ser biomarcadores ideales, particularmente aquellas que son moléculas reguladoras en vías celulares relevantes. Los métodos para medir las proteínas mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunohistoquímica (IHQ) están bien establecidos (51).

El destino de las CMT está determinado por sus interacciones con las células del microambiente tumoral, incluidos los fibroblastos y las células hematopoyéticas, los componentes de la matriz extracelular (CME), como la fibronectina, la laminina, el colágeno, la osteopontina o el hialuronidasa (HA). Estas señales extracelulares contribuyen a la formación de un nicho que regula la quiescencia, la proliferación y la diseminación de las CMT. CD44 es una proteína de la superficie celular que interactúa con una variedad de componentes de la CME, citoquinas y factores de crecimiento secretados por células presentes en el microambiente del tumor. Por lo tanto, CD44 ha sido identificado como un marcador de CMT en una variedad de tumores (52) .

El primer marcador de CMT que se usó en el cáncer de mama fue CD44, Prince et al. en 2007 identificaron un grupo de células CD44 + consideradas como CMT en COCE que podrían reproducir in vivo el tumor original (42).

Sin embargo, se han planteado preguntas sobre el valor de CD44 como marcador CMT en el COCE, debido a la mayor expresión de la proteína por células epiteliales orales normales y tumorales (53,54), debido a que una pequeña cantidad de CMT están presentes en los tejidos orales. También se debate sobre la utilidad de CD44 como marcador de la progresión y pronóstico del COCE. Debido a que algunos investigadores asociaron una mayor expresión de CD44 con una mayor agresividad del tumor, mientras que otros asociaron la reducción o pérdida de la expresión de CD44 con una pronóstico negativo (55,56).

La identificación de CMT proporciona una nueva posibilidad terapéutica para mejorar el tratamiento del cáncer (57). Estudios previos realizados en varios tipos de cáncer han informado que estas CMT exhiben una mayor expresión de ciertos biomarcadores (58). Descubrir biomarcadores efectivos es fundamental para una mejor comprensión de las características biológicas de las CMT. Se han propuesto varias moléculas de proteínas putativas para identificar las CMT en los COCE, entre ellos están incluidos CD44, CD133, Nanog, Oct4, Sox2 y ALDH1 (59).

4. Conclusiones

El COCE es el tumor maligno más frecuente de la cavidad bucal, presenta un comportamiento agresivo que explica la recurrencia loco-regional. El microambiente del tumor está compuesto por una variedad de células, dentro de ellas las CMT serían las encargadas de dirigir los procesos que conducen a la resistencia a las terapias y a la producción de metástasis a distancia (13). La invasión tumoral, la diseminación y la producción de metástasis a distancia, son las características que describen el

comportamiento agresivo del COCE.

El COCE es un tumor heterogéneo con aberraciones genéticas y epigenéticas, que abarcan una amplia gama de vías oncogénicas. La investigación dirigida a identificar biomarcadores que puedan identificar tumores con mayor potencial invasivo y metastásico, es crucial para avanzar en la mejora de las estrategias terapéuticas personalizada para los pacientes con COCE.

Hemos tratado de revisar las características distintivas del cáncer, que proporcionan un marco teórico de interés para comprender la compleja biología del COCE, esto es necesario para poder instaurar terapéuticas que mejoren la calidad de vida de los pacientes con cáncer bucal.

5. Referencias Bibliográficas

1. Westra WH, Lewis JS. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1).
2. Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Dent Clin North Am.* 2018;62(1):29–46.
3. Bais M V. Impact of Epigenetic Regulation on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Dental Research.* 2019;268–76.
4. Fukuda M, Kusama K SH. Molecular insights into the proliferation and progression mechanisms of the oral cancer: Strategies for the effective and personalized therapy. *Japanese Dent Sci Rev.* 2012;48:23–41.
5. Kumar D, Sharma S, Verma S, Kumar P, Ambasta RK. Molecular Signalling Saga in Tumour Biology *Molecular Signalling Saga in Tumour Biology.* 2015;3(August):5–10.

6. Calzada AP, St. John MA, Abemayor E, Wong DTW. Molecular pathology of head and neck cancer. *Mol Surg Pathol*. 2013;9781461449(June 2015):307–23.
7. Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. Vol. 70, *Oral Oncology*. 2017. p. 23–8.
8. Squier CA KM. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;29:7–15.
9. Miller S, Sun T CP. Epidermal growth and differentiation. Fitzpatrick's *Dermatology Gen Med Ed* by Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D New York McGraw-Hill; 2008;357–83.
10. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM P V, JS G. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2009;45:324–334.
11. Bakhoun SF, Compton DA. Chromosomal instability and cancer: A complex relationship with therapeutic potential. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1138–43.
12. Reshmi SC, Gollin SM. CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE Chromosomal Instability in Oral Cancer Cells. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004;107–17.
13. Ohnishi Y, Yasui H, Nozaki M, Nakajima M. Molecularly-targeted therapy for the oral cancer stem cells. *Jpn Dent Sci Rev [Internet]*. 2018 May [cited 2019 Feb 26];54(2):88–103. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S188276161730042X>
14. Hanahan D, Weinberg RA, Weaver VM, Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell [Internet]*. 2011;144(5):646–74. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2328>
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3080>
<http://iopscience.iop.org/0034-4885/77/7/076602/article/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>

15. Vanessa F Bernardes, Frederico O Gleber-Netto, Sílvia F Sousa, Tarcília A Silva MCFA. Clinical significance of EGFR, Her-2 and EGF in oral squamous cell carcinoma: A case control study. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2010;29(1):1–7. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L50896171%0A>
<http://dx.doi.org/10.1186/1756-9966-29-40>
16. Monteiro LS, Ricardo S, Delgado ML, Garcez F, do Amaral B, Lopes C. Phosphorylated EGFR at tyrosine 1173 correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral Dis*. 2014;20(2):178–85.
17. Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CAL, Kowalski LP, et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol*. 2008;44(5):484–90.
18. Kirita, T., Omura K. *Molecular Biology of the Oral Cancer*. In *Oral Cancer Diagnosis and Therapy* Title. Eds.; Springer: Tokyo J, editor. Oral Cancer. 2015. 63-68 p.
19. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: Implications for therapy. *J Dent Res*. 2008;87(1):14–32.
20. Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, Gabriel SB, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517:576–82.
21. Panda S, Padhiary SK, Routray S. Chemokines accentuating protumoral activities

- in oral cancer microenvironment possess an imperious stratagem for therapeutic resolutions. *Oral Oncol* [Internet]. 2016;60:8–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.06.008>
22. Fujita Y, Okamoto M, Goda H, Tano T, Nakashiro KI, Sugita A, et al. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(12):1–17.
 23. He J, Hu Y, Hu M, Li B. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(March):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep13110>
 24. Kim C Ohaegbulam¹, Amer Assal², Eszter Lazar-Molnar³, Yu Yao⁴ and XZ. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med*. 2015;21:24–33.
 25. Maruse Y, Kawano S, Jinno T, Matsubara R, Goto Y, Kaneko N, et al. Significant association of increased PD-L1 and PD-1 expression with nodal metastasis and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2018;47(7):836–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2018.01.004>
 26. Eltohami YI, Kao HK, Lao WWK, Huang Y, Abdelrahman M, Liao CT, et al. The Prediction Value of the Systemic Inflammation Score for Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol - Head Neck Surg (United States)*. 2018;158(6):1042–50.
 27. Kurihara Y, Hatori M, Ando Y, Ito D, Toyoshima T, Tanaka M, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the invasiveness of oral squamous cell carcinoma

- cell lines via down-regulation of matrix metalloproteinase-2 production and activation. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(5):425–32.
28. Zhao T, Hu F, Qiao B, Chen Z, Tao Q. Telomerase reverse transcriptase potentially promotes the progression of oral squamous cell carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol*. 2015;46(5):2205–15.
 29. Sasahira T, Kirita T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Bosserhoff AK, et al. MIA-dependent angiogenesis and lymphangiogenesis are closely associated with progression, nodal metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* [Internet]. 2010;46(12):2285–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2010.04.027>
 30. Li T, Kang G, Wang T, Huang H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). *Oncol Lett*. 2018;16(1):687–702.
 31. Sasahira T, Bosserhoff AK, Kirita T. The importance of melanoma inhibitory activity gene family in the tumor progression of oral cancer. *Pathol Int* [Internet]. 2018 May [cited 2019 Mar 23];68(5):278–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pin.12672>
 32. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2).
 33. O. Warburg. On the origin of cancer cells. *Science* (80-). 1956;123(3191):309–14.
 34. Zhu GQ, Tang YL, Li L, Zheng M, Jiang J, Li XY, et al. Hypoxia inducible factor 1 α and hypoxia inducible factor 2 α play distinct and functionally overlapping roles in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2010;16(19):4732–41.
 35. De Lima PO, Jorge CC, Oliveira DT, Pereira MC. Hypoxic condition and prognosis

- in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2014;34(2):605–12.
36. Warnakulasuriya S, Khan Z. *Squamous Cell Carcinoma Molecular Therapeutic Targets*. Springer S. Saman Warnakulasuriya Zakir Khan, editor. Van Godewijckstraat 30, 3311 GX Dordrecht, The Netherlands; 2017. 281 p.
 37. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Joseph I, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. 2011;70(23):9969–78.
 38. Zhang S, Wang Y, Yang X, Xiao M, Liu L. Cancer stem cell biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma: A bioinformatic analysis. *Oncol Rep.* 2018;3843–51.
 39. Peitzsch C, Nathansen J, Schniewind SI, Schwarz F, Dubrovskaya A. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: Identification, characterization and clinical implications. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
 40. Atlasi Y, Looijenga L, Fodde R. Cancer Stem Cells, Pluripotency, and Cellular Heterogeneity. A WNTer Perspective. *Curr Top Dev Biol.* 2014;107.
 41. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105–11.
 42. 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. *PNAS.* 2007;104:973–8.
 43. Silva SD Da, Ferlito A, Takes RP, Brakenhoff RH, Valentin MD, Woolgar JA, et al. Advances and applications of oral cancer basic research. *Oral Oncol [Internet]*. 2011;47(9):783–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.07.004>

44. Clark DJ, Mao L. Understanding the Surgical Margin. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2017;29(3):245–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2017.03.002>
45. Tabor MP, Brakenhoff RH R-SH, Al. E. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol*. 2002;161(3):1051–60.
46. Baniebrahimi G, Mir F, Khanmohammadi R. Cancer stem cells and oral cancer: insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. [cited 2020 May 19]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01192-0>
47. Boman BM WM. Cancer stem cells: a step toward the cure. *J Clin Oncol*. 2008;26:2795–9.
48. Ishizawa K, Rasheed Z KR. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell*. 2010;7:279–82.
49. Liu Q, Li RT, Qian HQ, Wei J, Xie L, Shen J, et al. Targeted delivery of miR-200c/DOC to inhibit cancer stem cells and cancer cells by the gelatinases-stimuli nanoparticles. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(29):7191–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.004>
50. Pindiprolu SH, Pindiprolu SKSS. CD133 receptor mediated delivery of STAT3 inhibitor for simultaneous elimination of cancer cells and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *Med Hypotheses*. 2019;129(May).
51. Schaaij-Visser TB, Brakenhoff RH, Leemans CR, Heck AJ SM. Protein biomarker discovery for head and neck cancer. *J Proteomics*. 2010;1790–803.
52. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Apr 1];81:166–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272516302710>

53. González-Moles MA, Bravo M R-AI et al. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol.* 2004;40:281–286.
54. Oliveira LR, Oliveira-Costa JP AI et al. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011;40:135–142.
55. Clay MR, Tabor M OJ et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 2010;32:1195–1201.
56. Joshua B, Kaplan MJ DI et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* 2012;34:42–9.
57. Wolmarans E, Boy SC, Nel S MA and PM. Cancer stem cells in head and neck carcinomas: Identification and possible therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol.* 2017;Nov 15.
58. Shaikh MV KM and NM. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. *Cancer Biomark.* 2016;16:301–7.
59. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, SantarelliA, RubiniC M, Giuliante R, Calabrese S, Di Ruscio G, Orlando F et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Physiol Biochem.* 2015;36:784–98.

ARTICULO 2

**Cancerización de Campo y Células Madre
Tumorales en el Carcinoma Oral de Células Escamosas**

*** Estandarizado para su envío a la revista — “Odontoestomatología”**

1 Título del artículo en español, inglés y portugués;

- a. **Cancerización de Campo y Células Madre Tumorales en el Carcinoma Oral de Células Escamosas**
- b. **Field Cancerization and Cancer Stem Cells in Oral Squamous Cell Carcinoma**
- c. **Campo de cancerização e células-tronco tumorais no carcinoma epidermoide oral**

2. Autores

2.1. Aurita Verónica Bevide Cortegoso ¹ 0000-0003-0888-507X

2.2. Pantelis Varvaki Rados ⁰⁰⁰⁰⁻⁰⁰⁰¹⁻⁹³⁰⁷⁻¹⁹⁸⁰

3. Contribución de Autoría :

3.1. V.B. ha contribuido en 1, 2, 3, 4, 5, 6.

3.2. P.V. ha contribuído en 1, 4, 5, 6. Corrija si le parece

4. Autor de correspondencia bevide@gmail.com, 099758369,

5. DCI- Declaro no tener conflictos de intereses financieros ni personales que puedan influir inapropiadamente en el desarrollo de esta revisión.

Resumen

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas es el tumor maligno más frecuente de la cavidad bucal y representa el sexto cáncer más común en el mundo. Se da principalmente en hombres entre la 6ta -7ma década de la vida, los factores de riesgo son el tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, infección por virus del papiloma humano y alteraciones genéticas. La recurrencia loco-regional se relaciona a las características patológicas y/o alteraciones moleculares de la mucosa bucal. **Objetivo:** El objetivo fue describir la importancia de la cancerización de campo y la presencia de las células madre tumorales, en el carcinoma oral. **Metodología:** Se realizó una búsqueda en MEDLINE / PubMed publicaciones enero de 2000 hasta abril de 2020. **Conclusiones:** El efecto de la cancerización de campo y de las células madre tumorales, ayudan a explicar las razones de la recurrencia y la visión del manejo de los pacientes con carcinoma oral.

