



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS: BIOLOGÍA BUCAL

**EXPRESIÓN DE AGR, CD63 y CK-7 Y MARCADORES DE TRONCALIDAD EN
LÍNEAS ESTABLECIDAS DE TUMORES DE CABEZA Y CUELLO HPV+/-**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

CD. Lis Gabriela Pando Castillo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Silvia Maldonado Frías. Fac. Odontología

CO-TUTOR

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez. Fac. Odontología


Vo. Bo.



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, junio 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

CIENCIAS ODONTOLÓGICAS BÁSICAS: BIOLOGÍA BUCAL

**EXPRESIÓN DE AGR, CD63 y CK-7 Y MARCADORES DE TRONCALIDAD EN
LÍNEAS ESTABLECIDAS DE TUMORES DE CABEZA Y CUELLO HPV+/-**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

CD. Lis Gabriela Pando Castillo

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Silvia Maldonado Frías

CO-TUTOR

Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez


Vo. Bo.



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, junio 2022

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la UNAM.

Este trabajo fue realizado bajo la tutoría principal de la Dra. Silvia Maldonado Frías y co-tutoría del Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez en el laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Odontología en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce y agradece el apoyo del Dr. Alejandro García Carrancá y al Instituto Nacional de Cancerología SS por el apoyo para la realización de este proyecto.

Durante los estudios de maestría se contó con la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) correspondiente al CVU Becario **1028609**.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT <**PAPIIT-IA206921**>.

ÍNDICE

RESUMEN.....	V
ABSTRACT	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ABREVIATURAS	IX
GLOSARIO	X
INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	12
1.1 Cáncer	12
1.2 Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello	14
1.2.2 Epidemiología	16
1.2.3 Factores de riesgo.....	17
1.3 Células troncales cancerosas	22
1.4 Marcadores de troncalidad.....	26
1.4.1 OCT4	27
1.4.2 NANOG.....	29
1.4.3 SOX2.....	30
1.4.4 Otros marcadores de troncalidad	31
1.5 Marcadores asociados a la unión escamocolumnar	32
1.5.1 Citoqueratina 7	32
1.5.2 CD63.....	33
1.5.3 AGR-2.....	34
1.6 Cultivo celular tridimensional como modelo de estudio en CCECC.....	35
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS.....	38
4.1 Objetivo general.....	38
4.2 Objetivos específicos.	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1 Materiales	39
5.1.1 Líneas celulares.....	39
5.1.2 Reactivos.....	39
5.1.3 Materiales.....	39
5.1.4 Equipo	40
5.2 Metodología.....	40

5.2.1 Cultivos celulares.....	40
5.2.2 Cultivos en esferoides.....	40
5.2.3 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E).....	41
5.2.4 Identificación de los marcadores.....	41
5.2.5 Expresión del transcrito de E6.....	41
5.2.6 Análisis de datos.....	42
6. RESULTADOS.....	42
6.1 Esferoides de las líneas SCC090, SCC152 (VPH ⁺) y SCC25, FaDu (VPH ⁻).....	42
6.2 Identificación del transcrito de E6 en las líneas VPH ⁺	47
6.3 Expresión de biomarcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar en las líneas celulares VPH-positivas y VPH-negativas.....	47
7. DISCUSIÓN.....	49
8. CONCLUSIONES.....	53
9. PERSPECTIVAS.....	54
REFERENCIAS.....	55

RESUMEN

Introducción. El cáncer de cabeza y cuello es la séptima causa de muerte a nivel mundial. Hasta el 90% de los casos corresponde a carcinoma de células escamosas (CCE). Los factores de riesgo asociados son el consumo de tabaco, alcohol y el Virus del Papiloma Humano (VPH). Se ha reportado que el pronóstico y supervivencia de los pacientes con CCE VPH-positivo resulta más favorable a diferencia de los pacientes con tumores VPH-negativo, lo que sugiere un papel importante del virus en la carcinogénesis. Por otro lado, las células troncales cancerosas desempeñan un papel relevante en el desarrollo del cáncer. Recientemente se ha encontrado una asociación entre la infección por VPH y expresión de marcadores de unión escamocolumnar como AGR2, CK7 y CD63 en una población celular con características de troncalidad, pero, no se ha demostrado su expresión con biomarcadores de troncalidad (SOX2, OCT4, NANOG).

Objetivo. Identificar la expresión de marcadores de troncalidad y de unión escamocolumnar en líneas celulares de carcinoma de células escamosas de VPH-positivas y VPH-negativas.

Metodología. Se obtuvieron esferoides en suspensión a partir de una estandarización de líneas celulares VPH-positivo y VPH-negativo de CCE. Los esferoides se embebieron en parafina y se realizaron cortes para tinción H&E e identificación de marcadores de troncalidad y de unión escamocolumnar mediante técnica inmunohistoquímica. El análisis de la expresión de los biomarcadores se realizó mediante microscopía. Los ensayos se realizaron por triplicado (\pm SD).

Resultados. Tanto los esferoides de las líneas VPH⁺, como los de las líneas VPH⁻ resultaron positivos para marcadores de troncalidad como SOX2, OCT4 y NANOG. Para los marcadores de la unión escamocolumnar, CK7 resultó positivo en todas las líneas, AGR2 mostró negatividad para todos los casos. Sin embargo, CD63 mostró una expresión diferencial, resultó positivo en líneas VPH⁺, mientras que en líneas VPH⁻, fue negativo. **Conclusiones.** La expresión de marcadores de troncalidad en líneas de CCE de cabeza y cuello como SOX2, OCT4 y NANOG no es dependiente de la presencia del VPH en esferoides y mostraron expresión positiva en todas las líneas celulares. En el caso de CK7, es expresado en las cuatro líneas celulares, confirmando los hallazgos encontrados en CCE de cérvix. AGR2 no mostró expresión en ninguna de las líneas, mientras que, CD63 presentó una expresión dependiente de la presencia del VPH. Esto, sostiene la idea de que CD63 es una proteína mediadora del transporte vesicular implicado en la infección por VPH.

