

Caracterización de marcadores de células madre tumorales en cáncer escamocelular de cavidad oral

Characterization of tumor stem cell markers in squamous cell carcinoma of the oral cavity

Marisol Campuzano-Castellanos¹ ; Manuel García-Flórez¹ 

*garcia@usco.edu.co

Forma de citar: Campuzano Castellanos M, García Flórez M. Caracterización de marcadores de células madre tumorales en cáncer escamocelular de cavidad oral. Salud UIS. 2023; 55: e23020. doi: <https://doi.org/10.18273/saluduis.55.e:23020> 

Resumen

Introducción: el cáncer escamocelular de cavidad oral es una patología con bajas tasas de sobrevivencia. Cuando no es tratado adecuadamente es un tumor de alta recurrencia y resistente al tratamiento. Nuevas hipótesis plantean que las células tumorales progenitoras por sus propiedades de auto renovación, iniciación tumoral, migración y metástasis pueden ser responsables de la manutención y renovación de este tumor. Sin embargo, aún no existe un consenso sobre la verdadera participación de ellas, debido a que su identificación y caracterización es aún un reto experimental. **Objetivo:** en este trabajo se busca detectar células con expresión de marcadores de células tumorales Progenitoras en muestras cáncer escamocelular de cavidad oral y relacionarlo con los estadios de diferenciación del tumor. **Metodología:** en esta investigación se tomaron 32 muestras de pacientes con carcinoma escamocelular de cavidad oral. Se logró detectar *in situ*, mediante la técnica de inmunofluorescencia, cuatro reconocidos marcadores de células tumorales progenitoras. **Resultados:** se identificaron los marcadores OCT4, SSEA4, NANOG y TRA-1-60 en los diferentes estadios de diferenciación tumoral, lo que sugiere la participación de las células progenitoras tumorales en la evolución de esta patología. **Conclusiones:** el establecimiento y correcta identificación de las células tumorales progenitoras abre nuevas vías terapéuticas para el abordaje de este tumor, en busca de mejorar el pronóstico, tasa de sobrevivencia y calidad de vida del paciente.

Palabras clave: Carcinoma escamocelular de cabeza y cuello; Células tumorales progenitoras; Biomarcadores tumorales; OCT4; SSEA-4; NANOG; TRA-1-60.

Abstract

Introduction: Squamous cell carcinoma of the oral cavity is a pathology with poor survival rates. When it is not adequately treated, it is a tumor with high recurrence and resistance to treatment. According to new hypotheses, progenitor tumor cells, due to their properties of self-renewal, tumor initiation, migration, and metastasis, could be responsible for the maintenance and renewal of this tumor. However, there is still no consensus on their true participation, subsequent to difficult in their identification and characterization. **Materials and methods:** In this research, 32 samples provided from patients diagnosis with squamous cell carcinoma of the oral cavity were used. To detect specific markers progenitor tumor cells were used immunofluorescence microscopy. **Results:** The cells

¹Laboratorio de Biología Celular, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Universidad Surcolombiana. Neiva, Huila.

markers OCT4, SSEA4, NANOG and TRA-1-60 were identified in the different stages of the tumor samples, all these findings suggest the role of tumor progenitor cells in the evolution of this pathology. **Conclusions:** The establishment and correct identification of the progenitor tumor cells provide new therapeutic options for the approach of this tumor seeking to improve the prognosis, survival rate and quality of life of the patient.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck; Embryonal Carcinoma Stem Cells; Biomarkers; OCT4; SSEA-4; NANOG; TRA-1-60.

Introducción

A pesar de las extensas investigaciones, la tasa de sobrevivencia en pacientes con cáncer escamocelular de cavidad oral (CECO) no se ha modificado en los últimos 40 años¹. Es así como, en un periodo calculado de 5 años, la tasa de sobrevivencia alcanza apenas un 40 % en pacientes con cáncer escamocelular en estadio avanzado y con recurrencia local². Varios factores han sido relacionados con la recurrencia y con el peor pronóstico de este cáncer, a nivel histopatológico los tumores pobremente diferenciados presentan mayor tendencia a resurgir³ y a nivel molecular se ha encontrado la sobreexpresión del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) en tumores avanzados y pobremente diferenciados⁴. Del mismo modo, las oncoproteínas E6 y E7 del Virus del Papiloma Humano han sido reconocidas como promotoras de este tumor⁵⁻⁷. Algunos datos señalan a las células tumorales progenitoras (del inglés: *Cancer Stem Cells*), una subpoblación de células pluripotentes, como responsables de la auto renovación, iniciación tumoral, migración y metástasis⁸, e inclusive se les da un papel activo en la recurrencia del tumor posterior al tratamiento⁹⁻¹¹.