Palabras claves- “células madre tumorales”, “cancerización de campo”, “carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello” y “pronostico”.

Abstract

Introduction: Oral squamous cell carcinoma is the most frequent malignant tumor of the oral cavity and represents the sixth most common cancer in the world. It occurs mainly in men between the 6th -7th decade of life, the risk factors are smoking, excessive consumption of alcohol, infection by the human papilloma virus and genetic alterations. The loco-regional recurrence is related to the pathological characteristics and / or molecular alterations of the oral mucosa.

Objective: The objective was to describe the importance of field cancerization and the presence of cancer stem cells in oral carcinoma. **Methodology:** A search of MEDLINE / PubMed publications from January 2000 to April 2020 was carried out. **Conclusions:** The effect of field cancerization and cancer stem cells help to explain the reasons for recurrence and the vision of the management of patients with oral carcinoma.

Key words- "cancer stem cells", "field cancerization", "squamous cell carcinoma of the head and neck" and "prognosis".

Resumo

Introdução: O carcinoma epidermoide oral é o tumor maligno mais frequente da cavidade oral e representa o sexto câncer mais comum no mundo. Ocorre principalmente em homens entre as 6^{ta} a 7^{ma} décadas da vida, fatores de risco são tabagismo, consumo excessivo de álcool, infecção pelo vírus do papiloma humano e alterações genéticas. A recorrência locorregional está relacionada às características patológicas e / ou alterações moleculares da mucosa oral.

Objetivo: O objetivo foi descrever a importância do campo de cancerização e a presença de células-tronco tumorais no carcinoma oral. **Metodologia:** Foi realizada uma pesquisa nas publicações MEDLINE / PubMed de janeiro de 2000 a abril de 2020. **Conclusões:** O efeito do campo de cancerização e das células-tronco tumorais ajuda a explicar os motivos da recorrência e a visão do manejo dos pacientes com carcinoma bucal.

Palavras-chave - "células-tronco tumorais", campo de cancerização, "carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço" e "prognóstico".

1. Introducción

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el tumor maligno más frecuente en la cavidad bucal y representa el sexto cáncer más común en todo el mundo ⁽¹⁻³⁾. El COCE deriva del epitelio escamoso estratificado de revestimiento del tracto digestivo superior, presentándose en personas entre la 6ta -7ma década de la vida, se da principalmente en hombres con una relación hombre: mujer que varía de 2: 1 a 4: 1 ^(4,5). Se asocia principalmente a historia de tabaquismo, consumo excesivo de alcohol, infección por virus del papiloma humano (VPH) y alteraciones genéticas ^(2,6-9).

A nivel mundial la incidencia anual del cáncer de cabeza y cuello (CCC), es de 550.000 nuevos casos y 300.000 muertes cada año, una de las características de mayor impacto en la sobrevida de los pacientes con COCE, es la recurrencia loco-regional, que ocurre entre el 10–30% de los pacientes, y el desarrollo de segundos tumores primarios, con un rango de incidencia que varía del 2% al 30% ^(10,11).

De acuerdo a los datos de Globocan de 2018 la incidencia de cáncer de cavidad oral y labio en América del Sur es de 4.3 para hombres y 1.7 para mujeres expresado en tasas estandarizadas por edad cada 100.000 hab. ^(2,12). En Uruguay los datos del Registro Nacional de Cáncer (RNC) sobre cáncer buco-faríngeo para el período 2011-2015, reportan cifras de mortalidad de 6,67 para los hombres y 1,21 para mujeres y de incidencia de 10.17 para hombres y 2.81 para mujeres, expresado en tasas ajustadas por grupo etario por 100.000 hab. ⁽¹³⁾.

El COCE puede desarrollarse directamente de una mucosa sana o de lesiones pre-existentes en un proceso de múltiples etapas, esta progresión requiere la acumulación de múltiples alteraciones genéticas, epigenéticas y

cromosómicas, que están influenciadas por la predisposición genética / epigenética del paciente y por influencias ambientales, tales como el tabaco, el alcohol, infección por el virus del papiloma humano (VPH) ^(14,16).

El desarrollo de recurrencias y segundos tumores primarios, incluso cuando los márgenes quirúrgicos son histopatológicamente libres de tumores se relaciona a las características patológicas y/o alteraciones del punto de vista molecular de la mucosa adyacente al tumor ^(17,18) . La discusión sobre la extensión de los márgenes quirúrgicos en pacientes con cáncer oral, cuando se evalúa el riesgo de recurrencia es permanente; el aspecto histológico no siempre puede ser un predictor confiable del riesgo de recidiva, la histopatología convencional no es sensible para identificar aquellas células que ya han comenzado el proceso de transformación maligna pero que aún no han desarrollado un fenotipo completamente neoplásico. Los estudios que investigan sobre los cambios moleculares en los tumores, los márgenes tumorales y la mucosa oral normal de los pacientes con COCE ayudarían a identificar aquellos biomarcadores que puedan predecir la posibilidad de recurrencia ^(19,20).

La evaluación histológica precisa de los márgenes en las resecciones quirúrgicas del COCE es vital; debe tenerse en cuenta en esta evaluación las diferencias anatómicas de los diferentes sitios de la cavidad bucal, las diferencias en cuanto al manejo quirúrgico de los tejidos y la falta de estandarización con respecto a un margen adecuado. La evaluación histopatológica de los márgenes en el COCE adquiere subjetividad cuando se clasifica la gravedad de enfermedad como displasia moderada o severa o carcinoma in situ por parte de un patólogo que puede entrar en conflicto con otros patólogos ⁽²¹⁾, hay patólogos

que consideran margen positivo a la presencia de carcinoma in situ pero no frente a la presencia de displasia ⁽²²⁾. La falta de uniformidad en la evaluación histológica de los márgenes quirúrgicos en el COCE puede llevar a la presencia de enfermedad residual y esto influye en la sobrevida y la recaída en estos pacientes.

En el análisis de los aspectos patológicos relacionados con la recurrencia loco-regional adquieren importancia la “cancerización de campo” (CaC) y la identificación de una subpoblación de células con capacidad de autorrenovación y propagación del tumor llamadas las células madre tumorales (CMT) ^(23,24).

Esta revisión tiene como objetivo describir la relevancia de la cancerización de campo y la presencia de las células madre tumorales, en la recurrencia del carcinoma oral de células escamosas de la mucosa bucal.

2. Revisión de la Bibliografía y Metodología

Bases MEDLINE, Scopus, LILACS, desde enero de 2000 hasta abril de 2020. Las referencias bibliográficas de todos los estudios identificados y los artículos de revisión relevantes se revisaron en busca de estudios adicionales no localizados en la búsqueda manual. Como criterio de inclusión se seleccionaron estudios que tuviesen relación con el tema de esta revisión, en base a las palabras claves. Los términos [MeSH] de búsqueda fueron: “Cáncer Stem Cell”, “Field Cancerization,”, “Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck”. Se incluyeron artículos de los años 1953 y 1996 por ser de referencia en la temática motivo de la revisión. Los tipos de estudio fueron, artículos de investigación, revisiones sistemáticas y meta –análisis, se excluyeron reportes de casos. No

hubo restricciones de idioma. Se examinaron los títulos y resúmenes (disponibles) de todos los artículos identificados por medio de búsquedas electrónicas. Se obtuvo el artículo completo de los estudios que parecían reunir los criterios de inclusión, o de los cuales no había datos suficientes en el título y el resumen para seleccionarlo. Todos los estudios que cumplieron con los criterios de inclusión fueron evaluados a fin de establecer su validez.

De una búsqueda inicial de 272 artículos, se seleccionaron 120 en base al título y resumen, se descartaron estudios que no cumplían con los criterios de inclusión y el relacionamiento del comportamiento biológico del COCE en relación a la CaC y CMT, luego de revisar los textos completos se seleccionaron 64 artículos que estuvieron relacionados a los intereses de la revisión y que se correspondían con los criterios de inclusión.

3. Desarrollo

3.1. Cancerización de campo

El concepto de CaC fue introducido por Slaughter quien encontró tejido histológicamente alterado alrededor del COCE, esto explicaría el desarrollo de múltiples tumores primarios y tumores locales recurrentes ⁽¹⁷⁾.

Slaughter en 1953, propone el concepto de CaC basándose en las siguientes observaciones: (i) mucosa adyacente al tumor que es "anormal" a nivel molecular (ii) áreas multifocales de cambios precancerosos desarrollados por una exposición prolongada y extendida a agentes carcinógenos (iii) el cáncer oral en ocasiones se desarrolla por la coalescencia de múltiples lesiones independientes y (iv) la formación de segundos tumores primarios y recurrencias

debido a la presencia de tejido neoplásico residual después de la cirugía ^(17,25,26). Califano J. col. consideran el término de CaC desde un punto de vista "molecular", el cual sería considerado como el resultado de eventos moleculares, ya sea independientes que afectan a varias células por separado, o como un evento molecular en un único progenitor clonal que da lugar al fenómeno. Estos dos mecanismos podrían no ser excluyentes y ser simultáneos y/o complementarios ⁽¹⁵⁾.

Ha sido propuesta una explicación o teoría alternativa para la aparición de múltiples lesiones pre-neoplásicas y se basa en una migración generalizada de células transformadas a través de todo el tracto aerodigestivo. Las formas de migración serían: (a) migración de células tumorales como micrometástasis, por ejemplo a través de la saliva o (b) migración intraepitelial de la progenie de las células inicialmente transformadas ^(15,27).

El concepto de CaC sigue vigente en los términos que fue definido en 1953 por Slaughter, esto adquiere relevancia principalmente en la evaluación de los márgenes quirúrgicos cuando se planea el tratamiento quirúrgico del COCE, la importancia en cuanto a la extensión del mismo, con el objetivo de evitar la recaída de la enfermedad ^(17,28).

La evaluación de la mucosa adyacente al tumor adquiere valor por la importancia que tiene la CaC en la posibilidad de recaída y para explicar el fracaso local de la enfermedad, esta mucosa presenta alteraciones moleculares, además de estar expuesta a los mismos carcinógenos que el tejido tumoral. Las principales alteraciones moleculares son las mutaciones en oncogenes / genes supresores tumorales, pérdida de heterocigosidad (LOH) e inestabilidad

genómica ^(24,29-31). Las células que adquieren estas alteraciones ganan la capacidad de poder extender los campos neoplásicos y desarrollar a futuro la formación de segundos tumores, se describe que estas células reemplazarían a las células normales de la mucosa adyacente, aumentando la susceptibilidad del epitelio a más golpes genéticos y epigenéticos ^(24,32,33).

Los estudios de biología molecular aportaron a la comprensión de las bases genéticas de la carcinogénesis desarrollada en varios pasos. Se ha estimado que son necesarios alrededor de cinco mutaciones genéticas para transformar una célula epitelial normal en una maligna ^(1,34).

El proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones graduales (cambios en las capas mucosas) que presumiblemente ocurren en toda la superficie epitelial de la cavidad oral y son seguidas por la invasión de las células tumorales ⁽³⁵⁾. El proceso que lleva a las células del epitelio normal del tracto aerodigestivo superior a transformarse en células malignas, son las mutaciones en genes específicos y la alteración de su expresión. Estos genes controlan la reparación del ADN, la proliferación, la inmortalización, la apoptosis, la invasión y la angiogénesis. Tanto la activación de oncogenes como la inactivación de proteínas supresoras de tumores que participan en estas vías ^(1,36).

El epitelio oral está en un proceso constante de recambio. Los epitelios delgados no queratinizados, como el epitelio del piso de la boca y la cara ventral de lengua, se renuevan más rápidamente que los epitelios queratinizados de mayor espesor, como los del paladar duro y la encía. Esto se debe a que la tasa de proliferación de los queratinocitos basales es mayor en los epitelios no