ABSTRACT

Introduction. Head and neck cancer is the 7th cause of death worldwide and 90% of cases are Squamous cell carcinoma (SCC). The risk factors are tobacco, alcohol and high-risk Human Papillomavirus (HR-HPV). Prognosis and survival of patients with HPV-positive SCC is better compared to patients with HPV-negative tumors, this suggests an important role of the virus in carcinogenesis. In addition, cancer stem cells (CSC) play an important role in the development of cancer. Recently, an association between HPV infection and expression of squamocolumnar junction (SCJ) markers (AGR2, CK7, CD63) in head and neck has been described in a cellular population with stem properties. However, co-expression with stem biomarkers (SOX2, OCT4, NANOG) has not been reported yet. **Objective.** To identify the expression of stem and squamocolumnar junction markers in HPV-positive and HPV-negative spheroids from SCC cell lines. **Methodology.** Spheroids were obtained from a standardization of HPV-positive and HPV-negative cell lines. Spheroids were embedded in paraffin and sections were stained with H&E. Identification of stem and squamocolumnar junction markers were performed by immunohistochemistry. Analysis of biomarkers expression was accomplished by microscopy. Trials were performed in triplicate (\pm SD). **Results.** HPV+ and HPV- spheroids resulted positive for stem markers such as SOX2, OCT4 and NANOG. In regard to, squamocolumnar junction markers, CK7 was positive in all lines and AGR2 was negative in all cases. However, CD63 exhibited a differential expression, it was positive in HPV+ lines, while in HPV- lines, it was negative. **Conclusions.** The expression of stem markers in head and neck SCC lines such as SOX2, OCT4 and NANOG is independent on the presence of HPV, expressing positive immunoreaction in all cell lines. CK7 was expressed in the totally of cell lines, according to results found in SCC of the cervix. AGR2 did not show expression in any of the lines, while CD63 presented an expression dependent on the presence of HPV. This supports the idea that CD63 is a vesicular transport mediator protein involved in HPV infection.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre células troncales cancerosas y células troncales en tejido sano.....	23
Tabla 2. Estandarización de líneas celulares para la formación de esferoides.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sellos distintivos del cáncer.....	13
Figura 2. Sitios anatómicos de cáncer en cabeza y cuello.....	14
Figura 3. Principales factores involucrados en el desarrollo de CCE de cabeza y cuello....	18
Figura 4. Mecanismo de la infección por VPH y carcinogénesis en cabeza y cuello.....	22
Figura 5. Diferencias entre células troncales normales y células troncales cancerosas.....	24
Figura 6. Modelo estocástico y modelo jerárquico.....	25
Figura 7. Origen de las células troncales cancerosas.....	25
Figura 8. Marcadores moleculares utilizados para el aislamiento e identificación de células troncales de cáncer oral.....	27
Figura 9. Cultivo celular en 3D en cabeza y cuello.....	37
Figura 10. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC090 (lengua, VPH ⁺).....	43
Figura 11. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC152 (hipofaringe, VPH ⁺).....	44
Figura 12. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC25 (lengua, VPH ⁻).....	45
Figura 13. Crecimiento de esferoides de la línea celular FaDu (hipofaringe, VPH ⁻).....	46
Figura 14. Expresión del transcrito de la oncoproteína E6.....	47
Figura 15. Expresión de biomarcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar en las líneas celulares VPH-positivas y VPH-negativas.....	49

ABREVIATURAS

CCE. Carcinoma de Células Escamosas

CCECC. Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello

COCE. Carcinoma Oral de Células Escamosas

CTC. Células Troncales Cancerosas

GLOBOCAN. Observatorio Global de Cáncer, por sus siglas en inglés Global Cancer Observatory

OMS. Organización Mundial de la Salud

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés

QT. Quimioterapia

Rb. Proteína del retinoblastoma

RT. Radioterapia

SIVEPAB. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales

TEM. Transición Epitelio-Mesénquima

TNM: Estadio Clínico (T: Grado de invasión) (N: Número y localización de ganglios Linfáticos) (M: Metástasis)

VPH. Virus del Papiloma Humano

GLOSARIO

Apoptosis. Muerte celular programada.

Cápside. Conjunto de proteínas que envuelven el material genético (ADN y ARN) de un virus.

Carcinogénico. Agente físico, químico o biológico potencialmente capaz de producir cáncer al exponerse a tejidos vivos.

Condiloma. Lesión benigna exofítica, de superficie rugosa y tamaño variable causada por la infección del virus del papiloma humano.

Disfagia. Dificultad para deglutir.

Epidermoide. Vocablo que hace referencia a la diferenciación terminal de tipo escamosa del epitelio plano estratificado.

Hipoxia. Disminución del suministro de oxígeno a un tejido.

In situ. Latinismo que hace referencia al desarrollo local de un fenómeno, proceso o circunstancia.

In vitro. Latinismo que hace referencia a una técnica para realizar un experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

In vivo. Latinismo que hace referencia a la experimentación realizada en un organismo vivo.

Inmunohistoquímica. Herramienta que combina técnicas anatómicas, inmunológicas y bioquímicas para determinar la presencia, localización subcelular y la cantidad relativa de una determinada proteína mediante una reacción antígeno-anticuerpo, a través de marcaje directo o indirecto y utilizando moléculas señalizadoras.

Metástasis. Diseminación de una neoplasia maligna de una localización a otras alejadas del sitio del tumor primario.

Oncoproteína. Proteína expresada por un gen mutado o por un virus, que interviene en el desarrollo de cáncer.

Transición epitelio-mesénquima. Proceso mediante el cual una célula epitelial adquiere un fenotipo mesenquimal.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el cáncer de cabeza y cuello ha ido a la alza a nivel mundial. Como grupo, representó la séptima causa de muerte y se estima que para el 2030 la incidencia aumente en un 30%. La gran mayoría de las neoplasias primarias de cabeza y cuello corresponden a carcinomas de células escamosas (CCE) y por lo general son diagnosticados en estadios localmente avanzados, debido a ello la mortalidad suele ser alta a pesar del tratamiento. Esto, aunado a la falta de tratamientos personalizados, contribuyendo a la resistencia a la terapia del tumor. De hecho, el estudio de las células troncales ha definido a esta población como la responsable de la progresión tumoral, la resistencia a la terapia y la metástasis.

La constante búsqueda por mejorar calidad de vida para los pacientes afectados por cáncer apunta al uso de nuevas herramientas como el uso de esferoides como modelos tridimensionales para el estudio de biomarcadores moleculares. Recientemente se ha descrito una asociación entre la infección por VPH, el cual resulta un factor importante en la carcinogénesis de CCE de cabeza y cuello, y la expresión de algunos marcadores en células con características de troncalidad en el cérvix que podrían explicar el mecanismo de infección por el VPH de alto riesgo. Sin embargo, a la fecha no se ha descrito la expresión de estos marcadores con biomarcadores de troncalidad. El estudiar la expresión de marcadores de troncalidad y de marcadores de unión escamocolumnar en cabeza nos podría dar indicios del mecanismo de infección que utiliza este virus y si las células con características de troncalidad juegan un rol importante en este proceso, por otra parte la identificación de estos biomarcadores y su expresión en líneas celulares positivas y negativas a VPH podrían ser utilizados como herramientas de pronóstico de los pacientes afectados por este tipo de neoplasias ya que se reportó que hay una mejor supervivencia de los pacientes VPH positivos que presentan este tipo de tumores.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cáncer

Cáncer es un término utilizado para describir un grupo de enfermedades que implican un crecimiento descontrolado y desorganizado de las células, con capacidad de proliferación, invasión y metástasis¹. En conjunto, el cáncer de cabeza y cuello constituye un grupo heterogéneo de tumores que presentan cambios dinámicos en el genoma cuya base molecular comprende mutaciones de protooncogenes y genes supresores de tumores².