Sin embargo, todavía no existe un consenso sobre la verdadera participación de estas células, y su identificación y caracterización es aún un reto experimental en el que no se ha podido establecer un protocolo estandarizado que permita confirmar su identidad^{12,13}. En este estudio se logró identificar en muestras de cáncer de cavidad oral, con la técnica de inmunofluorescencia, diferentes marcadores de células tumorales progenitoras: OCT4 (del inglés: *Octamer-binding transcription factor 4*), SSEA-4 (del inglés: *Stage specific embryonic antigen-4*), NANOG, derivado del vocablo mitológico Celta *Tir nan Óg*, que significa tierra de la juventud y TRA-1-60 (del inglés: *Tumour related antigen*).

La presencia de estos marcadores sugiere la participación de las células progenitoras tumorales en la evolución de este tipo de cáncer y brinda nuevas posibilidades sobre opciones terapéuticas para el tratamiento de esta patología.

Materiales y métodos

En este estudio se incluyeron 32 muestras de tejido de pacientes diagnosticados con cáncer escamocelular de cavidad oral y regiones adyacentes, provenientes del Departamento de Patología del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, Colombia. La muestra fue no aleatoria, fue seleccionada por conveniencia, como criterios de inclusión se tuvieron aquellos pacientes diagnosticados con cáncer escamoso de cavidad oral, en el periodo de tiempo determinado (**Tabla 1**). La clasificación tumoral se realizó de acuerdo con las características histopatológicas del tejido en carcinoma escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

Reacción de inmunofluorescencia

Para la identificación de los marcadores específicos se usó la técnica de fluorescencia. Esta metodología fue aplicada a cortes histológicos representativos de las lesiones de 5 µm de espesor, los cuales fueron desparafinizados y posteriormente rehidratados de forma rutinaria. La recuperación de los epítopes se llevó a cabo en Tampón Citrato 10 Mm, a un pH 6,0 por 15 min, mientras que el bloqueo de uniones inespecíficas se logró incubando las láminas en BSA 3 % por 1 h a temperatura ambiente. Se usó cloruro de amonio 50 mM en PBS 1 % durante 1 h, para disminuir la fluorescencia endógena de las muestras.

Se emplearon los siguientes anticuerpos, que son marcadores específicos de células progenitoras: anti-OCT-4, anti-SSEA4, anti-NANOG y anti-TRA-1-60, todos provenientes de Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA). En los controles negativos de las reacciones se omitió la adición del anticuerpo primario.

Como anticuerpo secundario se usó un anti-IgG de conejo desarrollado en cabras, acoplado a Alexa Fluor 488, de Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA). Finalmente se usó el medio de montaje acuoso con DAPI (ab 104139, Abcam, Cambridge, MA, USA) por 5 min y enseguida se realizó la observación en el microscopio acoplado a lámpara de fluorescencia.

Tabla 1. Resumen de las principales características encontradas en la muestra seleccionada por conveniencia de pacientes con Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral. Se muestra el grado de diferenciación del tumor, rango y promedio de edad, género y localización de la lesión.

Grado de diferenciación del carcinoma escamo celular	Rango de edad (años)	Casos	Género	Localización anatómica
Bien diferenciado	(38-92) x = 61,93	16	5 ♀ 11 ♂	Lengua (12), Amígdala (1), Laringe (3)
Moderadamente diferenciado	(41-93) x = 65,23	13	4 ♀ 9 ♂	Lengua (7), Amígdala (1), Laringe (3), Labio (2)
Pobrementemente diferenciado	(60-76) x = 66,6	3	3 ♂	Lengua (1), Amígdala (1), Labio (1)

Captura y análisis de imagen

Una vez detectadas las regiones de interés, fueron analizadas en el microscopio Axio Imager Z2, y con los filtros correspondientes para DAPI y FITC, las imágenes fueron capturadas con la cámara AxioCam ICm 1 con el objetivo 40x (Carl Zeiss, Jena, Germany). El análisis inicial se realizó en el Software ZEN (*blue edition*) (Carl Zeiss, Jena, Germany), y la combinación con ayuda del programa FIJI (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda).