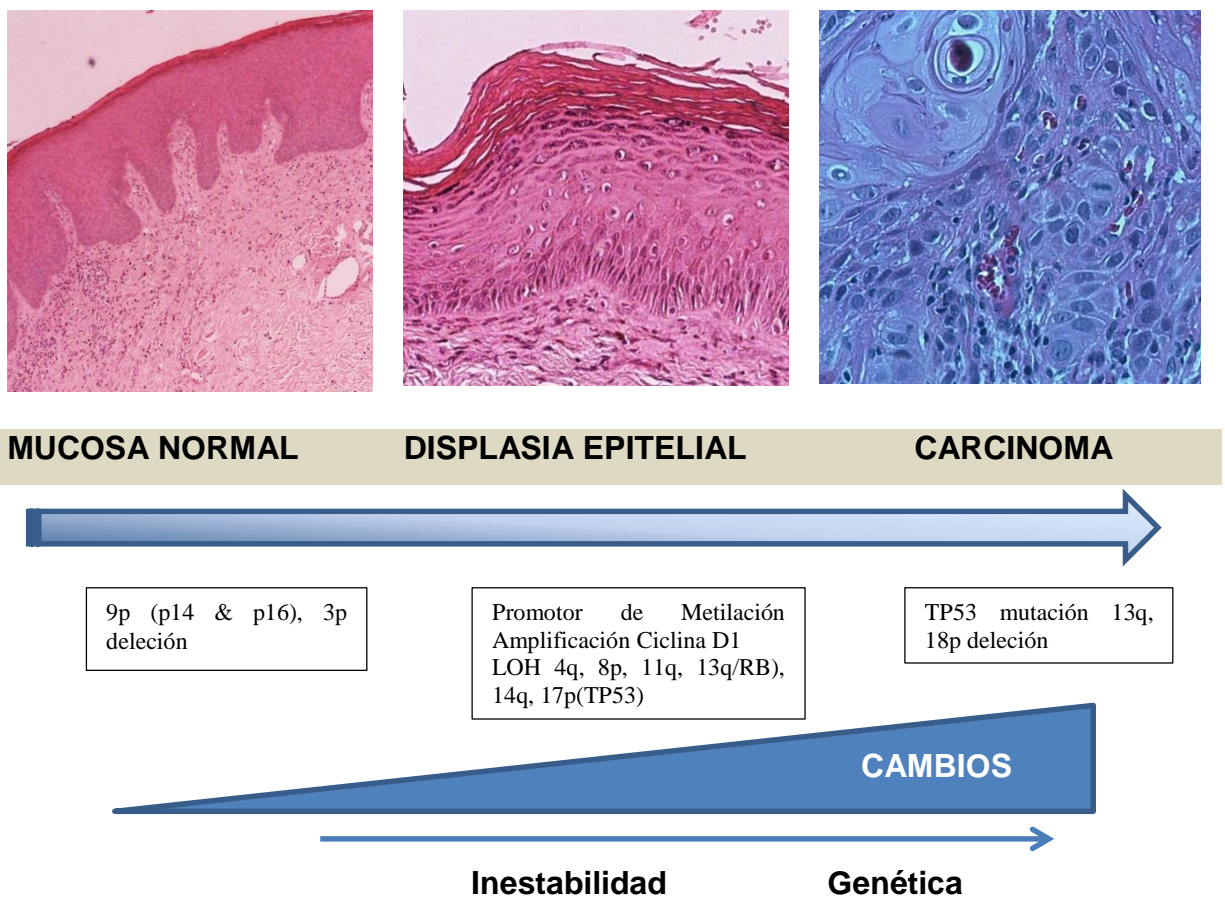
queratinizados que en los epitelio queratinizados. El riesgo de mutaciones citogenéticas y la posterior transformación maligna es mayor en los queratinocitos basales con una mayor tasa de división celular, que en aquellos con una menor tasa de división celular, por lo tanto, presentan un mayor riesgo de mutaciones citogenéticas el epitelio no queratinizado ^(37,38). La pérdida de material cromosómico en 3p, 9q y 17p se observa con mayor frecuencia en lesiones displásicas, y se consideran marcadores tempranos de la carcinogénesis. La pérdida de 13q y 8p observados en los carcinomas fueron consideran cambios tardíos ^(15,31,39).

La cavidad oral está expuesta a sustancias cancerígenas presentes en el tabaco como benzopireno y nitrosaminas, alcohol o infección con virus oncogénicos como el virus del papiloma humano (VPH). En consecuencia a la acción de estos factores de riesgo el COCE al igual que otros tipos de cáncer, pueden desarrollarse debido a cambios genéticos causados por estos carcinógenos. Es generalmente aceptado que las combinaciones de estos cambios genéticos inicialmente resultan en el desarrollo de lesiones oral potencialmente maligna (displásicas) que puede progresar a carcinoma invasivo en condiciones sostenidas de alteraciones genéticas. Basado en las alteraciones genéticas que actúan en la mucosa bucal es que Califano desarrolla el modelo de progresión genética para el COCE (Esquema 1) ^(15,37,47).

El concepto de CaC establece que cuando un carcinógeno provocó una alteración en los tejidos de la mucosa bucal con características de malignidad clínica, explica la posibilidad de riesgo a que ocurra en otra parte de la cavidad

oral la misma alteración celular, debido al efecto de campo, esto lleva a la posibilidad de recurrencia de lesiones premalignas y malignas y la presencia de múltiples lesiones primarias inclusive luego de una intervención quirúrgica (17,40,41) .

Es importante tener en cuenta especialmente las zonas de alto riesgo, como la lengua y el piso de la boca, donde la presencia de lesiones subclínicas aumenta la posibilidad de un cambio maligno, lo que exige un seguimiento a largo plazo de los paciente con antecedentes de displasia o malignidad debido al riesgo de desarrollo de un segundo tumor primario (40).



Esquema 1- Modelo de progresión genética de carcinogénesis oral de múltiples pasos propuesto por Califano y col. (15).

3.2. Células Madre Tumoraes en el COCE

El COCE está formado por una población celular con gran heterogeneidad funcional que puede explicar el hecho de que no todas las células cancerosas tienen una misma capacidad para impulsar el crecimiento tumoral. Un tumor puede ser visto como un órgano aberrante que es sostenido, como pasa en los tejidos normales, por una célula madre que impulsa la tumorigénesis, lo que se evidencia por una población de progeñe diferenciada que constituye la mayor parte del tumor pero que carece de un potencial tumorigénico ⁽⁴²⁾. Esta hipótesis se basa en estudios en leucemias, neoplasias hematológicas y cáncer de mama donde fueron aisladas células de acuerdo a la expresión de biomarcadores de superficie celular, donde se diferenciaron las poblaciones de células tumorigénicas y no tumorigénicas, que demostraron que en muchos casos de cáncer de mama, solo una pequeña subpoblación de células tenía la capacidad de formar nuevos tumores. Este hallazgo provee información sobre los posibles mecanismos moleculares que median la autorrenovación de estas células y demuestra el valor de identificar y caracterizar a las CMT a nivel molecular y poder desarrollar nuevas estrategias de tratamiento dirigidas contra esa población ⁽⁴³⁾.

En el modelo convencional de evolución clonal de la carcinogénesis, una acumulación de cambios genéticos y epigenéticos actúan en las células epiteliales de la mucosa bucal, produciendo un clon con ventajas proliferativas y de invasividad. La teoría de que el cáncer puede ser originado y sostenido por una pequeña subpoblación de células madre con capacidad de autorenovación, denominadas CMT, éstas serían las encargadas de iniciar y mantener el

desarrollo del tumor ⁽⁴³⁻⁴⁶⁾. La CMT dentro del tumor tienen una división lenta y resistente, y están involucradas en el mantenimiento del tumor, la invasión, la metástasis, la resistencia a los medicamentos y la recurrencia del COCE, son altamente tumorigénicas y se consideran una de las principales causas de recurrencia del cáncer después de la terapia convencional debido a su mayor resistencia contra las modalidades de radioterapia y quimioterapia ^(47,48). Las CMT impulsan la carcinogénesis y el crecimiento tumoral, por lo cual tener marcadores específicos para su identificación es de gran importancia para el manejo terapéutico del COCE ⁽⁴⁷⁾.

Las CMT son subpoblaciones tumorales malignas que se organizan de forma jerárquica las cuales representan a la subpoblación tumorigénica con propiedades de autorrenovación para preservar su identidad y con capacidades de diferenciación para dar lugar a un volumen más diferenciado de células con bajo potencial de propagación ⁽⁴⁹⁾. Altasi y col. describen un patrón de CMT con heterogeneidad morfológica y fenotípica intratumoral que reflejan la diversidad funcional entre las células tumorales malignas, donde un subconjunto de ellas son capaz de compensar el crecimiento tumoral mediante diferenciación y, al mismo tiempo, mantienen la población mediante la autorrenovación ⁽⁵⁰⁾.

Las CMT son una pequeña subpoblación de células tumorales similares a las células madres del tejido normal y comparten las características de autorrenovación. Dado que las CMT tienen propiedades autorrenovadoras y tumorigénicas, y en general están inactivas y requieren de menos nutrientes, esto las hace más resistentes a la quimio-radiación y a sobrevivir en un ambiente hostil ⁽⁵¹⁾.

Dadas las propiedades de autorrenovación, las CMT participan no solo en el crecimiento tumoral y en la formación de metástasis, sino también en la recaída de la enfermedad, lo que hace que la expresión de genes y proteínas relacionada con CMT ayude a un objetivo terapéutico. Dado que éstas poseen las propiedades tumorigénicas la eliminación completa de toda la población de CMT junto con las no CMT, llevaría a un control definitivo del tumor y la cura del paciente ⁽⁵²⁾.

La incorporación de las CMT en el análisis de la información molecular no solo proporcionaría una determinación más sensible y específica de los restos de células tumorales, sino que también permitiría la detección del campo "defectuoso" o alterado que no se pueden definir histológicamente, y por lo tanto permitiría una mejor comprensión de la progresión de la enfermedad y la recurrencia del tumor ⁽²⁰⁾.

Sin embargo, las CMT parecen tener mecanismos especialmente efectivos para contrarrestar y evadir los intentos terapéuticos. Dada la plasticidad celular de las CMT, que conducen a los cambios en su fenotipo que dependen de los distintos factores micro ambientales incluida la terapia, aún se necesitan estudios más profundos, sobre los mecanismos que contribuyen a la plasticidad de las CMT, con el objetivo de eliminarlas eficazmente. Actualmente los estudios que analizan las CMT en el COCE se basan en estudios in vitro o análisis inmunohistoquímicos de muestras de tejido de pacientes pre-tratamiento, falta aún la validación clínica en estudios prospectivos ^(49,52) .

Las CMT se distribuyen de forma perivascular, se encuentran en un nicho con un microambiente propicio para poder sobrevivir y proteger la capacidad de

autorrenovación ^(53,54). Esta proximidad da a las CMT la posibilidad de invadir los vasos sanguíneos e iniciar la diseminación a distancia ^(49,55).

En el COCE existen grandes áreas hipóxicas y de necrosis tumoral donde el crecimiento excede la angiogénesis. La respuesta hipóxica y la inflamación son fuerzas estimuladoras de la angiogénesis. Además, las CMT en el COCE se concentran a lo largo del frente de invasión tumoral y del nicho perivascular, en un área dentro de las 100 μm de la microvasculatura ^(56,57).

Existe evidencia que describe poblaciones de CMT heterogéneas en los COCE, que incluye varias subpoblaciones de CMT con distintos estados fenotípicos y funcionales: CMT con características mesenquimales y capacidades migratorias versus CMT proliferativas que conservan características epiteliales ⁽⁵⁸⁾. Aún no está claro cómo las CMT llevan a cabo el proceso de diseminación y metástasis en los carcinomas.

Un mejor conocimiento de la pluripotencialidad, el control de la diferenciación celular y de la programación epigenética es fundamental para las principales aplicaciones terapéuticas a futuro. Además el intento en clarificar y seguir investigando en caracterizar las subpoblaciones de CMT en el cáncer oral, ayudará a una mejor comprensión de la recurrencia del cáncer oral, las metástasis, la resistencia al tratamiento y facilitaría la aplicación de terapias más efectivas para el cáncer. Poder conocer el perfil molecular y estado proliferativo de las CMT, en un tumor dado puede ser de valor pronóstico para la mejor sobrevida, la respuesta al tratamiento, el riesgo de recurrencia y metástasis. Actualmente existen estudios dirigidos a desarrollar una vacuna terapéutica autóloga basada en CMT para uso clínico en un entorno adyuvante ^(58,59).

3. Discusión

Se estima que la transformación maligna de una célula normal requiere de 3 a 6 eventos oncogénicos ⁽⁶⁰⁾. El modelo genético de progresión a COCE, que correlaciona las alteraciones genéticas con la progresión fenotípica a la malignidad ^(15,16) provee una acumulación de mutaciones suficientes para desarrollar COCE esto sería posible en células con una larga vida. Las CMT con larga supervivencia, pueden acumular suficientes alteraciones oncogénicas para que se active la carcinogénesis ⁽⁶¹⁾, fue reportado que en los COCE hay menos de una CMT por cada 2500 células tumorales.

Kim y col. demostraron que el anticuerpo anti-IL-6R humanizado (Tocilizumab) redujo la motilidad y la supervivencia de las CMT. Este estudio muestra que las células endoteliales secretan interleucina IL-6 por lo que existe un posible mecanismo a partir de éstas células para la regulación de las CMT y la diseminación metastásica ⁽⁶²⁾. Las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos asociados al tumor expresan más IL-6 que las propias células tumorales, aún falta saber el papel de la IL-6 secretada por células endoteliales en el comportamiento migratorio de las CMT ⁽⁶³⁾.

El aislamiento de CMT a partir de marcadores de superficie celular en muestras de tumor y seguidos de cultivo de esferoides (oro-esferas) será de gran utilidad para el establecimiento de líneas celulares que pueden proporcionar sistemas modelo in vitro que repliquen las características funcionales de las células madre en el microambiente del tumor y su posible respuesta a las terapias ^(50,64).

CD44 es una proteína de la superficie celular que interactúa con una variedad de componentes de la matriz extracelular, citoquinas y factores de crecimiento secretados por células presentes en el microambiente del tumor. Esta proteína fue identificada como marcador de CMT en una variedad de tumores ⁽⁶⁵⁾, se usó por primera vez en el cáncer de mama, Prince y col. en 2007 identificaron un grupo de células CD44 + consideradas como CMT en COCE que podrían reproducir en serie in vivo el tumor original ⁽⁶⁶⁾.

Estudios previos han demostrado que ALDH1 (aldehído deshidrogenasa) es un marcador específico para la identificación de CMT, y desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de las propiedades de autorrenovación y tumorigenicidad de las CMT derivadas del COCE ^(67,68).

Habiba y col en 2017 presentan un estudio que investiga la expresión combinada de ALDH1 y podoplanina para la evaluación del riesgo de cáncer oral en pacientes con LO, encontraron una asociación positiva de riesgo de transformación maligna, por lo cual aconsejan el seguimiento de esos paciente. Sin embargo, se requieren más estudios para definir completamente las asociación de estos biomarcadores en el inicio y progresión del cáncer oral ⁽⁶⁹⁾.

El efecto de la CaC en la mucosa bucal de pacientes con COCE, ayuda a explicar las razones de la recurrencia del tumor, a pesar de los márgenes quirúrgicos libres histológicamente de neoplasia maligna, esto condiciona la visión en el manejo por parte de los cirujanos de los márgenes quirúrgicos en el COCE ⁽²⁰⁾. La información molecular puede ayudar a mejorar el análisis del margen quirúrgico, siendo que la coloración convencional de hematoxilina y eosina no permite identificar esa alteración expresada molecularmente ^(20,70).