En el año 2000, Hanahan y Weinberg, sugirieron seis alteraciones esenciales en la fisiología celular presentes en una gran variedad de tumores humanos. Estos sellos característicos del cáncer involucran: en primer lugar, a la autosuficiencia en señales de crecimiento, es decir, las células cancerosas son capaces de generar sus propias señales para crecer, reduciendo su dependencia a estímulos del microambiente tisular. La segunda característica es la insensibilidad a señales inhibitoras de crecimiento, involucrando específicamente a la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb)³. La interrupción de la vía Rb permite a la célula la proliferación celular y la insensibilidad a factores anti-crecimiento⁴. Como tercer punto, la célula cancerosa es capaz de resistir a la muerte celular programada o apoptosis. La cuarta característica es la adquisición de un potencial replicativo ilimitado, es decir, la célula es capaz de multiplicarse sin límite. La angiogénesis sostenida es el quinto sello distintivo del cáncer que implica el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos que permiten suministrar oxígeno y nutrientes que favorecen el microambiente tumoral. Por último, se considera la invasión tisular y metástasis como la sexta característica distintiva. Esta capacidad permite a las células cancerosas migrar del tumor primario y colonizar nuevos sitios y por lo tanto, convierte al cáncer en una enfermedad mortal, ya que el 90% de las muertes por esta enfermedad son causadas por metástasis³.

Once años después, se describieron y propusieron otras cuatro características emergentes involucradas en el desarrollo de neoplasias malignas las cuales consideran una desregulación energética, en la cual la célula cancerosa es capaz de utilizar energía de fuentes alternativas, la evasión de la destrucción inmunológica, inestabilidad del genoma y mutaciones y por último, la promoción de la inflamación del tumor (Figura 1)².

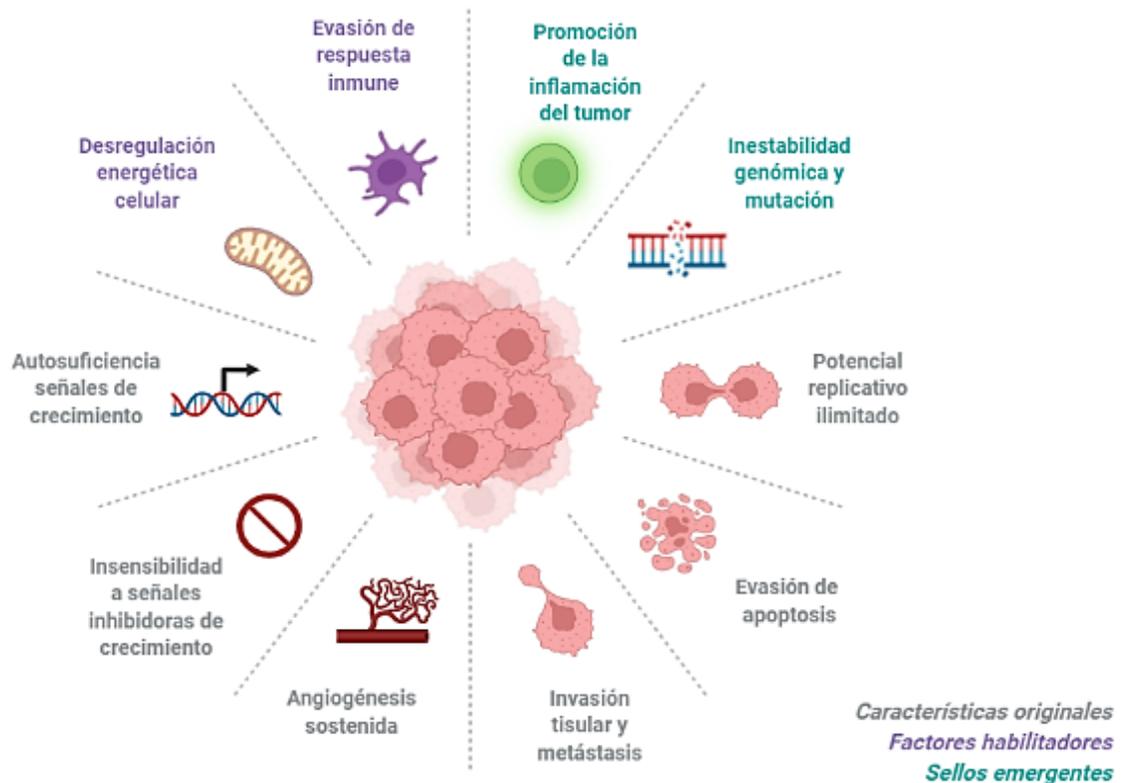


Figura 1. Sellos distintivos del cáncer. Modificado de Hanahan y Weinberg (2011). BioRender (2022).

La descripción de estos rasgos ha resultado relevante ya que ha permitido comprender el proceso molecular del cáncer y sus repercusiones a diferentes niveles: molecular, celular, tisular, sistémico y clínico⁵.

1.2 Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

Se denomina cáncer de cabeza y cuello a aquellas neoplasias originadas en la región anatómica comprendida entre las clavículas, como límite inferior, y la silla turca, como límite superior. Algunos autores lo limitan específicamente al tracto aerodigestivo superior⁶. Cualquiera de estas dos definiciones incluye al cáncer originado en cavidad oral y nasal, senos paranasales, labios, faringe, laringe y glándulas salivales (Figura 2)^{7,8}.

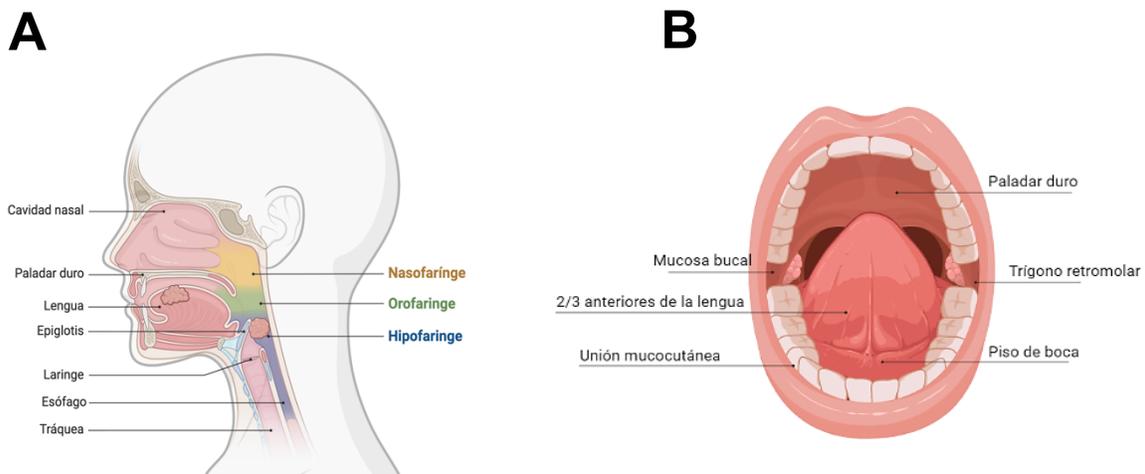


Figura 2. Sitios anatómicos de cáncer en cabeza y cuello. A. Sitios anatómicos de tumores en cabeza y cuello. Se muestra tumor en cavidad oral (dos tercios anteriores de la lengua) y en hipofaringe (azul). B. Subsitios anatómicos de cavidad oral. Modificado de Kato M *et. al* (2020). BioRender (2022).