Medición de la intensidad de la fluorescencia

Para buscar diferencias de intensidades de las marcaciones se capturaron imágenes en 10X y posteriormente fueron analizadas en el programa FIJI (<https://imagej.net/software/fiji/>). Se resaltó el brillo y contraste para eliminar el fondo (background), con fluorescencia inespecífica. Se seleccionaron aleatoriamente cuatro regiones de tres láminas diferentes por muestra, para un total de 12 mediciones de los diferentes grupos estudiados, carcinoma escamocelular bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

Enseguida, en la opción análisis del programa se usó el aplicativo ROI (región de interés) para seleccionar un área de 2 pulgadas cuadradas representativas del tejido en cada lámina, posteriormente se usó el aplicativo Plot Profile, que muestra la intensidad de la fluorescencia en el área seleccionada. Las figuras de los diferentes estadios tuvieron la misma área de selección de una región representativa del tejido y fueron sometidas al mismo análisis. Los gráficos de caja y las imágenes seleccionadas fueron agrupadas y organizadas en el programa Photoshop para su presentación final.

Análisis Estadístico

Para ver si existían diferencias estadísticas entre la intensidad de la fluorescencia de los diferentes grados del carcinoma de cavidad oral bien diferenciado (BD), Moderadamente diferenciado (MD) y Pobremente diferenciado (PD), se usó la prueba de ANOVA. Como variable cuantitativa se tomó intensidad de la fluorescencia.

Al realizar la prueba de Bartlett para analizar si la muestra cumplía con los supuestos para realizar la prueba de ANOVA, encontramos un valor de (0,028), lo cual indica que las varianzas no cumplen esos supuestos de homogeneidad. Por tal razón, se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde se comparó la suma de los rangos y las diferencias específicas entre los grupos, en este caso, el nivel de confianza que se usó fue de 95 %.

Resultados

En el análisis histológico comparativo fue posible apreciar las alteraciones del tejido, acorde con los diferentes grados de diferenciación del tumor (**Figura 1**). En el tejido normal se aprecia la estratificación del epitelio, con sus diferentes tipos celulares debidamente organizados sin presentar alteraciones morfológicas a nivel nuclear o citoplasmático. Posteriormente, en las muestras de cáncer fue posible identificar las alteraciones celulares y pérdida de organización del tejido a medida que el tejido pierde su grado de diferenciación.

En el estadio bien diferenciado (**Figura 1B**) fue posible identificar algunas perlas de queratina (PQ) totalmente desarrolladas, densas y eosinofílicas, rodeadas por células en la región externa. En el estadio

moderadamente diferenciado (**Figura 1C**) se destaca la infiltración de células, probablemente neutrófilos, hacia la parte central, los cuales comienzan a formar espacios en esta región. La región periférica de la perla comienza a presentar infiltración celular.

En el estadio pobremente diferenciado (**Figura 1D**) se destacan neutrófilos, células inflamatorias, linfocitos entre otros y el tejido se torna más basófilo (flecha), y su arquitectura se ha perdido totalmente.

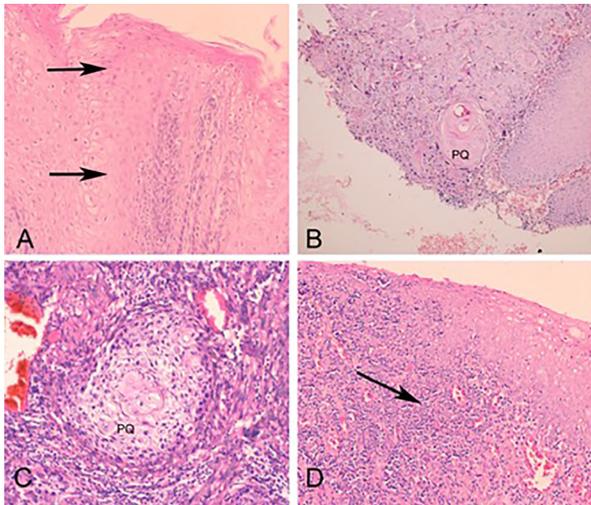


Figura 1. Imágenes en menor aumento de tejido normal (A), y Carcinoma Escamocelular de Cavidad Oral, bien diferenciado (B) moderadamente diferenciado (C) y pobremente diferenciado (D).

Las reacciones de inmunofluorescencia fueron positivas en los tejidos para los diferentes marcadores. Se consiguió la detección del marcador OCT4 en el epitelio de las muestras de CECO y se notó una variación en la intensidad entre bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado. Esto se hace evidente en el citoplasma de algunas células epiteliales (**Figura 2A y 2B**).