4. Conclusiones

El desarrollo de un tumor está relacionado con el crecimiento local y con la diseminación de un grupo de células en los tejidos normales adyacentes y/o distantes al tumor primario, concepto que explica el efecto de la CaC propuesto por Slaughter. El otro factor a tener en cuenta es la presencia de CMT que escapan a los mecanismos de control normal y obtienen una ventaja de crecimiento. A medida que el tejido alterado comienza a expandirse, el tumor se desarrolla y comienza a extenderse y las poblaciones celulares adquieren progresivamente más alteraciones genéticas, lo que es un riesgo grave que lleva al desarrollo de un clon maligno ^(71,72).

Las CMT son las principales células en regular la tumorigénesis, la proliferación, la agresividad, la quimio - radorresistencia, la recurrencia y la metástasis del COCE. La heterogeneidad celular de los tumores, la alteración y expresión diferencial de varios marcadores de células madre y factores de transcripción, juegan un papel importante en la proliferación clonal ⁽⁶⁾.

El conocimiento de genes que intervienen en este complejo proceso pueden ayudar, y para ello es necesario que sean validados como marcadores diagnósticos o pronósticos, con un objetivo terapéutico potencial, para un mejor manejo a futuro de los pacientes con COCE ^(64,73). Baniebrahimi y col. en una revisión sobre las CMT y los enfoques terapéuticos y moleculares afirman la importancia de focalizarse en las CMT como una de las opciones de tratamiento alentadoras y con el objetivo de mejorar la eficacia y la especificidad para erradicar los tumores y disminuir la toxicidad sistémica ⁽⁷⁴⁾.

Otra línea de investigación está dirigida al desarrollo de vacunas terapéutica basada en CMT para uso clínico, con valor adyuvante al tratamiento del cáncer oral ⁽⁵⁹⁾.

Hay esperanzas que el futuro cercano traiga nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos que resultarán en una mejora significativa en el manejo de COCE y esto lleve a cambios sustantivos en las tasas de supervivencia y a la mejor calidad de vida de los pacientes.

5. Referencias Bibliográficas

1. Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. Vol. 70, Oral Oncology. 2017. p. 23–8.
2. Bray F, Ferlay ; Jacques, Soerjomataram ; Isabelle, ;, Siegel RL, Torre ; Lindsey A., et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA CANCER J CLIN. 2018;68:394–424.
3. Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. Dent Clin North Am. 2018;62(1):29–46.
4. Curtarelli RB, Gonçalves JM, dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. Stem Cell Rev Reports. 2018;14(6):769–84.
5. Summary E, Relevance PH. LOCALLY ADVANCED SQUAMOUS

CARCINOMA OF THE HEAD AND NECK Executive Summary. 2014;1–8.

Available from:

https://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/20/applications/HeadNeck.pdf

6. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(5):269–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.11>
7. Chen S-W, Zhang Q, Guo Z-M, Chen W-K, Liu W-W, Chen Y-F, et al. Cancer Management and Research Dovepress Trends in clinical features and survival of oral cavity cancer: fifty years of experience with 3,362 consecutive cases from a single institution. *Cancer Manag Res* [Internet]. 2018 [cited 2018 Oct 31];10(497):160. Available from: <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S171251>
8. Neville B, Damm DD, Allen C, Chi A. *Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016. 928 p.
9. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2015;24(3):379–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.001>
10. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, TZELLOS TG, Xirou P, Kitikidou K, Antoniadis K, et al. Clinical, histological and demographic predictors for recurrence and second primary tumours of head and neck basal cell carcinoma. A 1062 patient-cohort study from a tertiary cancer referral hospital. *Eur J Dermatology* [Internet]. 2010 May [cited 2019 Sep 15];20(3):276–82.

Available from: <http://www.john-libbey-eurotext.fr/medline.md?doi=10.1684/ejd.2010.0903>

11. Farquhar DR, Tanner AM, Masood MM, Patel SR, Hackman TG, Olshan AF, et al. Oral tongue carcinoma among young patients: An analysis of risk factors and survival. *Oral Oncol.* 2018;84.
12. Soerjomataram I, Parkin DM, Colombet M, Znaor A, Mathers C, Bray F, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2018;00:1–13.
13. Registro Nacional de Cáncer Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. SITUACION EPIDEMIOLOGICA DEL URUGUAY EN RELACION AL CANCER. 2019.
14. Nakashima T, Tomita H, Hirata A, Ishida K, Hisamatsu K, Hatano Y, et al. Promotion of cell proliferation by the proto-oncogene DEK enhances oral squamous cell carcinogenesis through field cancerization. *Cancer Med.* 2017;6(10):2424–39.
15. Califano J, Riet P Van Der, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Advances in Brief Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer: Implications for. Analysis [Internet]. 1996;56(11):2488–92. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/abstract/56/11/2488>
16. Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, et al. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and

- normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2018;47(8):976–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2018.01.020>
17. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963–8.
 18. Feller LL, Khammissa RRAG, Kramer BB, Lemmer JJ. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: Pathobiology. *Cancer Cell Int*. 2013;13(1):1–8.
 19. Eljabo N, Nikolic N, Carkic J, Jelovac D, Lazarevic M, Tanic N, et al. Genetic and epigenetic alterations in the tumour, tumour margins, and normal buccal mucosa of patients with oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018;47(8):976–82.
 20. Clark DJ, Mao L. Understanding the Surgical Margin. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2017;29(3):245–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coms.2017.03.002>
 21. Upile T, Fisher C, Jerjes W et al. The uncertainty of the surgical margin in the treatment of head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2007;43(4):321–6.
 22. Meier JD, Oliver DA VM. Surgical margin determination in head and neck oncology: current clinical practice. The results of an International American Head and Neck Society Member Survey. *Head Neck*. 2005;27(11):952–8.
 23. Fortuna G, Mignogna MD. Oral field cancerization. *Cmaj*.

- 2011;183(14):1622.
24. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 2015.
 25. Tabor MP, Brakenhoff RH, Van Houten VMM, Kummer JA, Snel MHJ, Snijders PJF, et al. Persistence of Genetically Altered Fields in Head and Neck Cancer Patients: Biological and Clinical Implications 1 [Internet]. 2001 [cited 2018 Oct 31]. Available from: <http://gdbwww.gdb.org/>.
 26. Angadi P V., Savitha JK, Rao SS, Sivaranjini RY. Oral field cancerization: Current evidence and future perspectives. *Oral Maxillofac Surg*. 2012;16(2):171–80.
 27. Van Oijen MGCT, Slootweg PJ. Oral field cancerization: Carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9(3):249–56.
 28. Liao C-T, Wallace CG, Lee L-Y, Hsueh C, Lin C-Y, Fan K-H, et al. Clinical evidence of field cancerization in patients with oral cavity cancer in a betel quid chewing area. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2019 Feb 26];50(8):721–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837514001341>
 29. Lazarevic M, Milosevic M, Trisic D, Toljic B, Simonovic J, Mikovic N, et al. Putative cancer stem cells are present in surgical margins of oral squamous cell carcinoma. 2018;23(6):1686–92.
 30. Vinício M, Oliveira M De, Alberto C, Fraga DC. FIELD CANCERIZATION

IN HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA:
immunohistochemical expression of p53 and Ki67 proteins:
clinicopathological study TÍTULO Cancerização por campo em carcinoma
de células escamosas: expressão imuno-histoquímica de proteínas .
2010;6(1):17–27.

31. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Brakenhoff RH, Rene C. Perspectives in Cancer Research A Genetic Explanation of Slaughter ' s Concept of Field Cancerization : Evidence and. *Oncology*. 2003;1727–30.
32. BRAAKHUIS B, LEEMANS C, BRAKENHOFF R. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2005 Apr;15(2):113–20.
33. Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: Evidence and clinical implications. *Cancer Research*. 2003.
34. Hanahan D, Weinberg RA, Weaver VM, Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2328><http://dx.doi.org/10.1038/nrc3080><http://iopscience.iop.org/0034-4885/77/7/076602/article/><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
35. Fukuda M, Kusama K SH. Molecular insights into the proliferation and progression mechanisms of the oral cancer: Strategies for the effective and

- personalized therapy. *Japanese Dent Sci Rev.* 2012;48:23–41.
36. Calzada AP, St. John MA, Abemayor E, Wong DTW. Molecular pathology of head and neck cancer. *Mol Surg Pathol.* 2013;9781461449(June 2015):307–23.
 37. Squier CA KM. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;29:7–15.
 38. Miller S, Sun T CP. Epidermal growth and differentiation. *Fitzpatrick's Dermatology Gen Med Ed* by Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D New York McGraw-Hill; 2008;357–83.
 39. Sapkota D. S100 Gene Family Members in Oral Squamous Cell Carcinomas (OSCCs): Functional Characterization of S100A14 in Proliferation and Invasion of OSCC Derived Cells. 2011.
 40. Awadallah M, Idle M, Patel K, Kademani D. Management update of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2018;125(6):628–36. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2018.03.010>
 41. Jaiswal, G. et al. Field cancerization: concept and clinical implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Exp Ther Oncol.* 2013;10(3):209–14.
 42. Pardal R, Clarke MF MS. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003;3 (12):895–902.
 43. 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* [Internet]. 2007 Jan 16 [cited 2019 Apr 14];104(3):973–8. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0610117104>
44. Pozzi V, Sartini D, Rocchetti R, Santarelli A, Rubini C, Morganti S, et al. Identification and characterization of cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cell Physiol Biochem*. 2015;
 45. Kim HS, Pearson AT, Nör JE. Isolation and Characterization of Cancer Stem Cells from Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Tumors. *Methods Mol Biol*. 2016;1395 Chapt:241–9.
 46. Wicha M, Liu S DG. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Res*. 2006;66:1883–90.
 47. Birkeland AC, Owen JH, Prince ME. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells: Current Advances and Future Challenges. *J Dent Res* [Internet]. 2015;0022034515601960. Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/early/2015/08/25/0022034515601960.full>
 48. Ishizawa K, Rasheed Z KR. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell*. 2010;7:279–82.
 49. Peitzsch C, Nathansen J, Schniewind SI, Schwarz F, Dubrovskaya A. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: Identification, characterization and clinical implications. *Cancers (Basel)*. 2019;11(5).
 50. Atlasi Y, Looijenga L, Fodde R. Cancer Stem Cells, Pluripotency, and

- Cellular Heterogeneity. A WNTer Perspective. *Curr Top Dev Biol.* 2014;107.
51. Chen X, Cao Y, Sedhom W, Lu L, Liu Y, Wang H, et al. Distinct roles of PIK3CA in the enrichment and maintenance of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Oncol.* 2019;Oct.10:0–1.
 52. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105–11.
 53. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Joseph I, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. 2011;70(23):9969–78.
 54. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, Oh EY, Gaber MW, Finklestein D, Allen M, Frank A, Bayazitov IT, Zakharenko SS et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007;11:69–82.
 55. Ludwig N, Szczepanski MJ, Gluszko A, Szafarowski T, Azambuja JH, Dolg L, et al. CD44 (+) tumor cells promote early angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2019;467(October):85–95.
 56. Moulder JE RS. Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 1987;5:313–41.
 57. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-Ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol.* 2014;41:217–34.

58. Papagerakis S. Oral epithelial stem cells – implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res.* 2010;325(2):111–29.
59. Li Q, Lu L, Tao H, Xue C, Teitz-Tennenbaum S, Owen JH, Moyer JS, Prince ME, Chang AE WM. Generation of a novel dendritic-cell vaccine using melanoma and squamous cancer stem cells. *J Vis Exp.* 2014;83:e50561.
60. William C. Hahn RAW. R ULES FOR M AKING H UMAN T UMOR C ELLS y. 2002;347(November):1593–603.
61. Warnakulasuriya S, Khan Z. Squamous Cell Carcinoma Molecular Therapeutic Targets. Springer S. Saman Warnakulasuriya Zakir Khan, editor. Van Godewijkstraat 30, 3311 GX Dordrecht, The Netherlands; 2017. 281 p.
62. Kim HS, Chen YC, Nör F, Warner KA, Andrews A, Wagner VP, et al. Endothelial-derived interleukin-6 induces cancer stem cell motility by generating a chemotactic gradient towards blood vessels. *Oncotarget.* 2017;8(59):100339–52.
63. Warner KA, Miyazawa M, Cordeiro MM, Love WJ, Pinsky MS, Neiva KG, Spalding AC NJ. Endothelial cells enhance tumor cell invasion through a crosstalk mediated by CXC chemokine signaling. *Neoplasia.* 2008;10:131–9.
64. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM. Cancer Stem Cells and Stemness Markers in Oral Squamous Cell Carcinomas. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2014;15(20).

65. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2016 Dec [cited 2019 Apr 1];81:166–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272516302710>
66. Prince ME, Sivanandan R KA 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;104:973–8.
67. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC CS. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;385:307–13.
68. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carev TE, Bradford CR, Golf GT WM and PM. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010;32:1195–201.
69. Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, et al. ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. *Oncol Lett*. 2017;13:321–8.
70. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncology*. 2014.
71. Bianchini C, Ciorba A, Pelucchi S, Piva R, Pastore A. Targeted therapy in

- head and neck cancer. *Tumori*. 2011;97:137–41.
72. Bianchini C, Ciorba A. Head and neck cancer stem cells. In: *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology*. 2015. p. 298–305.
73. Poage GM, Christensen BC, Houseman EA et al. Genetic and epigenetic somatic alterations in head and neck squamous cell carcinomas are globally coordinated but not locally targeted. *PLoS One*. 2010;5:9651.
74. Baniebrahimi G, Mir F, Khanmohammadi R. Cancer stem cells and oral cancer: Insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2020;20(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01192-0>

ARTICULO 3

IMMUNOEXPRESSION OF CD44 AND ALDH1A IN ORAL CARCINOMAS AND EPITHELIAL DYSPLASIA OF THE ORAL MUCOSA

* Standardized for submission to the journal —Oral Oncology

IMMUNOEXPRESSION OF CD44 AND ALDH1A IN ORAL CARCINOMAS AND EPITHELIAL DYSPLASIA OF THE ORAL MUCOSA

Aurita Verónica Beovide Cortegoso ¹

Pantelis Varvaki Rados ²

1 Universidad de la República Facultad de Odontología Laboratorio de Anatomía Patológica. Montevideo, Uruguay. Dufort y Alvarez 3419.