El cáncer de cabeza y cuello se trata de un grupo de tumores muy heterogéneo tanto desde el punto de vista molecular, como clínico⁹. El principal factor de heterogeneidad clínica es el sitio de origen, que define diferentes enfermedades, cada una con sus propios factores de riesgo típicos, presentación, tendencia a metástasis y pronóstico⁸.

Más del 90% de los cánceres de cabeza y cuello corresponden a carcinoma de células escamosas (CCE), también conocido como carcinoma epidermoide, la variedad histológica más frecuente en esta región. Existen otros subtipos histológicos que han

sido reconocidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como el verrucoso, basaloide, papilar, de células fusiformes, adenoescamoso y linfoepitelial¹⁰.

Este cáncer es potencialmente curable en estadios tempranos, sin embargo, lamentablemente hasta el 65% de los casos se diagnostican en etapas localmente avanzadas^{7,11}. Debido a ello, la mortalidad suele ser alta a pesar del tratamiento. Esto se debe a que estas neoplasias suelen ser asintomáticas en los primeros estadios¹².

Clínicamente, en etapas avanzadas se puede observar crecimiento, inflamación y ulceración de la mucosa, el paciente puede referir dolor, halitosis, dificultad para hablar, abrir la boca, masticar, dolor a la deglución y sangrado, dependiendo de la región afectada. La pérdida de peso e inflamación de cuello son también síntomas comunes en tumores avanzados¹³.

El pronóstico dependerá en gran medida de qué tan temprano se diagnostica y del sitio específico del carcinoma. Por ejemplo, los cánceres de lengua, tienen muchas más probabilidades de hacer metástasis a diferencia de otros cánceres de cabeza y cuello¹⁴, mientras que el cáncer de hipofaringe cuenta con uno de los peores pronósticos entre los cánceres de cabeza y cuello^{15,16}.

Distinguir los sitios anatómicos, los bordes de la cavidad oral y la faringe resulta relevante para el diagnóstico y el manejo de cada entidad¹⁷. El carcinoma oral de células escamosas (COCE) incluye a los tumores que se originan en la cavidad oral, la cual comienza en la unión mucocutánea de los labios y se extiende posteriormente, incluyendo la cresta alveolar y las encías, los dos tercios anteriores de la lengua, el piso de la boca, la mucosa bucal, el triángulo retromolar y el paladar duro (Figura 2B)¹⁸. El labio inferior, la lengua y el piso de la boca, en orden decreciente, son los sitios del tumor primario más frecuentes en más del 75% de los pacientes con COCE¹⁷.

Por otro lado, la hipofaringe es la porción más inferior de la faringe y representa el enlace entre la orofaringe y el esófago. Se encuentra posterior a la laringe. Se extiende desde el borde superior del hueso hioides hasta el borde inferior del cartílago

cricoides (Figura 2A). Los factores que contribuyen al mal pronóstico en este cáncer son la presentación tardía, la afectación en múltiples sitios dentro de la hipofaringe, la extensa red linfática que promueve la metástasis temprana y las opciones quirúrgicas restringidas para la resección completa¹⁹.

Otra diferencia entre la cavidad oral y la faringe es su origen embriológico. El epitelio escamoso dentro de la faringe se deriva del endodermo y tiene una mayor propensión al desarrollo de carcinomas agresivos pobremente diferenciados. Por el otro lado, el epitelio escamoso de la cavidad oral deriva del ectodermo y tiende a dar lugar a lesiones más diferenciadas y menos agresivas¹⁸. En este sentido, como se mencionó anteriormente, el pronóstico está relacionado con el sitio de tumor primario. La tasa de supervivencia general a 5 años es de alrededor del 90% para los casos que afectan al labio inferior, del 40% para los casos de la parte posterior de la lengua y del 20 al 30% para los casos que afectan al paladar blando²⁰.

1.2.2 Epidemiología

En los últimos años la incidencia del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC) ha aumentado rápidamente en países desarrollados^{21,22}. A nivel mundial el cáncer de cabeza y cuello representó el 4.5% de todos los cánceres durante el 2020 y como grupo, constituye la séptima causa de muerte con una incidencia creciente^{23,24}, representando alrededor de 600,000 casos nuevos por año^{8,25,26}. Según el último reporte de GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), durante el 2020, se presentaron en el mundo 377 mil 713 casos nuevos de cáncer en cavidad oral y 84,254 en hipofaringe²³ y se prevé que la incidencia aumente un 30% (1,08 millones de casos nuevos al año) para el 2030¹⁹.

En México, GLOBOCAN, indicó que durante el 2020 se registraron 1500 casos de cáncer en cavidad oral y 132 en hipofaringe²³. Sin embargo, no se cuenta con un registro reciente de la incidencia de cáncer de cabeza y cuello provenientes de organismos nacionales. En el 2002, este cáncer representó el 17.6% de la totalidad de las neoplasias malignas según reportes del Registro Histopatológico de Neoplasias²⁷. Específicamente, el grupo constituido por las neoplasias malignas de

las vías aerodigestivas superiores, representó el 12% de los cánceres en cabeza y cuello. Los sitios específicos se distribuyeron de la siguiente manera: cáncer laríngeo 42%, cáncer oral 37%, cáncer de fosas nasales y senos paranasales 9%, cáncer de orofaringe 6%, cáncer de nasofaringe 3%, y el cáncer de hipofaringe también con un 3%⁷.

Según Tirado *et al.*, la letalidad estimada para el cáncer de vías aerodigestivas en nuestro país es la siguiente: cavidad oral 62.4%, laringe 93%, orofaringe cerca del 100%, hipofaringe 94%, nasofaringe 83% y, fosas nasales y senos paranasales 47%⁷.

Por otro lado, en 2019, el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucales (SIVEPAB) reportó que, según los datos epidemiológicos sobre incidencia y mortalidad del cáncer oral, México se ubica como uno de los países con las tasas más bajas a nivel mundial. Durante ese año se registraron 453 lesiones sospechosas de cáncer oral de tres o más semanas de evolución, de las cuales, el tipo de lesión predominante fue el aumento de volumen²⁸. Sin embargo, lamentablemente en nuestro país resulta complicado encontrar datos sobre el seguimiento de estos pacientes. Desafortunadamente, a pesar de los avances e investigaciones en los últimos años, ha sido poca la mejora en la supervivencia general de pacientes en estadios avanzados y con tumores recurrentes²⁹.