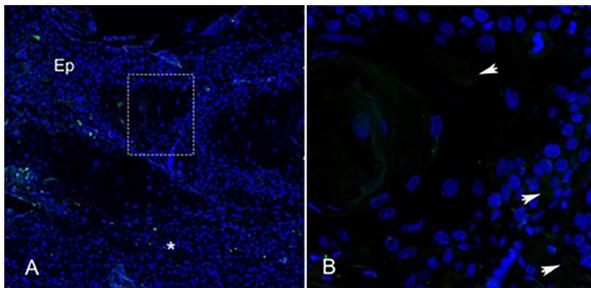


Figura 2. Identificación por inmunofluorescencia de la proteína OCT4, en muestras de carcinoma escamocelular de cavidad oral moderadamente diferenciado. Se observa en detalle general 10x (Fig. A); y, en magnificación de 40x recuadro punteado en A (Fig. B).

El marcador SSEA4 presentó marcación en todos los estadios de diferenciación, sin embargo, en algunas regiones del epitelio de las muestras de CECO pobremente diferenciado, fue más intensa (**Figuras 3A y 3B**).

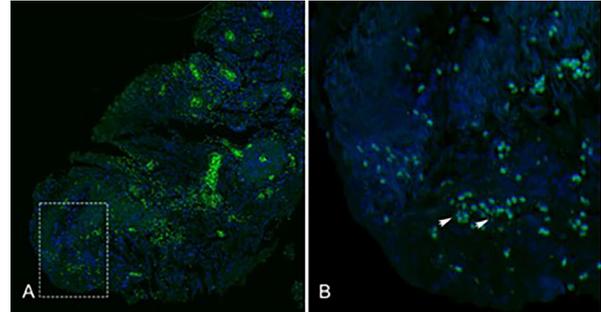


Figura 3. Identificación por inmunofluorescencia de la proteína SSEA4 en muestras de carcinoma escamocelular de cavidad oral pobremente diferenciado. Se observan en pequeño aumento 10x (Fig. A) y mayor aumento 40x (Fig. B) las diferentes características del tejido. Donde se observa una marcación (flechas blancas).

Así mismo, la expresión de la proteína NANOG fue evidente, se encontró distribuida a lo largo del tejido y también se pudo detectar alrededor de algunos vasos (**Figura 4A**), su localización celular es citoplasmática de algunas células (flechas, **Figura 4B**).

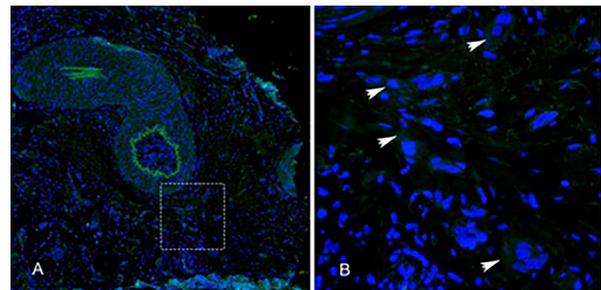


Figura 4. Marcación positiva para la proteína NANOG en muestras carcinoma escamocelular de cavidad oral bien diferenciado. Microfotografía en aumento de 10X (A) donde se destacan marcaciones positivas en verde indicando la presencia de células que expresan Nanog. La figura B es el aumento en 40X de la selección punteada en A, donde se muestran las células en detalle con la marcación citoplasmática.

Por otro lado, el marcador TRA-1-60 fue detectado en las muestras de carcinoma moderadamente diferenciado, donde fue posible apreciar su localización citoplasmática (**Figuras 5A y 5B**).

La intensidad de la fluorescencia (**Figura 6**) permitió corroborar las variaciones de marcaciones inicialmente

observada entre los diferentes grupos: la proteína OCT 4 fue más intensa en el estadio bien diferenciado y su marcación disminuye en los estadios moderadamente y pobremente diferenciado, la proteína SSEA4 tiene una marcación baja en el estadio bien diferenciado

que se incrementa en los estadios moderadamente y pobremente diferenciado. Las proteínas NANOG y TRA-1-60 están presentes en los tres estadios de diferenciación del tejido, sin presentar variaciones significativas (Figura 7).