Corresponding author Aurita Verónica Beovide Cortegoso, beovide@gmail.com

2 Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em UFRGS Porto Alegre-RS/Brasil.

"Conflict of interest statement", "None declared".

Abstract

Objectives- The aim of this study was to identify CD44 and ALDH1 positive cell populations in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia and their relationship with clinic pathological parameters. **Materials and Methods,** The study design is retrospective cross-sectional and longitudinal for the analysis of survival. All cases of oral carcinomas, oral epithelial dysplasia, lesions without epithelial dysplasia, and a control group that met the inclusion / exclusion criteria proposed in the study were included in the study. The data were collected from the files of the Pathological Anatomy Laboratory of the Faculty of Dentistry of the University of the Republic, Montevideo, Uruguay, between January 2010 and December 2019. The immunoexpression of the putative CSC markers ALDH1A and CD44 was analysed by immunohistochemistry. All analyses were performed using the Statistical Package the free-use R. **Results-** The sample consisted of 64 cases , 34 oral carcinomas, 15 oral epithelial dysplasia and 10 no epithelial dysplasias and 5 as a control group. CD44 immunoexpression was positive in 100% of the cases, which did not allow us to discriminate a prognostic expression pattern. ALDH1A immunoexpression was positive in 67,6% of oral carcinomas and in 53,3% of epithelial dysplasias. A significant association was observed between patients who died during the follow-up period and positivity to ALDH1A ($p < 0,01$), associating positivity with a worse prognosis in these patients. **Conclusions-** These results demonstrate that ALDH1A is predominantly expressed in the tumor tissue of oral carcinomas. Regarding patient survival, our results revealed a significant association associated with ALDH1A positivity.

Keywords: aldehyde dehydrogenase; CD44; oral squamous cell carcinomas;
cancer stem cell.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth entity of the upper aerodigestive tract most common type of malignancy (1,2). The oral cavity oral squamous cell carcinoma (OSCC), the most common histological type of oral cavity cancer, it is a multifactorial disease where genetic alterations, environmental factors, are present in its development (3,4). Genomic studies have revealed a complex landscape in HNSCC, encompassing frequent chromosomal changes, DNA copy number alterations, somatic mutations and promoter methylation (5–8).

Despite advances in the diagnosis and treatment, patients at advanced stage frequently develop lymph node metastases and local–regional recurrence determining the patient’s poor prognosis and survival, tobacco use, alcohol consumption, and human papillomavirus (HPV) infection are well-established risk factors (9–11). The ability of tumors to invade into surrounding tissues is a “hallmark of cancer” and is arguably the property that most greatly affects morbidity and mortality (9,12). Despite advances in research, the 5-year survival of OCSCC has remained at 50%, unchanged for the past 40 years (13).

Men are usually more affected than women even if in the last years the incidence ratio is varying because of the increase of smoking habit in women (14). Concerning age, patients are usually older than 40 years old in 98 % of cases and the median age at diagnosis is 60 in western world, the average age varies according to geographical and habit differences (15).

The precise evaluation of the state of the lymph nodes is of great

importance for the prognosis and the therapeutic decision (16). In the early local disease T1-T2, the risk of occult metastasis in the neck is lower, around 20% - 40% (17–19). Some authors recommend the evaluation of the depth of invasion (DI) of the primary tumor. The impact of DI on the HNSCC prognosis has been addressed in the most recent edition of the TNM classification system, by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) where it establishes that a tumor with a DI of more than 10 mm is classified again as T3, where 4-5 mm DI is used as threshold for elective neck surgery (20–22).

OSCC is a heterogeneous tumor with aggressive biological behavior that explains the high mortality rates (11,13,23). The tumor microenvironment is composed of a variety of cells, including tumor cells, cancer stem cells (CSC), inflammatory cells and fibroblasts associated with cancer and blood vessels. The interest of research in recent years is related to studies on the knowledge of immunology, which have led to a new understanding of cellular and molecular interactions between the immune system and tumor cells (24). It is possible that CSC participate in the processes that lead to resistance to therapy and the production of distant metastases (25–27). The CSC are defined as cells within a tumor with the ability to recreate the original tumor population, drive tumor proliferation, and self-renew (28), these cells play a central role in initiation, progression, invasion, metastasis, recurrence of tumors and resistance to therapies (29–31). Immunologic approaches directed against whole tumors are largely biased toward more differentiated tumor cells which form the bulk of the tumor and which express “differentiation” antigens. This suggests that effective immune targeting of CSC may require the specific targeting of this cell population.

In addition, within a tumor, CSCs may themselves exhibit heterogeneity resulting from both genetic and epigenetic regulation associated with tumor progression and metastasis (24).

The CSC are responsible for the origination and biological behavior of tumors, may be identified within the tumor by specific protein biomarkers (13,32–34). A systematic review concludes that the most commonly used biomarkers in the identification of CSC are CD44, ALDH and BMI1 (33).

ALDH is responsible for the oxidation of aldehydes to carboxylic acids to prevent cells from oxidative insult and facilitate their survival. Increased ALDH activity has been found in CSCs of various tumor types, such as bladder, breast, colon, gastric and head and neck (24,35–37). In their study, Kim, Choung, Lee, Khwarg, and Kim associated the expression of ALDH1 with metastasis; specifically, patients who expressed ALDH1 developed metastasis more frequently than those who were negative for this marker (38). Michifuri et al. showed for the first time that ALDH1 was associated with lymph node metastasis in OSCC cases (39). CD44 has been the most common marker used to identify HNSCC CSC, is a cell surface adhesion receptor, a non-kinase transmembrane glycoprotein that is highly expressed in many cancers and regulates metastasis. Its interaction with appropriate extracellular matrix ligands promotes the migration and invasion processes involved in metastases (40,41). CD44 is involved in multiple signaling functions, e.g. cell proliferation, apoptosis, survival, migration and differentiation (40). Moreover, a recent study reveals that the CD44 protein plays an important role in a number of CSC functions including self-renewal,

niche preparation, epithelial-mesenchymal transition and resistance to apoptosis (42,43).

The aim of this study was to identify CD44 and ALDH1 positive cell populations in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia and their relationship with clinic pathological parameters.

Materials and methods

Patients and tissue samples

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Dentistry of the University of the Republic Montevideo Uruguay expedient nº390/16. The study design is retrospective cross-sectional and longitudinal for the analysis of survival. All cases of OSCC that were diagnosed in the Pathological Anatomy Laboratory of the Faculty of Dentistry of the University of the Republic, Montevideo, Uruguay, between January 2011 and December 2019, were included in the study. All patients presented with primary OSCC and had not undergone chemotherapy or radiotherapy before surgery and 2–8 year follow-up data were also recorded. Outcome was classified as death due to tumor and disease-specific survival. All clinical records were reviewed and data, including gender, age, tumor location, and diagnosis, were collected according to project criteria and inclusion / exclusion.

The inclusion criteria were as follows: cases with microscopic diagnosis of OSCC in which non-tumor epithelial tissue was present adjacent to invasive carcinoma, cases with diagnosis of epithelial dysplasia and cases with diagnosis of benign mucosal lesions without signs of epithelial dysplasia or malignancy,

which would be control cases. The exclusion criteria were as follows: patients presenting with recurrent tumor, patients previously treated with chemotherapy and/or radiation and paraffin blocks with insufficient material and / or in poor condition that impede immunohistochemical processing. All studied tissue samples were from previously untreated primary tumors obtained before treatment.

The microscopic analysis and grading of OSCC were performed in accordance with the classification proposed by the World Health Organization (WHO) (2017) (44), based on the degree of cell differentiation. The tumors were classified as follows: well-differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated. The microscopic diagnosis of oral epithelial dysplasia (OED) according to WHO criteria (45–47), control group with microscopic diagnosis of benign lesion of the oral mucosa of the type of epithelial hyperplasia, without signs of dysplasia or malignancy. All patients signed an informed consent, except for those patients who in the retrospective review could not be contacted due to changes in address and telephone number.

The sample was made up of 64 cases that included 34 OSCC (Fig. 1,B,C,D), the cases of coce corresponded to exceresis biopsies and the cases of incisional biopsies had to have non-tumor epithelium adjacent to the tumor tissue for inclusion. 25 mucosal lesions of which 15 had oral epithelial dysplasia and 10 without epithelial dysplasia and 5 cases of hyperplasia as a control group. The histological grade of non-tumour epithelium adjacent to the invasive carcinoma, was classified as normal mucosa (hyperplasia and hyperkeratosis)

without signs of dysplasia and malignancy, and oral epithelial dysplasia, which includes mild, moderate or severe (Fig. 1A). Patient survival was defined as the time between initial surgery and death from cancer.

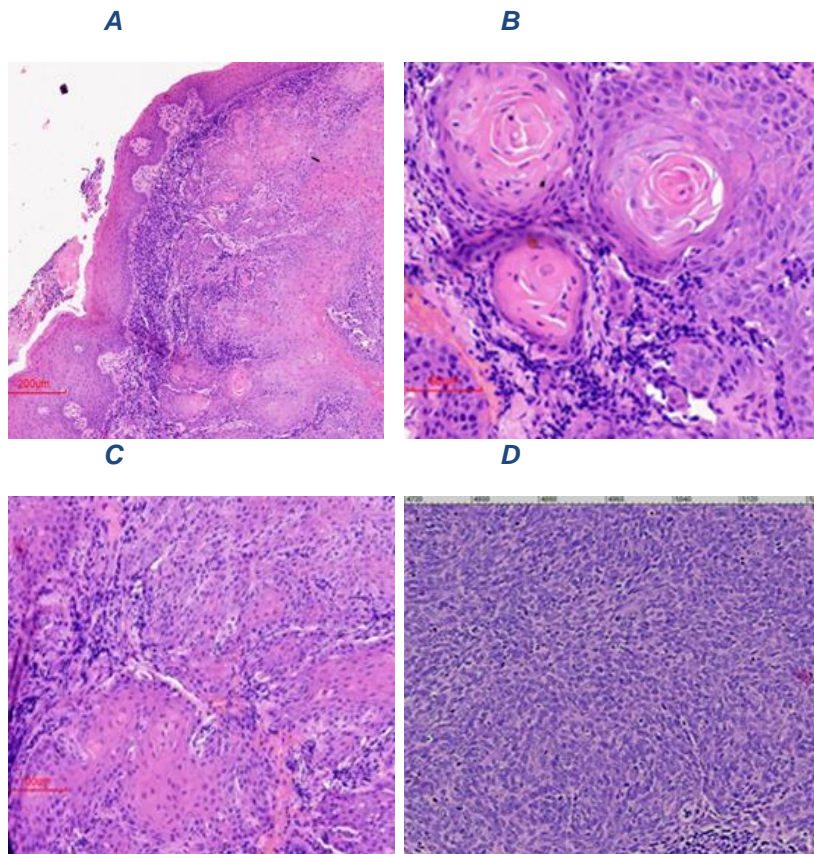


Figure 1- A-Sector of interface between tumor tissue and adjacent non-tumor epithelium HE magnification 34x, B- Well differentiated squamous cell carcinoma HE magnification 18x , C Moderately differentiated squamous cell carcinoma HE magnification 11x. D- Poorly differentiated squamous cell carcinoma HE magnification 15x. The images are obtained from the digital slide scanner Motic VM 3.0 Motic Digital Slide Assistant.

Immunohistochemistry

The immunoexpression of the putative CSC markers ALDH1A and CD44 was analysed by immunohistochemistry in primary OSCC and lesions with oral epithelial dysplasia and without oral epithelial dysplasia in the control group. The immunohistochemical analysis was performed on the entire histological slide

which allowed evaluating all the tumor tissue. This was done by scanning the sheets with the Motic Digital Slide Assistant VM 3.0 (Fig. 2).

The intraexaminer agreement was calculated by Cohen's Kappa with a value of 0,68, The analysis was carried out on 20 samples at two moments: T1 (initial evaluation) and T2 (30 days later).The interval of 30 days among T1 and T2 was considered to be adequate for decreasing bias from the previous analysis of the specimens in T1.



Figure 2 - Motic Digital Slide scanner image allows evaluating immunomarking in a single field by varying the magnification. Positive CD44 immunoexpression in OSCC tissue and adjacent non-tumor tissue, marking at the membrane level, magnification 14x.

Immunohistochemistry CD44

Samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin after resection. Sections (5 µm-thick) were cut and transferred on charged slides, deparaffinized in xylene and dehydrated with ethanol in increasing concentrations. Endogenous peroxidase activity was blocked by 3% hydrogen

peroxide, and antigen retrieval with Dako Target Retrieval Solution pH9 was carried out in a steamer. Immunostaining was performed using streptavidin/HPR enzyme complex (Streptavidin/HPR code P0397, dilution 1/1000; Dako, Denmark). The sections were incubated with monoclonal mouse anti-human CD44 (clone DF1485, dilution 1:50; Dako, Denmark) antibody, 1 hour at room temperature, and then subsequently placed in secondary anti-mouse antibody (Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated code E0433, dilution 1:600; Dako, Denmark) followed by streptavidin/HPR reagent, for 30 minutes in both cases. The sections were finally incubated in DAB substrate chromogen system (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System) for 10 min.

Immunohistochemistry ALDH1A:

Samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin after resection. The initial steps of the immunohistochemical procedure were the same as those described for CD44. Immunostaining was performed using streptavidin/HPR enzyme complex (Streptavidin/HPR code P0397, dilution 1/1000; Dako, Denmark). The sections were incubated with monoclonal rabbit anti-human ALDH1A1 (clone EP1933Y, dilution 1:50; Abcam) antibody, 1 hour at room temperature, and then subsequently placed in secondary anti-rabbit antibody (Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Biotinylated code E0432, dilution 1:800; Dako, Denmark) followed by streptavidin/HPR reagent, for 30 minutes in both cases. The sections were finally incubated in DAB substrate chromogen system (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; Dako, Denmark) for 10 min.