1.2.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo principales reconocidos desde hace mucho tiempo para el cáncer de cabeza y cuello incluyen el tabaquismo y el consumo de alcohol. En este sentido, se considera que el consumo de tabaco y alcohol son los principales factores de riesgo para desarrollar neoplasias de cabeza y cuello^{1,6,7,14,25,26,30-33}, teniendo un efecto sinérgico^{7,14,30,32,33}. Los efectos mutagénicos del tabaco y el alcohol dependen de la dosis, la frecuencia y la duración de su uso³⁴. El humo que produce el cigarro contiene varios elementos carcinogénicos³³. Por otro lado, el etanol puede actuar como un factor de riesgo tanto local como sistémico, causando mayor permeabilidad

de la mucosa oral, disolviendo componentes lipídicos del epitelio y causando atrofia epitelial e interferencia en la síntesis y reparación del ADN^{30,32,33}. Además de estos factores, estudios más recientes también han implicado al virus del papiloma humano (VPH) en el aumento de la incidencia del CCECC (Figura 3)^{1,7,13,1}. Syrjänen *et al.* fueron los primeros en proponer al VPH como factor de riesgo en el desarrollo de CCECC, específicamente en cavidad oral y orofaringe, en el año de 1983^{1,35}.

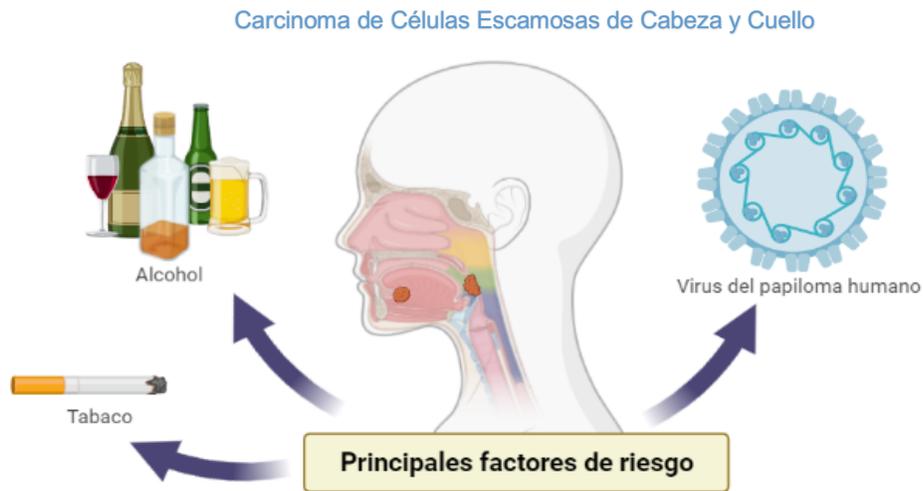


Figura 3. Principales factores involucrados en el desarrollo de CCE de cabeza y cuello.
BioRender (2022).

La OMS ha nombrado a la infección por VPH como uno de los factores causales dominantes del CCE, especialmente de orofaringe y base de la lengua²¹. Se ha sugerido que el aumento del carcinoma epidermoide asociado a VPH se pudiera atribuir a los cambios en el comportamiento sexual de la población en los últimos años, en los cuales se ha visto un incremento en el número de parejas sexuales, así como un inicio de vida sexual activa más temprano^{1,21,22,32,35-37}. La infección por este virus ha representado un factor de riesgo independiente para CCE de cabeza y cuello en aproximadamente el 20% de los pacientes, sin los principales factores de riesgo, como tabaquismo y el abuso de alcohol³⁸. Sin embargo, es importante mencionar que ninguno de los factores de riesgo parece aislado²⁴.

1.2.3.1 Virus del Papiloma Humano

La infección por VPH es una enfermedad de transmisión sexual que contribuye al desarrollo de lesiones anogenitales y aerodigestivas, que van desde verrugas comunes hasta cáncer en hombres y mujeres^{39,40}. Este virus presenta tropismo o afinidad por los epitelios²² y pertenece a la familia *Papillomaviridae*^{41,42}. Su genoma está compuesto de ADN de doble cadena circular sin envoltura, con aproximadamente 8000 pares de bases. Cuenta con una núcleo-cápside proteica icosaédrica compuesta de 72 capsómeros pentaméricos^{43,44}. En la actualidad, se han reconocido más de 200 genotipos de VPH que causan un diverso rango de lesiones epiteliales⁴⁵.

Dependiendo de su capacidad para persistir y transformar las células epiteliales infectadas, estos genotipos se dividen en 2 subtipos generales: VPH de alto y bajo riesgo. El VPH de bajo riesgo incluye al 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, siendo los más frecuentes el 11 y el 6 y estos se asocian con lesiones benignas como la verruga vulgar o condiloma *acuminatum*⁴⁶. Las cepas de alto riesgo también son denominadas oncogénicas, la OMS ha identificado diversos genotipos como el 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 59, los cuales se han asociado a displasias epiteliales con potencial de malignidad, cáncer de cérvix, de vagina, vulva, ano y pene. Por otro lado, en cabeza y cuello se asocian a cáncer oral, faríngeo y laríngeo.^{31,33,36,40}

Según la nueva clasificación de la OMS del 2017 para tumores de cabeza y cuello, se denominan tumores VPH-positivo (VPH⁺) a aquellos que son el resultado de la infección por este virus, los cuales predominantemente son asociados a los subtipos 16 y 18^{8,14,46}. El papilomavirus 16 se considera el genotipo más prevalente de los VPH oncogénicos⁴⁷.

Los sitios más comunes de CCECC relacionados con el VPH son las amígdalas y la base de la lengua. El desarrollo de esta neoplasia es raro en sitios no orofaríngeos^{8,14,25}. Las frecuencias reportadas para tumores VPH positivos varían, sin embargo, es importante destacar que en orofaringe el VPH 16 se ha encontrado hasta en el 80% de los carcinomas de células escamosas orofaríngeos VPH positivos^{8,14,46,48}.

Los tumores positivos para VPH, muestran una mayor tasa de incidencia entre hombres más jóvenes en países desarrollados y no se asocian en la mayoría de los casos a factores como el tabaco y el alcohol, además se asocian a tumores primarios más pequeños^{21,37,49 50}. Los pacientes típicos con tumores asociados a este virus se describen como hombres menores de 60 años, de raza blanca y con un nivel socioeconómico más alto³⁶.

También es importante considerar que los CCE asociados al VPH y los tumores VPH negativos (VPH⁻) son dos entidades diferentes con respecto a las características biológicas, la respuesta terapéutica y el pronóstico del paciente⁴⁶. Un dato interesante que se reporta en numerosos estudios, indica que el pronóstico y supervivencia de los pacientes con carcinoma escamoso VPH⁺ es mucho mejor que en el VPH⁻, independientemente del estadio clínico y sistema de estadificación TNM. Tras el tratamiento, se observa una supervivencia a 5 años del 70-80% en pacientes con tumores VPH⁺ contra un 25-40% en neoplasias no asociadas al virus; lo que demuestra una característica biológica y clínica asociada con la transcripción activa del virus^{8,22,25,32,49,51}.

1.2.3.2 VPH y carcinogénesis

La carcinogénesis es un proceso en el que modificaciones genéticas y epigenéticas en vías de señalización asociadas al cáncer se acumulan con el tiempo. Esto da como resultado el fenotipo típico de las células malignas caracterizadas por: potencial de replicación ilimitado, independencia de los factores de crecimiento, capacidad suprimida de apoptosis, crecimiento invasivo y potencial metastásico, así como un aumento de la angiogénesis^{24,52}.