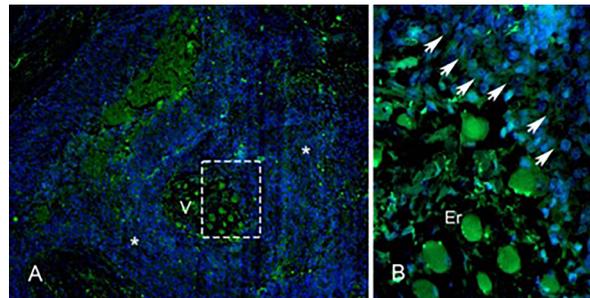


Figura 5. Identificación por inmunofluorescencia de la proteína TRA-1-60 en muestras de carcinoma escamocelular de cavidad oral moderadamente diferenciado. micrografía en menor aumento 10X (Fig.A) y detalles del recuadro punteado en mayor aumento (Fig B).

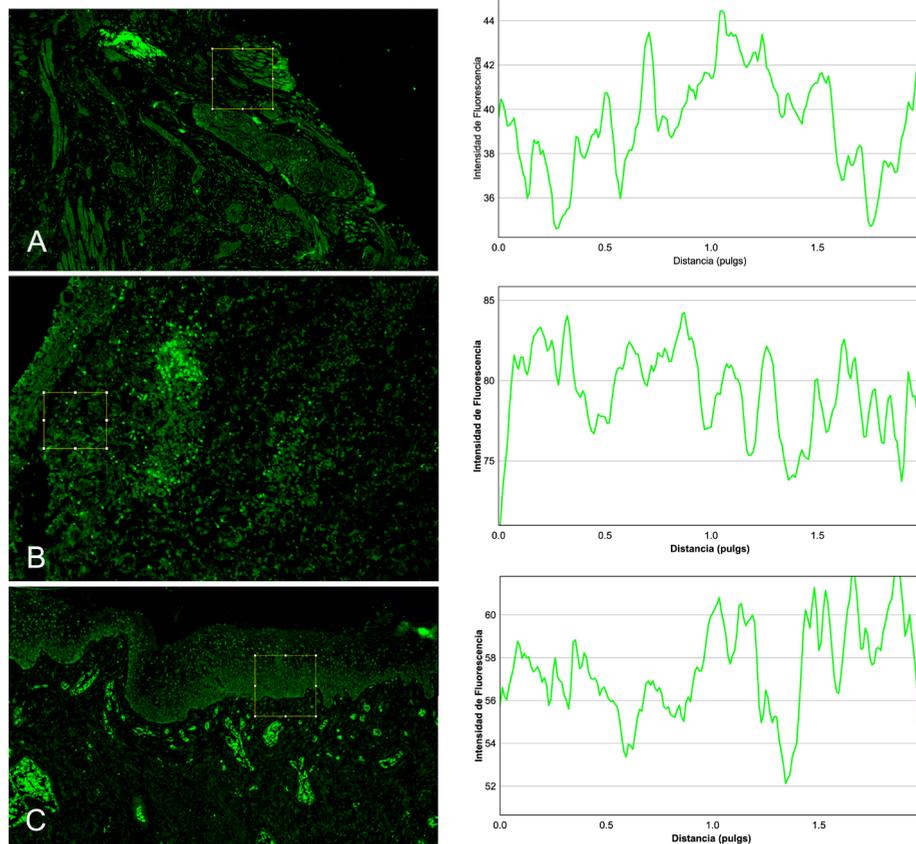


Figura 6. Cuantificación de la fluorescencia de los diferentes tratamientos, muestra aleatoria de cancer de cavidad oral. Figura A, muestra de carcinoma escamocelular de cavidad oral bien diferenciado, Figura B, muestra de carcinoma escamocelular de cavidad oral moderadamente diferenciado, Figura C, muestra de carcinoma escamocelular de cavidad oral pobremente diferenciado. Paneles laterales respectivas mediciones de la intensidad de la fluorescencia, a través del aplicativo Plot Profile del Programa FIJI.