Immunohistochemical Analysis

The positive external control for immunostaining standardization was either amygdala (ALDH1A) or lymphocytes from lymph nodes (CD44). Furthermore, negative control was obtained by incubation with IgG serum in substitution of the primary antibodies. CD44 and ALDH1A results were classified into two groups, namely positive (more than 5% of cells stained; Fig.3 A, B) and negative (less than 5% of cells stained; Fig. 3 C) (48,49). CD44 brown staining was considered positive and detected in the membrane. ALDH1A staining was detected in the cytoplasm. Histological and immunohistochemical evaluation analyzes were performed by the same calibrated examiner (A.V.B.), who did not know the clinical stage, treatment or course of the disease.

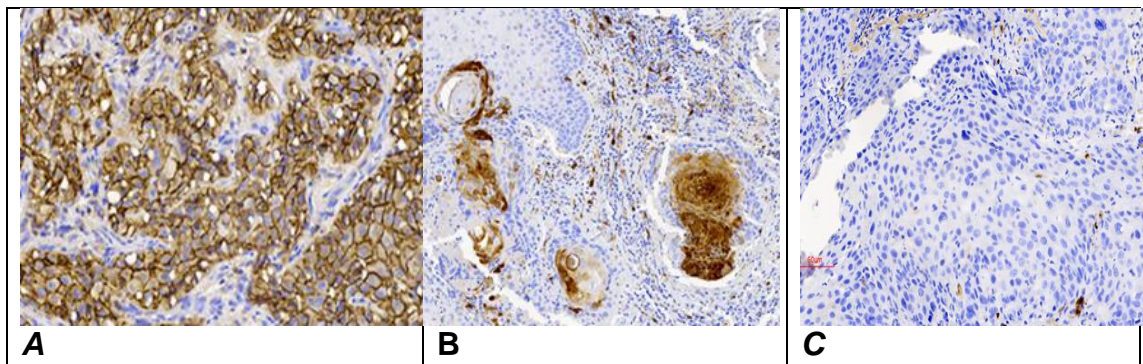


Figure 3- *CD44 and ALDH1 immunoexpression of positive and negative biomarkers. A CD44 OSCC positive, B ALDH1A OSCC positive, C ALDH1A OSCC negative.*

Data analysis

All analyses were performed using the Statistical Package the free-use R using the survival library. The descriptive analysis used frequency measures for the qualitative variables and summary measures for quantitative ones. The

association between variables was carried out using contingency and summary measures comparison. In the contingency tables, the association between the variables was investigated by calculating the Yule Y statistic (when the dimensions of the table allowed it) and the independence hypothesis was evaluated using the Fisher statistic. The comparison of means was carried out using the Kruskal-Wallis test. A significance level of 5% was considered in all tests. The survival analysis corresponding to patients with OSCC was carried out by constructing survival curves using the Kaplan-Meier estimator. Carrying out the comparison of these curves using the logarithmic range test.

Results

A total of 64 patients were included in the study. The baseline characteristics of the patients are shown in Table 1. Briefly, the cohort consisted of 34 patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC), 15 patients with lesions oral epithelial dysplasia (OED) and 10 lesions without oral epithelial dysplasia (WED) and a control group (CG) of 5 patients with benign lesions, benign lesions without signs of malignancy and / or epithelial dysplasia. The cohort included a majority of female, the female:male ratio was 1.78: 1, with 64% female, in their 6th decade of life, lesions are located more frequently on the tongue. The mean age of the total patients (n 64) was 60,9 SD \pm 16,1 (range: 15-99 years). Most of the lesions were located on the tongue (25%) followed by the palate (15.6%) and the floor of the mouth (11%), the same frequency distribution was followed by the cases of OSCC. Microscopic analysis revealed that 38,2% of the tumors was well differentiated, 47,1% moderate, and 14,4% poorly

differentiated. The average size of the tumors was 4 cm and a range of 1-8 cm. Most of the adjacent epithelium samples were classified as oral epithelial dysplasia (69,6%), followed by absence of epithelial dysplasia (30,4%). During the follow-up period of 2 to 8 years, 41,1% of the patients were disease-free at the end of the study (June 2019), while 52.9% died (Table 1).

Immunohistochemical staining for CD44 and ALDH1A biomarkers was performed on paraffin-embedded tissue samples. Staining for CD44 was always located at the cell membrane level and in the cytoplasm for ALDH1A (49).

Regarding CD44 immunostaining, tumor cells exhibiting membranous marking were widely observed in all cases in also cytoplasmic sectors. CD44 immunoexpression in the OSCC was positive in all cases, both in tumor tissue and in adjacent non-tumor tissue. CD44 immunoexpression in dysplasia, non-dysplasia and control groups was the same as in OSCC cases with 100% of positive cases. CD44 immunoexpression was located in the basal and suprabasal layers, except in the keratin layers, the external positive control was performed in lymphocytes from lymph node.

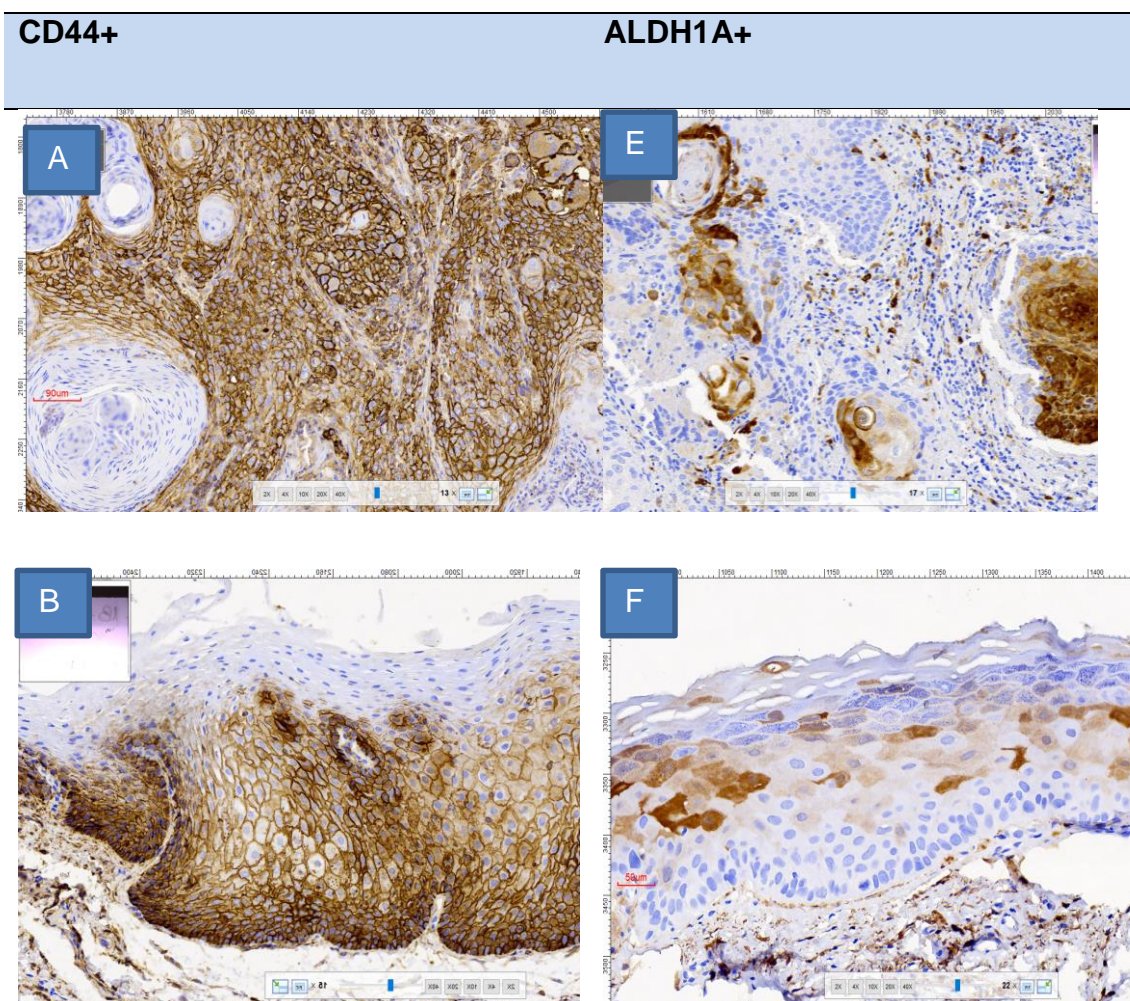
TABLE 1 Baseline characteristics for the study cohort

| | OSCC | ED | WED | CG | p |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------|-----------------|
| All patients, n (%) | 34(53,1) | 15(23,5) | 10(15,6) | 5(7,8) | |
| Age (y) | | | | | |
| Mean (SD) | 68,4 (12,9) | 56,1 (12,3) | 49,9 (16,9) | 46 (19,8) | <0,01 |
| Range | 47-99 | 37-76 | 15-70 | 16-66 | |
| Gender | | | | | |
| Female | 20 (58,9) | 10 (66,7) | 6 (60) | 5 (100) | 0,391 |
| Male | 14(41,1) | 5 (33,3) | 4 (40) | 0 (0) | |
| Lesion site | | | | | |
| Tongue | 12 (35,3) | 2 (13,3) | 2 (20) | 0(0) | |
| Palate | 5 (14,7) | 2 (13,3) | 2 (20) | 1 (20) | |
| Lip | 0 (0) | 2 (13,3) | 2 (20) | 1 (20) | |
| Mouth Floor | 4 (6,25) | 3 (20) | | | |
| Gingiva | 2 (3,1) | 0 (0) | | | |
| Cheek | 1 (1,5) | 1 (6,7) | 1 (10) | 3 (60) | |
| Retromolar | 1(1,5) | | | | |
| Superior Alveolar Ridge | 3 (4,7) | 1 (6,7) | 1 (10) | | |
| Lower Alveolar Ridge | 6 (9,3) | 4 (26,6) | 2 (20) | | |

Abbreviations: OSCC: oral squamous cell carcinoma; OED: oral epithelial dysplasia; WED: without epithelial dysplasia; CG: control group. Fisher's exact test, $P < 0.05$. Bold values are statistically significance of P value.

Positivity for ALDH1 was observed in focal areas, revealed scattered patches of positive cells, it was located in the suprabasal layers and there was no evidence of positivity in the basal layer. The marking was cytoplasmic, the external positive control was performed in amygdala and internal control were endothelial cells and striated muscle tissue. The positive immunoexpression for ALDH1A in the OSCC was 67,6% (n 23). In cases of oral epithelial dysplasia the positivity ALDH1A was 53.3% (n 8), and the cases without dysplasia was 20% (n

2), while in control cases immunopositivity was 0% (Fig.4). The positive immunopositivity for ALDH1A in the OSCC was 6/13 (46%) in the well differentiated, 13/16 (81.3%) in the moderately differentiated and 4/5 (80%) in the poorly differentiated. It was observed that 24/34 (70%) of the OSCC were associated with an intense inflammatory response and these cases corresponded to 17/24 (71%) of



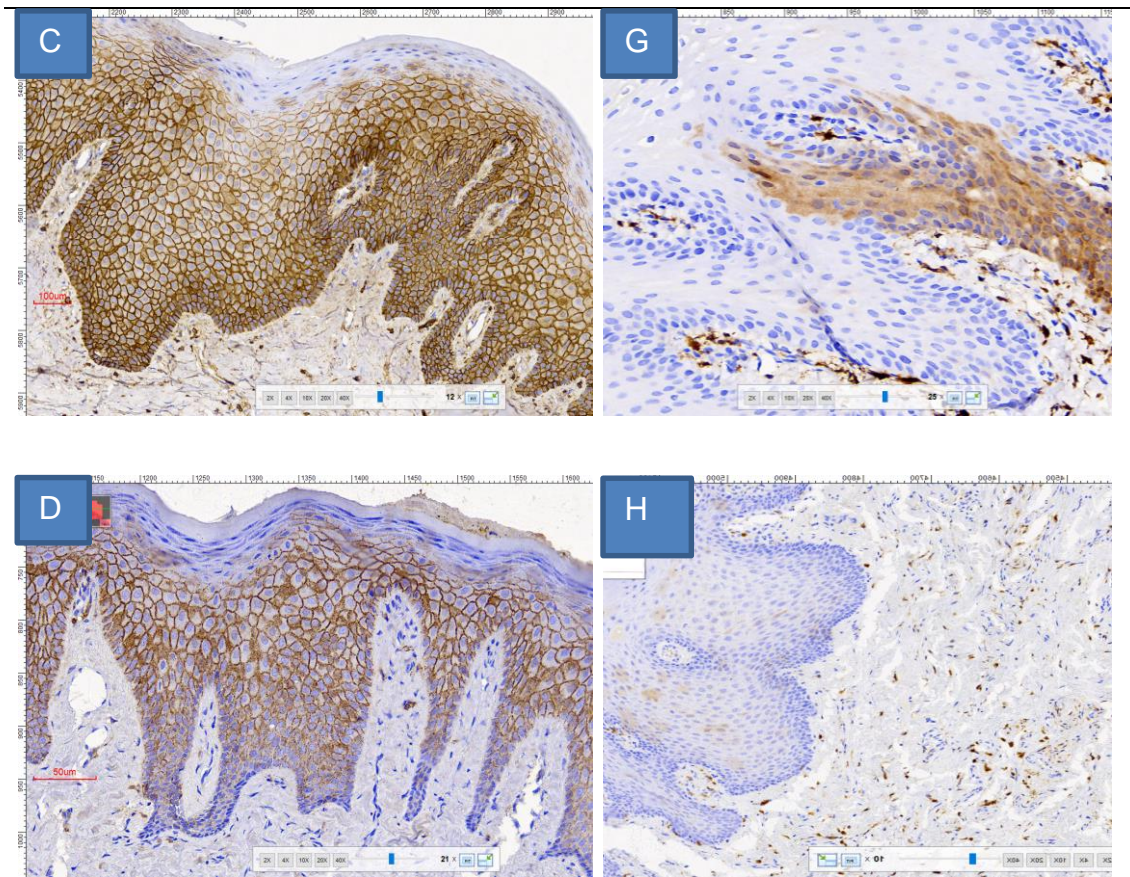


Figure 4- CD44 positive immunoperoxidase staining A- OSCC tissue magnification 13x, B- lesions oral epithelial dysplasia magnification 15x, C- lesions without oral epithelial dysplasia magnification 14x, D- control group magnification 21x. **ALDH1A positive immunoperoxidase staining**, E- OSCC tissue magnification 17x, F- lesions oral epithelial dysplasia magnification 22x, G- lesions without oral epithelial dysplasia magnification 25x, H- control group negative immunoperoxidase staining magnification 10x.