La carcinogénesis de CCECC VPH positivo es promovida principalmente por oncoproteínas virales^{1,21,24,32,35,43}.

Desde el punto de vista de la oncogénesis viral, el ADN del virus puede estar de forma episomal en los papilomas, mientras que en los carcinomas su genoma se encuentra

integrado al genoma de la célula infectada⁵³. Se ha descrito que en las criptas amigdalinas es el lugar donde, principalmente, se inicia la integración del VPH y la carcinogénesis⁵⁴. La evidencia científica muestra que el VPH contribuye en la carcinogénesis debido a que sus genes y productos son capaces de interferir el ciclo celular⁴⁶. Su genoma contiene nueve o diez regiones codificantes, que codifican para proteínas no estructurales no involucradas en la regulación de las funciones virales, también denominados genes de expresión temprana (“E”, *early*), así como genes que codifican para proteínas estructurales involucradas en la producción de las diferentes partículas del virus o genes de expresión tardía (“L”, *late*). El genoma del VPH también contiene una región no codificante (LCR, *long control region*) que es la encargada de regular la expresión de todos los genes^{1,53}.

Especialmente, el virus codifica dos oncoproteínas principales: E6 y E7^{37,46,48,55,56}. Se ha demostrado que E6 y E7 se unen y destruyen los genes supresores de tumores p53 y Rb, respectivamente, interrumpiendo de esta manera el ciclo celular y evidenciando una pérdida de control sobre la replicación y reparación del ADN, así como de la apoptosis, lo que conduce a una sobreexpresión del inhibidor de la quinasa p16^{Ink4a} dependiente de ciclina^{1,8,32,33}. De esta manera, la participación del virus del papiloma humano en la carcinogénesis es que el ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped durante una infección latente y persistente con VPH de tipo oncogénico⁴².

La proteína E2 viral controla la actividad de las oncoproteínas E6 y E7, y la alteración del marco de lectura de E2 conduce a su expresión mejorada. E6 y E7 inhiben la apoptosis y promueven el ciclo celular, lo que conduce a la proliferación de las células epiteliales y la persistencia de la infección. Como consecuencia, las células infectadas se mueven a estratos superiores de la mucosa donde disminuye la actividad de E6 y E7. Durante la carcinogénesis asociada al VPH, p53 es marcado para la degradación proteolítica por la actividad de E6 y, por tanto, se inactiva. Mientras que E7 se une a la proteína del retinoblastoma (Rb) que desencadena el ciclo celular y libera el factor de transcripción E2F, involucrado en la síntesis de proteínas que regulan el ciclo

celular. Esto aumenta la transcripción de estos genes relevantes para la proliferación celular por lo que se favorece la propagación tumoral (Figura 4)^{24,36,46,48,57}.

La expresión de E6 y E7 es independiente del número de copias o de la integración del ADN viral, y en más del 60% de los CCE VPH-positivo, se ha detectado DNA episomal mediante PCR. En este contexto, el papel de la infección por VPH de alto riesgo en la carcinogénesis de orofaringe define un grupo de CCE con características clínicas y moleculares específicas²⁴.

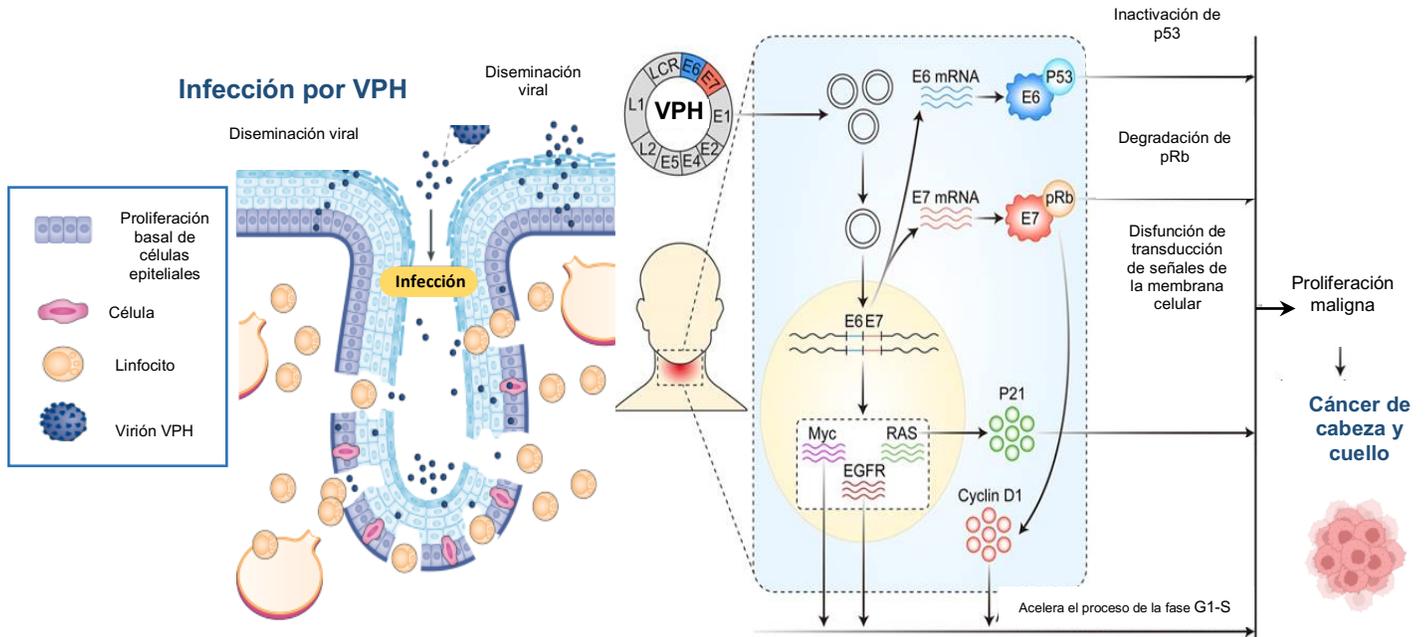


Figura 4. Mecanismo de la infección por VPH y carcinogénesis en cabeza y cuello. Durante la infección del VPH, la naturaleza reticulada y alterada del epitelio escamoso de las criptas amigdalinas permite el acceso viral a las células troncales, las células basales en proliferación y la membrana basal. En el caso de una infección productiva, se activan distintos genes y proteínas virales durante las diferentes etapas de diferenciación de las células epiteliales, que culminan en la producción y eliminación de nuevas partículas virales. El ADN del virus se integra en el genoma de la célula huésped y conduce a una expresión alterada de protooncogenes y genes supresores de tumores, una sobreexpresión de ARNm de E6 y E7, y la función alterada de diversas proteínas en la célula huésped. Esto, resulta en metabolismo celular descontrolado y proliferación maligna. Modificado de Yang (2019) y Johnson (2020).