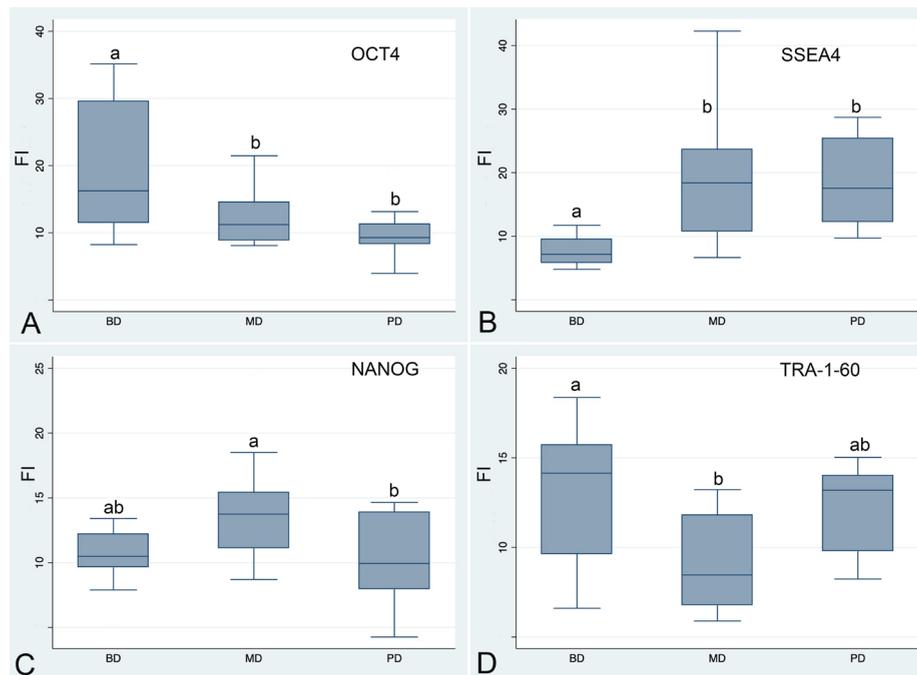


Figura 7. Diagramas de caja de la variable intensidad de fluorescencia de los diferentes grupos experimentales analizados. Diagramas con letras diferentes presentan diferencias estadísticas significativas.

Discusión

Estudios previos han validado el papel patofisiológico de las células tumorales progenitoras en el mantenimiento a largo plazo de algunos tipos de cáncer¹⁴.

Las células tumorales progenitoras son pequeñas poblaciones de células que comparten algunas características moleculares con las células normales progenitoras, inclusive se han aislado de diferentes tipos de cáncer, incluido el CECO⁸. Se cree que coordinan procesos relacionados con la recidiva local y diseminación regional del tumor, debido a su habilidad de dividirse de forma asimétrica y repoblar células tumorales¹⁵.

Experimentalmente se ha identificado la presencia de diferentes marcadores de células tumorales. La proteína OCT4, cuya expresión en tejido tumoral ha sido relacionada con el potencial tumorigénico y con características clínicas de agresividad como metástasis y progresión tumoral, actúa además en la renovación de las células madre embrionológicas y mantiene la pluripotencia de estas a través de la interacción con factores de transcripción como Stat3, Zic3 y HeX1¹⁶.

Siu et al. encontraron que la expresión de OCT4 en combinación con NANOG y CD133 muestran un peor

pronóstico y tasa de supervivencia en cáncer escamocelular, lo cual indica su utilidad como marcador pronóstico y de invasión^{17,18}.

En cáncer de cavidad oral (específicamente en labio) se ha identificado la presencia de NANOG en subpoblaciones celulares dentro de nichos tumorales, incluso se cree que pueden estar en las regiones estromales adyacentes¹⁹, ya su utilidad clínica queda en evidencia al correlacionar su expresión en CECO con bajas tasas de supervivencia de los pacientes²⁰.

La literatura reporta un comportamiento agresivo de las células de CECO que expresan en conjunto la proteína SSEA-4 (*Stage-specific embryonic antigen-4*) y el marcador CD44+, las cuales tienen capacidad de formación de esferas *in vitro*, resistencia a medicamentos y habilidad para formar tumores en murinos atímicos²¹. Por otro lado, el papel de TRA-1-60 *Tumour-related antigen*, en cáncer escamocelular de cavidad oral, es aún indeterminado. En el experimento encontramos su presencia en el tejido, pero no mostró variación durante el proceso de dediferenciación del tumor, lo que indica una expresión generalizada de esta proteína.

Es bastante atrayente la exploración del papel de las células tumorales progenitoras en el CECO y aquí se plantea la presencia de ellas en diferentes estadios del tumor, nuestro modelo muestra la presencia de los marcadores en todo el proceso de pérdida de diferenciación celular, pero con intensidades variables de algunos marcadores. Al parecer las células que expresan OCT4 están más presentes al inicio del proceso y posteriormente su expresión disminuye, mientras que SSEA4 sería prevalente en estados de carcinoma escamocelular moderada y pobremente diferenciado. Ya NANOG y TRA-1-60 estarían presentes durante toda la pérdida de diferenciación del tumor (Figura 8). Los anteriores hallazgos desde el punto de vista clínico son interesantes, ya que, al hacer un paralelo con los tratamientos de quimioterapia actuales, nos permite recordar que estos no discriminan entre la heterogeneidad celular del tumor.