ALDH1A positive immunoperoxidase staining. When we analyzed the non-tumor tissue adjacent to the invasive carcinoma 15/33 (45,5%) were positive for ALDH1A. Most of the adjacent epithelium samples were classified as epithelial hyperplasia 11/33 (33,3%), followed by oral epithelial dysplasia 22/33 (66,7%) (Table 2).

If we analyze all the cases (64) grouping them into OSCC (n = 34) and all the non-OSCC lesions (n = 30), the positive expression of ALDH1A was 33/64

(51,5%). Among the ALDH1A + group 23/33 (70%) corresponded to OSCC and 10/33 (30%) to non-OSCC ($p= 0,011$).

When analyzing the positivity of ALDH1A considering the groups OSCC and non-OSCC (OED, WED and GC), it seems to show an association between positive immunoexpression of ALDH1A between cases OSCC and negativity to ALDH1A in non-OSCC. When quantifying this association using the Yule Y statistic, a value of 0.74 is observed, which corresponds to a moderate / strong association. The result of the Fisher independence test in this table yielded a p-value of 0.011, thus confirming the association described using the Yule statistic (Fig. 6, Table 3).

TABLE 2 Baseline Characteristics for the Positive ALDH1A Study

Cohort

| | ALDH1A | | | |
|-----------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
| | n (%) | Positive | Negative | p-value |
| OSCC | 34 (100) | 23 (67,6) | 11 (32,4) | |
| OED | 15 (100) | 8 (53,3) | 7 (46,7) | |
| WED | 10 (100) | 2 (20) | 8 (80) | |
| CG | 5 (100) | 0 (0) | 5 (100) | |
| Total | 64 (100) | 33 (51,5) | 31 (48,5) | 0,011 |
| <i>Histological type OSCC</i> | | | | p<0,109 |
| Well-differentiated | 13 (38,2) | 6 (46,1) | 7 (53,9) | |
| Moderately differentiated | 16 (47,1) | 13 (81,2) | 3 (18,8) | |
| Poorly differentiated | 5 (14,7) | 4 (80) | 1 (20) | |
| <i>Adjacent non-tumor tissue</i> | | | | p 0,99 |
| OED | 22 (66,7) | 8 (36,3) | 14 (63,7) | |
| WED | 11(33,3) | 7 (63,6) | 4 (36,7) | |
| <i>Inflammatory response</i> | | | | p 0,170 |
| Mild | 2 | 0 (0) | 2 (100) | |
| Moderate | 8 | 6 (75) | 2 (25) | |
| Intense | 24 | 17 (70,8) | 7 (29,2) | |

Abbreviations: OSCC: oral squamous cell carcinoma; OED: oral epithelial dysplasia; WED: without epithelial dysplasia; CG: control group. Fisher's exact test, P < 0.05. Bold values are statistically significance of p value.

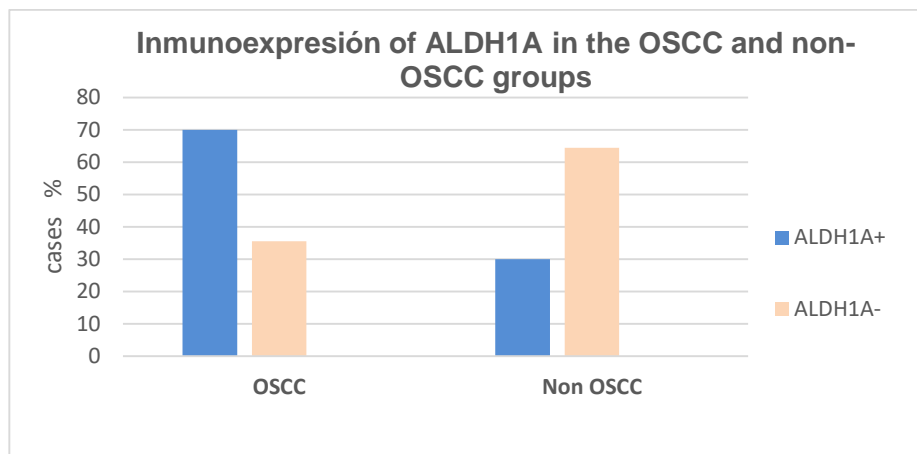


Figure 6- *Immunoexpression of ALDH1A in the OSCC and non-OSCC*
p- 0,011.

TABLE 3 *Inmunoexpresión of ALDH1A in the OSCC and non-OSCC*
groups

| ALDH1A | Positive | Negative | <i>p-valor</i> |
|-----------------|----------------|------------------|----------------|
| OSCC | 23 (70) | 11 (35,5) | 0,011 |
| Non-OSCC | 10 (30) | 20 (64,5) | |

Abbreviations: OSCC: oral squamous cell carcinoma; Non-OSCC: Non oral squamous cell carcinoma Fisher's exact test, P < 0.05. Bold values are statistically significance of p value.

A slight association was found (the Yule Y coefficient is 0.11) and the Fisher test with a p-value <0.01, so there would be evidence to affirm that there is an association between ALDH1A positivity and patient survival with OSCC (Table 4).

TABLE 4- Positivity ALDH1A and survival of patients with OSCC

| Follow-up | ALDH1A positive n(%) | ALDH1A negative n(%) |
|--------------|----------------------|----------------------|
| Disease free | 9 (39) | 5 (55,5) |
| Death | 14 (61) | 4 (44,5) |
| | 23 (100) | 9 (100) |

Fisher's exact test, $P < 0.05$. Bold values are statistically significance of P value $< 0,01$.

Survival analysis

When carrying out the survival analysis on the patients with OSCC, there were 18 patients whose survival time was observed and 14 who reached the end of the follow-up period (who were assigned a censorship indicator). Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier procedure. To evaluate the hypothesis of equality of curves between groups, the logarithmic range test was used ("logrank test"). Figure 6 presents the overall survival of the group of 32 participants. The median survival time was 1.81 years.

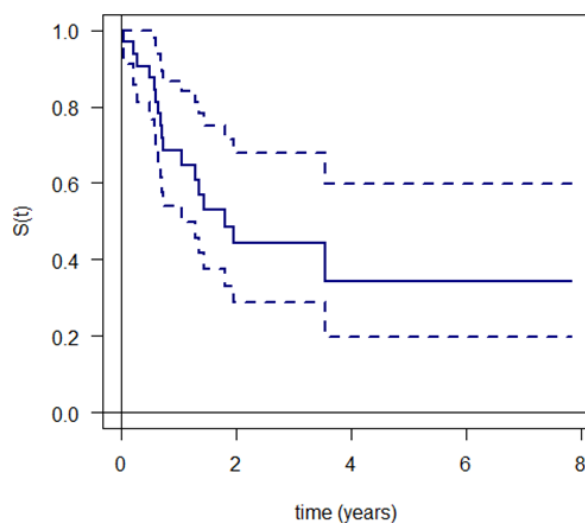


Figure 6 - Overall survival of participants with OSCC

Next, the effect of parameters such as sex, age, ALDH1A positivity and surgical margin was evaluated in patients with OSCC. It was not possible to find enough statistical evidence to think that the curves were different in the groups generated from these parameters. In any case, the estimated curves in the four situations are presented Fig. 7. The effect of some parameters such as sex, age, ALDH1A positivity and surgical margin were then evaluated. Table 5 presents the results concerning this point.

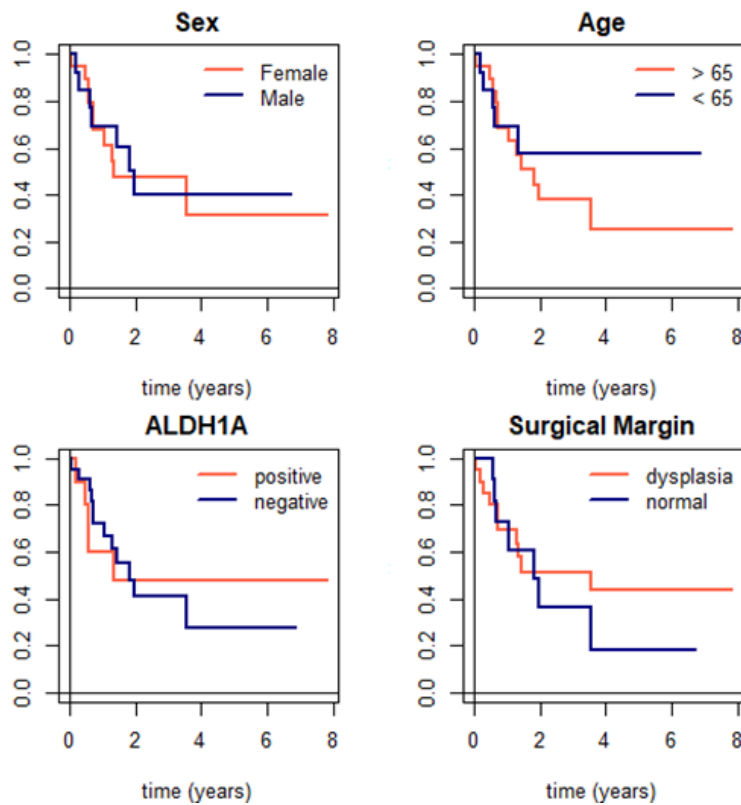


Figure 7-Estimated survival curves for the parameters sex, age, ALDH1A + and surgical margin.

TABLE 5 Effect of the parameters on the survival of patients with OSCC.

| | χ^2 | p-valor |
|-------------------|----------|---------|
| sexo | 0,094 | 0,758 |
| edad | 0,627 | 0,428 |
| ALDH | 0,029 | 0,863 |
| margen quirúrgico | 0,335 | 0,563 |

Discussion

CD44 immunoexpression was positive in all cases, in the tumor tissue and adjacent non-tumor specimens it was 100% positive. Since CD44 was expressed in all cases was not possible to perform the Fisher exact test. CD44 expression did not serve to discriminate behaviors in the different lesions studied, so it was not significant in this study. Destro Rodriguez et al. showed similar expression of CD44 in tumor cells of mucoepidermoid carcinomas and cells of normal glandular tissue, this study shows a deregulated expression of stem cell markers CD44. The authors explain that this finding implies that cells capable of proliferating and differentiating reside within the ducts and may represent a potent population of salivary stem / progenitor cells (50).

Chen, Jianqiang et al. in a meta-analysis they suggested that CD44 expression is related to worse T category, N category, tumor grade and prognosis in pharyngeal and laryngeal cancer, but a clear association between CD44 expression and oral cancer was not revealed (51).

Data from literature shows CD44 as the most used surface marker to identify CSCs from OSCC (52–55). However, most data indicate limited usefulness in identifying these cells. Along these lines, the study by Mărgăritescu et al. points to a strong counterargument to the use of CD44 as a surface marker for oral CSCs, as it is expressed both in normal oral epithelium (56,57) and in premalignant and malignant lesions (56–58). This finding is consistent with our results.

Several studies demonstrated that cells with high expression of ALDH1A1, the isoform of ALDH, possess features of CSC, including CSC in HNSCC (54). ALDH1A1 contributes in conversion of acetaldehyde, a known carcinogen, which increases the risk for HNSCC (59). In our study, a significant association was observed between patients who died during the follow-up period and positivity to ALDH1A1 ($p < 0,01$), associating positivity with a worse prognosis in these patients. Marangon et al. showed that, in OSCC samples with high-intensity tumor budding, ALDH1 expression was higher in the budding area than in the area outside the budding, highlights it as an association of ALDH1A and the ability of tumor cells in OSCC to display invasive and metastatic properties of CSC-like cells (32). Studies have found that patients with HNSCC and OSCC with higher ALDH1A1 expression had shorter overall survival than those with lower ALDH1A1 expression level (60). There are studies that show a significant association between ALDH1A positivity and the survival of patients with OSCC, indicating as a biomarker of poor prognosis in HNSCC (32,49,60). In our study, a higher positivity (80%) of ALDH1A was observed in poorly differentiated OSCCs, although it did not show statistical significance, as reported by other

studies, this may be mainly related to the low number of the sample (11,33,60).

Our study showed a similar positivity between tumor tissues (67,6%) and adjacent non-tumor epithelium (69,6%), although it was not statistically significant, this association was reported by Hildebrand et al. in their study that ALDH1 immunostaining results were similar in tumor tissues and in non-tumor epithelium, suggesting that this marker could be used as an indicator of disease recurrence (33).

Chengyong Zhou et al. showed that ALDH1 expression was significantly associated with worse survival according to the data currently obtained in their meta-analysis study. The authors performed a meta-analysis to clarify the association between ALDH1 expression and clinical outcomes (61). These results are consistent with our study in which a statistically significant association of positive expression at ALDH1A was observed with the patients who died during their follow-up period.

Conclusions

ALDH1A staining correlated well with ALDH1A positivity in OSCC cases and marker negativity in non-OSCC lesions. The significant association between ALDH1A expression and patient survival, demonstrated its importance as a prognostic biomarker in oral carcinoma. The failure to demonstrate a significant association between the expression of ALDHA 1A in tumor tissue and adjacent non-tumor epithelium, means that this model is little value to explain the pathogenesis of the head and neck cancer. CD44 did not allow significant associations to be established in this study. Further clinical studies with follow-up

are needed in large cohorts of patients with oral cancer. Future controlled studies will have to determine the clinical usefulness of ALDH1A as a prognostic biomarker in OSCC.