1.3 Células troncales cancerosas

Las células troncales cancerosas (CTC) comprenden una subpoblación pequeña de células pluripotentes, latentes y de larga vida dentro de la masa tumoral, que se caracteriza por compartir capacidades similares a las de las células troncales, como autorrenovación, que se define como una división celular especial que permite que las células troncales produzcan otra célula troncal con el mismo potencial de replicación⁵⁸ y de esta manera obtienen la posibilidad de dar origen a células de

múltiples linajes con alta capacidad proliferativa⁵⁹⁻⁶³. Además, es importante mencionar que dentro de los tumores de cabeza y cuello, las poblaciones de células troncales cancerosas representan las células más resistentes a la terapia⁶⁴. Las CTC y las células troncales normales parecen compartir perfiles epigenéticos y de expresión génica similares, así como vías de señalización activadas, tales como Notch, Hedgehog y Wnt⁶⁵. Sin embargo, estas células exhiben diferencias en distintas propiedades las cuales se muestran en la siguiente tabla^{59,61,66,67} (Tabla 1) (Figura 5).

Tabla 1. Diferencias entre células troncales cancerosas y células troncales en tejido sano (Modificado de Rahman *et. al*, 2016 & Singh *et al*. 2021)

A. Características en común entre células troncales normales y células troncales cancerosas (Rahman <i>et. al</i>, 2016).	
Capacidad de dividirse asimétricamente (autorrenovación), lo que juega un papel importante en el desarrollo de la masa celular tumoral.	
Regulación de la autorrenovación por vías de señalización similares (Wnt, Sonic Hedgehog, MAPK y Notch).	
Capacidad para dar origen una jerarquía de derivados celulares que incluye células progenitoras y células en diferenciación.	
Telómeros alargados y aumento en la actividad de la telomerasa, lo que prolonga la vida celular.	
Estimulación de la angiogénesis a través de la secreción de factores angiopoyéticos.	
Expresión de receptores de superficie similares (CD133, integrina, c-kit, c-met), estos se identifican como marcadores de células troncales y además están asociados a metástasis.	
B. Propiedades de las células troncales cancerosas versus propiedades de las CTC	
Célula troncal normal	Célula troncal cancerosa
Capacidad de autorrenovación extensa pero limitada	Capacidad de autorrenovación extensa e indefinida
Capacidad organogénica	Capacidad tumorigénica
Diferenciación altamente reguladas	Alta desregulación en su diferenciación
Infrecuente o raro dentro en los tumores	Raras en tejidos adultos normales
Cariotipo normal	Cariotipo anormal
Capacidad para generar progenie normal con potencial proliferativo limitado	Progenie diversa fenotípicamente
Angiogénesis controlada	Aumento de la angiogénesis
Ausencia de invasión tisular y metástasis	Presencia de invasión tisular y metástasis
Equilibrio entre las señales de proliferación y de antiproliferación	Desequilibrio entre señales de proliferación y de antiproliferación
Ciclo celular regulado	Ciclo celular irregular
Reparación de daños al ADN inmediato	Reparación de daños al ADN retrasado o interrumpido

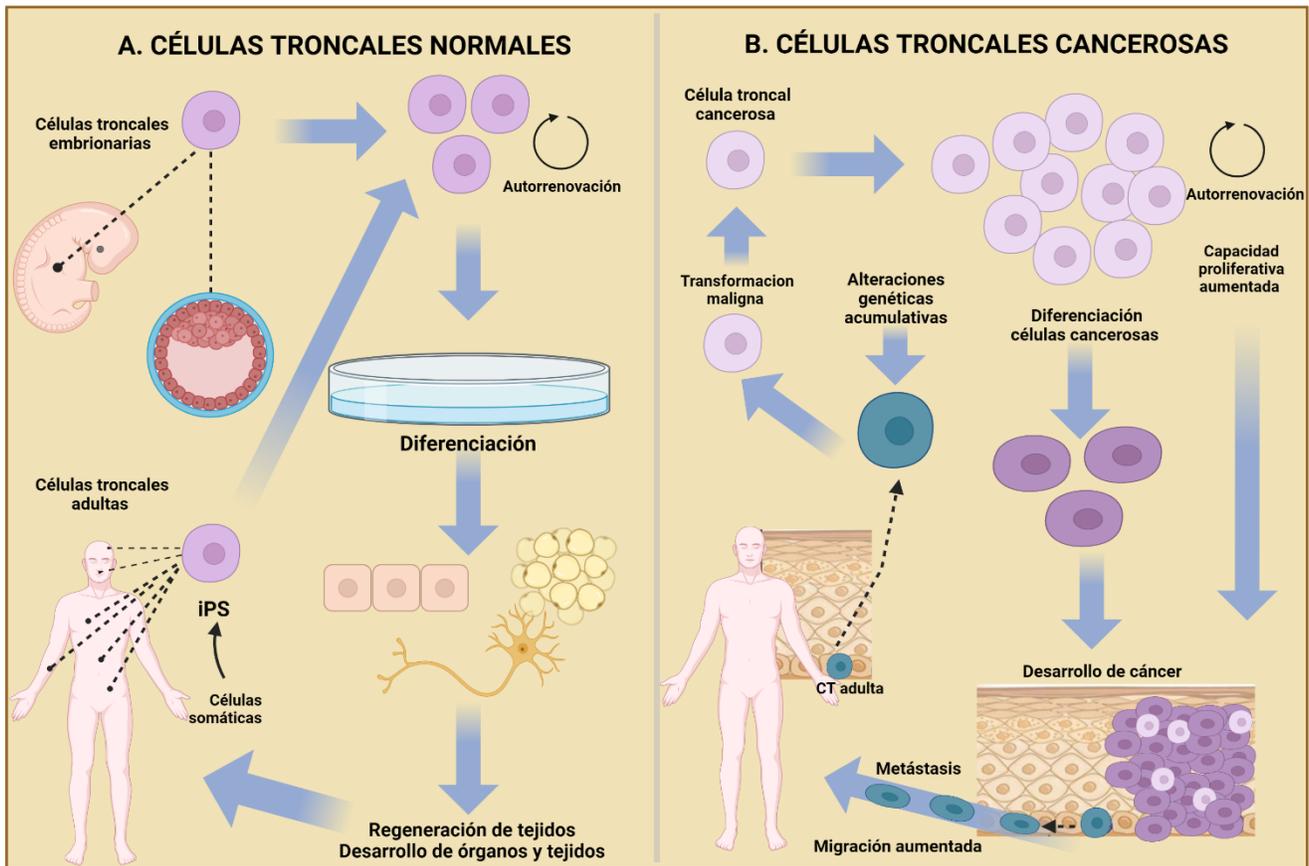


Figura 5. Diferencias entre células troncales normales y células troncales cancerosas. A. Se muestran las diferentes fuentes de células troncales normales, sus propiedades biológicas de división indefinida a través de la autorrenovación y la generación de células diferenciadas en condiciones apropiadas; mientras que las células troncales embrionarias son totipotentes, las células troncales adultas son unipotentes pero pueden recuperar sus propiedades totipotentes en condiciones in vitro, originando las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). **B.** Las células troncales epiteliales adultas pueden sufrir una transformación maligna después de alteraciones genéticas acumuladas causadas por carcinógenos, generando CTC que conservan las propiedades biológicas de autorrenovación y generación de células diferenciadas (cancerosas), lo que lleva al desarrollo del cáncer y a una mayor metástasis. Modificado de Oliveira *et al.* (2017). BioRender (2022).