Las células con características tumorales, de lento crecimiento, pueden no ser afectadas por tratamientos convencionales, logran mantener el crecimiento del tumor y ser responsables por la resistencia a las terapias²² y ocasionar la recurrencia tumoral. Por tal razón, es recomendable direccionar nuevas terapias hacia blancos más específicos y teniendo en cuenta la variabilidad celular tumoral.

Además de esto, es recomendable incorporar nuevas tecnologías en histopatología, se ha notado un crecimiento de la literatura que resalta el uso de inteligencia artificial y diferentes softwares como herramienta de diagnóstico y pronóstico de algunas patologías. Si bien el trabajo del especialista es insustituible, sí existen ciertos procesos que pueden ser agilizados y estandarizados de una forma más objetiva.

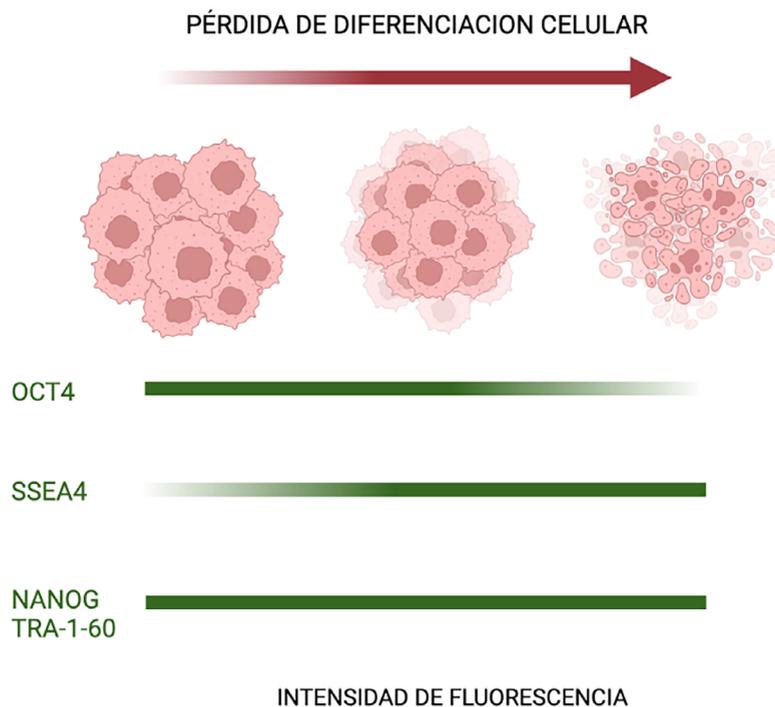


Figura 8. Modelo hipotético de la participación de células progenitoras en el cancer escamocelular de cavidad oral. A medida que ocurre la pérdida de diferenciación celular, disminuye la expresión del marcador OCT4 y aumenta la expresión del marcador SSEA4. Los marcadores NANOG y TRA-1-60 permanecen constantes durante el proceso. Figura elaborada por los autores en <https://biorender.com/>

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al servicio de Patología del Hospital Universitario, Hernando Moncaleano Perdomo, Neiva – Huila, Colombia.

Consideraciones éticas

La versión inicial de este trabajo fue publicada como preprint en el repositorio [preprints.scielo.org](https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/1848) <https://preprints.scielo.org/index.php/scielo/preprint/view/1848>.

Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas del Comité de Ética, Bioética e Investigación del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva, cuya aprobación está bajo el registro no 003-001.

Financiación

Este estudio fue realizado con el soporte financiero de la Vicerrectoría de Investigaciones y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana – Neiva, Huila

Conflicto de interés

Los autores declaran no poseer conflicto de intereses con el estudio realizado.