References

1. Bray F, Ferlay ; Jacques, Soerjomataram ; Isabelle, ;, Siegel RL, Torre ; Lindsey A., et al. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN.* 2018;68:394–424.
2. Rettig EM, D’Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2015;24(3):379–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.001>
3. Liao C-T, Wallace CG, Lee L-Y, Hsueh C, Lin C-Y, Fan K-H, et al. Clinical evidence of field cancerization in patients with oral cavity cancer in a betel quid chewing area. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 Aug [cited 2019 Feb 26];50(8):721–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837514001341>
4. Baniebrahimi G, Mir F, Khanmohammadi R. Cancer stem cells and oral cancer: insights into molecular mechanisms and therapeutic approaches. [cited 2020 May 19]; Available from: <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01192-0>
5. Elicin O, Ozsahin EM. Head and Neck Cancer. In: *Med Radiol*

Radiat Oncol. 2017.

6. Ali J, Sabiha B, Jan HU, Haider SA, Khan AA, Ali SS. Genetic etiology of oral cancer. Vol. 70, Oral Oncology. 2017. p. 23–8.

7. Bais MV. Impact of Epigenetic Regulation on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. J Dent Res [Internet]. 2019 Mar 7 [cited 2019 Mar 26];98(3):268–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30615537>

8. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. Vol. 52, Seminars in Cancer Biology. 2018.

9. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE. Mechanisms of invasion in head and neck cancer. Arch Pathol Lab Med. 2015;139:1334–48.

10. Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. Archives of Oral Biology. 2016.

11. Ortiz RC, Lopes NM, Amôr NG, Ponce JB, Schmerling CK, Lara VS, et al. CD44 and ALDH1 immunoexpression as prognostic indicators of invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2018;47(8):740–7.

12. Hanahan D, Weinberg RA, Weaver VM, Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T, et al. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell [Internet]. 2011;144(5):646–74. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/nm.2328>
<http://dx.doi.org/10.1038/nrc3080>
<http://iopscience.iop.org/0034-4885/77/7/076602/article/>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>

13. Gilormini M, Wozny A-S, Battiston-Montagne P, Ardail D, Alphonse G, Rodriguez-Lafrasse C. Isolation and Characterization of a Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Subpopulation Having Stem Cell Characteristics. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 12];(111):53958. Available from: www.jove.comurl:<http://www.jove.com/video/53958><http://www.jove.com/video/53958/>

14. Soerjomataram I, Parkin DM, Colombet M, Znaor A, Mathers C, Bray F, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2018;00:1–13.

15. Bianchini C, Ciorba A. Head and neck cancer stem cells. In: *Cancer Stem Cells: Emerging Concepts and Future Perspectives in Translational Oncology*. 2015. p. 298–305.

16. Shah JP GZ. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):394–401.

17. da Silva SD, Hier M, Mlynarek A, Kowalski LP A-JM. Recurrent oral cancer: current and emerging therapeutic approaches. *Front Pharmacol*. 2012;3:149.

18. Stoeckli SJ. Sentinel node biopsy for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*.

2007;117(9):1539–51.

19. D’Cruz AK, Vaish R, Kapre N et al. Elective versus therapeutic neck dissection in node-negative oral cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(6):521–529.

20. Balasubramanian D, Ebrahimi A, Gupta R et al. Tumour thickness as a predictor of nodal metastases in oral cancer: comparison between tongue and floor of mouth subsites. *Oral Oncol.* 2014;50(12):1165–8.

21. Madana J, Laliberte F, Morand GB et al. Computerized tomography based tumor-thickness measurement is useful to predict postoperative pathological tumor thickness in oral tongue squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2015;44:49.

22. Lydiatt WM, Patel SG, O’Sullivan B et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122–37.

23. MARTIN LEINUNG¹, BENJAMIN ERNST¹, CONSTANZE DÖRING², JENS WAGENBLAST¹, AYKUT TAHTALI¹, MARC DIENSTHUBER¹ TS and CG, ¹Department. Expression of ALDH1A1 and CD44 in primary head and neck squamous cell carcinoma and their value for carcinogenesis, tumor progression and cancer stem cell identification. *Oncol Lett.* 2015;10:2289–94.

24. Pan Q, Li Q, Liu S, Ning N, Zhang X, Xu Y, et al. Concise review: Targeting cancer stem cells using immunologic approaches. *Stem Cells.* 2015;33(7):2085–92.

25. Ohnishi Y, Yasui H, Nozaki M, Nakajima M. Molecularly-targeted

therapy for the oral cancer stem cells. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2018 May [cited 2019 Feb 26];54(2):88–103. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S188276161730042X>

26. Naik PP, Das DN, Panda PK, Mukhopadhyay S, Sinha N, Prahara PP, et al. Implications of cancer stem cells in developing therapeutic resistance in oral cancer. Vol. 62, *Oral Oncology*. 2016.

27. Birkeland AC, Owen JH, Prince ME. Targeting Head and Neck Cancer Stem Cells: Current Advances and Future Challenges. *J Dent Res* [Internet]. 2015;0022034515601960. Available from: <http://jdr.sagepub.com/content/early/2015/08/25/0022034515601960.full>

28. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105–11.

29. Paiva F, De Moraes P, Lourenço SV, Carolina R, Ianez F, Alves De Sousa E, et al. Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Oral Radiol*. 2016;

30. Pranali Shirish Satpute, Vinay Hazarey , Riyaz Ahmed LY. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:5579–87.

31. Li CC, Shen Z, Bavarian R, Yang F, Bhattacharya A. Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):29–46.

32. Marangon Junior H, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souto GR, Souza PEA,

de Aguiar MCF, et al. Immunolocalization of Cancer Stem Cells Marker ALDH1 and its Association with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2018 Nov 14 [cited 2019 Sep 9]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12105-018-0985-4>

33. Curtarelli RB, Gonçalves JM, dos Santos LGP, Savi MG, Nör JE, Mezzomo LAM, et al. Expression of Cancer Stem Cell Biomarkers in Human Head and Neck Carcinomas: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Reports*. 2018;14(6):769–84.

34. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant’Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(7):499–506.

35. Januchowski R, Wojtowicz K, Sterzyńska K, Sosińska P, Andrzejewska M, Zawierucha P, et al. Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol*. 2016;

36. Marcato P, Dean CA, Da P, Araslanova R, Gillis M, Joshi M, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011;

37. Qiu Y, Pu T, Guo P, Wei B, Zhang Z, Zhang H, et al. ALDH+/CD44+ cells in breast cancer are associated with worse prognosis and poor clinical outcome. *Exp Mol Pathol*. 2016;

38. Kim, N., Choung, H., Lee, M., Khwarg, S., & Kim J. Cancer stem cell markers in eyelid sebaceous gland carcinoma: High expression of ALDH1, CD133, and ABCG2 correlates with poor prognosis. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2015;56:1813–1819.
39. Michifuri, Y., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Miyazaki, A., Kobayashi, J., Sasaki, T., ... Sato N. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int.* 2012;62,:684–689.
40. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5.
41. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. Vol. 11, *Journal of Hematology and Oncology.* 2018.
42. Boxberg M, Haidari S, Dorfner C, Jesinghaus M, Drecoll E, Boskov M, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphologic parameters and clinicopathological factors. *Histopathology.* 2018;Oct;73(4):559–72.
43. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *STEMCELLS Transl Med* 2015. 2015;4:1–11.
44. Westra WH, Lewis JS. Update from the 4th Edition of the World

Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. Head Neck Pathol. 2017;11(1).

45. Reibel J, Gale N, Hille J, Hunt JL, Lingen M, Muller S et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC; . El-Naggar AK, Chan JKC, Gd JR, Tak T, Slootweg P, Ed. 2017;112–5.

46. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J DE. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol. 2008;37:127–33.

47. Edition E. 8th AJCC Cancer Staging Form Supplement 6-2018 update. AJCC Cancer Staging Manual, 8th Ed [Internet]. 2018;(Junio):192–4. Available from: <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Documents/AJCC Cancer Staging Form Supplement.pdf>

48. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Jacques EN, Cerski CTS, Filho SA. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. 2014;499–506.

49. Tamatani T, Takamaru N, Ohe G, Akita K, Nakagawa T, Miyamoto Y. Expression of CD44, CD44v9, ABCG2, CD24, Bmi-1 and ALDH1 in stage I and II oral squamous cell carcinoma and their association with clinicopathological factors. Oncol Lett [Internet]. 2018 May 11 [cited 2018 Jul 4];16(1):1133–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29963189>

50. Destro Rodrigues MFS, Sedassari BT, Esteves CM, de Andrade NP, Altemani A, de Sousa SCOM, et al. Embryonic stem cells markers Oct4 and Nanog correlate with perineural invasion in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(2):112–20.
51. Chen J, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, Gong L. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer.* 2014;14.
52. Prince ME, Sivanandan R KA 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;104:973–8.
53. 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;5(7):1–9.
54. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck.* 2010;
55. Mărgăritescu C, Pirici D, Simionescu C, Stepan A. The utility of CD44, CD117 and CD133 in identification of cancer stem cells (CSC) in oral squamous cell carcinomas (OSCC). *Rom J Morphol Embryol.* 2012;
56. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zöller J, Bosch FX, Zöller M. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol.* 1996;179(1):66–

73.

57. Simionescu C, Mărgăritescu C, Surpățeanu M, Mogoantă L, Zăvoi R, Ciurea R, Surlin P SA. The study of E-cadherine and CD44 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma,. Rom J Morphol Embryol,. 2008;49(2):189–193.

58. Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. PLoS One,. 2008;3(10):e3360.

59. Szafarowski T, Szczepanski MJ. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngologia Polska. 2014.

60. Qian X, Wagner S, Ma C, Coordes A, Gekeler J, Klussmann JP, et al. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2014;140:1151–1158.

61. Zhou C, Sun B. The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: A meta-analysis. Vol. 50, Oral Oncology. 2014. 140:1151–1158.

5 CONSIDERACIONES FINALES

Este trabajo presenta una revisión, análisis e investigación sobre el comportamiento biológico del carcinoma oral de células escamosas, su relación y significancia pronóstica con los parámetros clínico patológicos.

Se necesita de una mejor comprensión de los mecanismos que permiten que las células madre tumorales controlen o escapen del sistema inmune. Para la regresión del tumor se necesitan herramientas que ataquen a las células iniciadoras del tumor. Para erradicar el tumor, la tendencia terapéutica apunta a estas células. La presencia en los tejidos orales de estas células genéticamente alteradas, provocan el inicio y desarrollo del cáncer oral. Los biomarcadores CD44 y ALDH1 son los más utilizados en la mayoría de los estudios que investigan sobre la identificación de las células madre tumorales. ALDH1 se encuentra predominantemente relacionado con tumores agresivos, áreas tumorales y epitelio adyacente no tumoral. Esta proteína está correlacionada con las características clínicas, como el tamaño del tumor, la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y la sobrevida de los pacientes con cáncer oral por lo cual ALDH1 puede ser útil para mejorar el tratamiento de pacientes con cáncer de cabeza y cuello. Se necesita de más investigación clínica que se centren en abordar los problemas clínicos clave en la progresión y el tratamiento de esta enfermedad.

6 ANEXOS Y APÉNDICES

6.1. Aprobación del Comité de ética UdelaR



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
Sección Comisiones y Claustro

Montevideo, 23 de noviembre de 2016.-

Reunido el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología, resuelve:—

APROBAR: el Proyecto de Investigación titulado "Identificación de Células CD44+ Y aldh 1 + en displasia epitelial y carcinoma espinocelular de la mucosa bucal", presentado por la Dra. Verónica Beovide, al que le ha correspondido el número de expediente 390/16.-----



Prof. Dr. Jorge Gutiérrez



6.2. Consentimiento Informado

Título del proyecto de investigación.

"Identificación de células CD44+ y ALDH 1+ en Displasia Epitelial y Carcinoma Espinocelular de la mucosa bucal"

Consentimiento informado

Investigador responsable:

Prof. Dra. Verónica Beovide Tel. 099758360 / 24873048 int. 145 Cátedra de Anatomía Patológica.

Propósito de la investigación. Investigar en el tejido que se eliminó por biopsia, las células positivas a dos marcadores CD44 y ALDH1. Para ver si se relacionan al pronóstico de la lesión.

La investigación se realiza sobre el tejido eliminado con fines diagnósticos, luego de hecho el diagnóstico, el tejido se vuelve a estudiar con los dos marcadores para ver cuantas células son positivas y si se relacionan al pronóstico de la lesión diagnosticada. La investigación no requiere ningún procedimiento extra al realizado para hacer la biopsia de la lesión, por lo cual no ofrece riesgos para el paciente.

La investigación respeta los derechos del paciente y la confidencialidad de los datos, dando un número o código a la biopsia con el fin de proteger la identificación del paciente. La información acerca de usted que se recogerá durante la investigación será puesta fuera de alcance y nadie solo el investigador responsable tendrá acceso a verla. Cualquier información acerca de usted tendrá un número en vez de su nombre. Los datos obtenidos podrán ser usados en futuras investigaciones en la misma línea de estudio.

Esta propuesta ha sido revisada y aprobada por el comité de evaluación ética de la Facultad de Odontología de la UdelaR, expediente número 390/16. Es un comité cuya tarea es asegurarse de que se protege de daños a los participantes en la investigación. Si usted desea averiguar más sobre este comité, contacte al responsable de la investigación. La investigación será financiada por la facultad de odontología.

He leído la información proporcionada o me ha sido leída. He tenido la oportunidad de preguntar sobre ella y se me ha contestado satisfactoriamente las preguntas que he realizado. Consiento voluntariamente participar en esta investigación como participante y entiendo que tengo el derecho de retirarme de la investigación en cualquier momento sin que me afecte en ninguna manera mi cuidado médico.



Prof. Dra. Verónica Beovide

Nombre del Participante _____ C.I. _____

Firma del Participante _____ Teléfono _____