Referencias

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2009; 45(4-5): 309-316. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.06.002>
2. Noble AR, Greskovich JF, Han J, Reddy CA, Nwizu TI, Khan MF, et al. Risk factors associated with disease recurrence in patients with stage III/IV squamous cell carcinoma of the oral cavity treated with surgery and postoperative radiotherapy. *Anticancer Res*. 2016; 36(2): 785-792.
3. Liao CT, Lin CY, Fan KH, Wang HM, Ng SH, Lee LY, et al. Identification of a high-risk group among patients with oral cavity squamous cell carcinoma and pT1-2N0 disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2012; 82(1): 284-290. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2010.09.036>
4. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006; 24(17): 2666-2672. doi: <https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.8306>
5. Huang CG, Lee LA, Liao CT, Yen TC, Yang SL, Liu YC, et al. Molecular and serologic markers of HPV 16 infection are associated with local recurrence in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Oncotarget* [Internet]. 2017; 8(21): 34820-34835. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16747>
6. Lewis JS Jr, Smith MH, Wang X, Tong F, Mehrad M, Lang-Kuhs KA. Human papillomavirus-associated oral cavity squamous cell carcinoma: An entity with distinct morphologic and clinical features. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2022. doi: <https://doi.org/10.1007/s12105-022-01467-0>
7. Nauta IH, Heideman DAM, Brink A, van der Steen B, Bloemena E, Koljenović S, et al. The unveiled reality of human papillomavirus as risk factor for oral cavity squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* [Internet]. 2021; 149(2): 420-430. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.33514>
8. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2015; 51(7): 643-651. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.04.006>
9. Bhutia SK, Naik PP, Praharaj PP, Panigrahi DP, Bhol CS, Mahapatra KK, et al. Identification and characterization of stem cells in oral cancer. *Methods Mol Biol*. [Internet]. 2019; 2002: 129-139. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9818-4_18
10. Shin KH, Kim RH. An updated review of oral cancer stem cells and their stemness regulation. *Crit Rev Oncog* [Internet]. 2018; 23(3-4): 189-200. doi: <https://doi.org/10.1615%2FCritRevOncog.2018027501>
11. Patel SS, Shah KA, Shah MJ, Kothari KC, Rawal RM. Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2014; 15(20): 8549-56. doi: <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.20.8549>
12. Wolmarans E, Boy SC, Nel S, Mercier AE, Pepper MS. Cancer stem cells in head and neck carcinomas: Identification and possible therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2018; 1083: 89-102. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9818-4_18
13. Varun BR, Jayanthi P, Ramani P. Cancer stem cells: A comprehensive review on identification and therapeutic implications. *J Oral Maxillofac Pathol* [Internet]. 2020; 24(1): 190. doi: https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_336_19
14. Beck B, Blanpain C. Unravelling cancer stem cell potential. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2013; 13(10): 727-738. doi: <https://doi.org/10.1038/nrc3597>
15. Chowdhury FN, Reisinger J, Gomez KE, Chimed TS, Thomas CM, Le PN, et al. Leading edge or tumor core: Intratumor cancer stem cell niches in oral cavity squamous cell carcinoma and their

- association with stem cell function. *Oral Oncol* [Internet]. 2019; 98: 118-124. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.09.011>
16. Tsai LL, Yu CC, Chang YC, Yu CH, Chou MY. Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2011; 40(8): 621-628. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2011.01015.x>
 17. Siu A, Lee C, Dang D, Lee C, Ramos DM. Stem cell markers as predictors of oral cancer invasion. *Anticancer Res*. 2012; 32(4): 1163-1166.
 18. Kilmister EJ, Patel J, van Schaijik B, Bockett N, Brasch HD, Paterson E, et al. Cancer stem cell subpopulations are present within metastatic head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Front Oncol* [Internet]. 2020; 10: 1091. doi: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01091>
 19. Ram R, Brasch HD, Dunne JC, Davis PF, Tan ST, Itinteang T. The identification of three cancer stem cell subpopulations within moderately differentiated lip squamous cell carcinoma. *Front Surg* [Internet]. 2017; 4: 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fsurg.2017.00012>
 20. Lee HJ, Kang YH, Lee JS, Byun JH, Kim UK, Jang SJ, et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health* [Internet]. 2015; 15(1): 153. doi: <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0120-9>
 21. Noto Z, Yoshida T, Okabe M, Koike C, Fathy M, Tsuno H, et al. CD44 and SSEA-4 positive cells in an oral cancer cell line HSC-4 possess cancer stem-like cell characteristics. *Oral Oncol* [Internet]. 2013; 49(8): 787-795. doi: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.04.012>
 22. Mohiuddin IS, Wei SJ, Kang MH. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* [Internet]. 2020; 1866(4): 165432. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>