En la década de los 2000 se comprobó que esta población estaba presente en algunos tumores sólidos⁶⁸. Antes de esto, se suponía que cada célula individual dentro de un tumor podía adquirir propiedades tumorigénicas a través de la acumulación progresiva de mutaciones, es decir, los tumores se inician y se desarrollan estocásticamente, esta hipótesis es conocida como estocástica. Por el contrario, la hipótesis de las células troncales cancerosas propone una organización jerárquica de las células dentro de un tumor con una población de CTC como vértice de la jerarquía⁶⁹ (Figura 6).

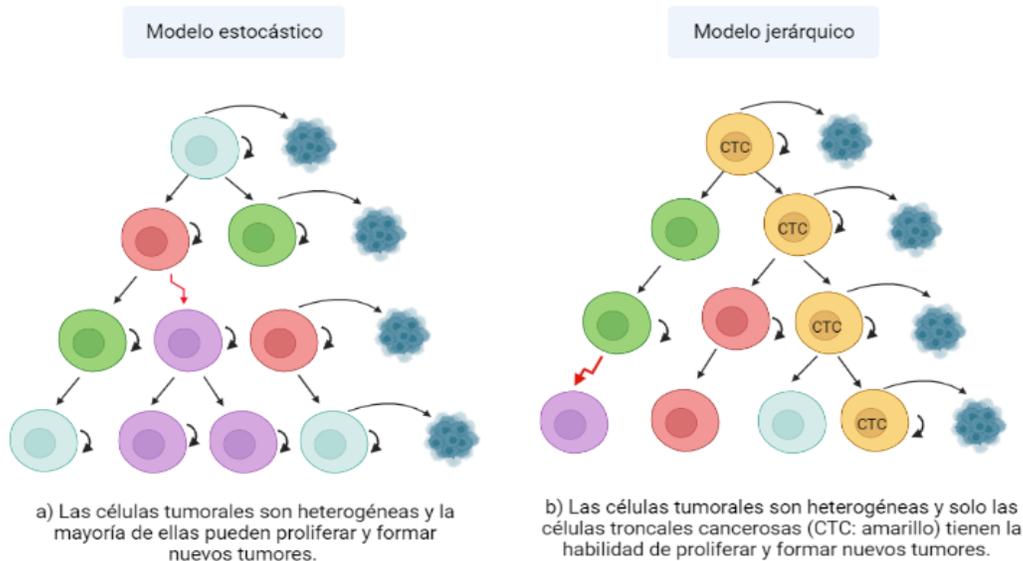


Figura 6. Modelo estocástico y modelo jerárquico. Modificado de Reya *et al.* (2001). BioRender (2022).

Otros modelos sugieren que las CTC contribuyen a la tumorigénesis, la diferenciación tumoral, el mantenimiento, la diseminación y recurrencia^{63,65,70–73}. El primer modelo sugiere que una célula troncal específica de algún tejido sufre varias alteraciones genéticas y epigenéticas para dar lugar a una CTC. Otra escuela de pensamiento afirma que las CTC se originan a partir de células troncales que pueden adquirir un fenotipo precanceroso durante la propia etapa de desarrollo. Y, por último, el tercer modelo, establece que las CTC se originan a partir de células tumorales maduras que sufren desdiferenciación en una célula troncal a través de modificaciones en las vías de señalización y en su regulación⁷⁴ (Figura 7).

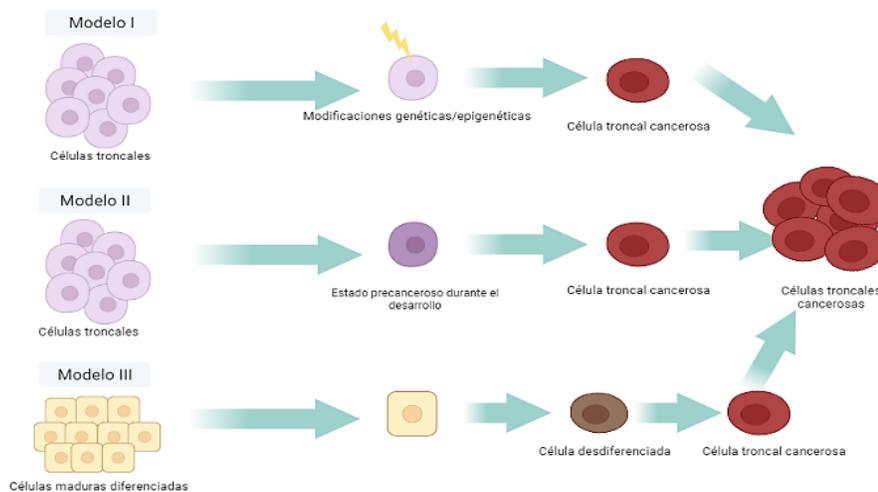


Figura 7. Origen de las células troncales cancerosas. Se esquematizan las tres teorías del origen de las CTC. El modelo I explica un origen directo de las CTC a partir de las células troncales normales a través de alteraciones genéticas, el segundo sugiere el origen de las CTC a partir de las células troncales normales en etapa de desarrollo. El modelo III, explica la desdiferenciación de la célula madura (células normales o tumorales) para convertirse en CTC. Modificado de Simple *et al.* (2015). BioRender (2022).

Las células troncales cancerosas pueden sufrir una división celular simétrica, lo que conduce a la producción de dos células hijas idénticas, sin embargo, también son capaces de sufrir una división celular asimétrica para expandir la población tumoral⁷⁵. En los últimos años, se demostró que las células malignas dentro de un tumor (no CTC) pueden adquirir propiedades de células troncales y transitar de no CTC a CTC “inducidas”. Esta plasticidad celular evidenciada experimentalmente puede ser una explicación y la causa de la heterogeneidad del tumor, un factor de resistencia importante que impide la respuesta a la terapia y conduce a un mal resultado del paciente⁶⁹. Se ha observado que CTC son capaces de crecer en condiciones independientes del anclaje. Cuando se cultivan en placas de fijación de ultra baja adherencia en medio sin suero, forman estructuras 3D no adherentes denominados esferoides tumorales, las cuales resultan de gran utilidad para la identificación de diversos marcadores en investigación⁷⁶. Debido a que el crecimiento de CCECC se mantiene mediante una población de CTC, sus mecanismos relacionados con la pluripotencia y oncogénesis han sido motivo de estudio, por lo que se ha sugerido el uso de algunos marcadores para comprender mejor los mecanismos involucrados en la carcinogénesis⁶⁶.

1.4 Marcadores de troncalidad

Los marcadores de troncalidad son moléculas que se utilizan para la identificación de células no especializadas e indiferenciadas y, en el caso de neoplasias malignas, de CTC. Generalmente son proteínas de la superficie celular con la capacidad de unirse selectivamente o activar otras moléculas de señalización o son factores de transcripción que mantienen las propiedades de pluripotencia y autorrenovación⁶⁴. Se han sugerido una serie de marcadores putativos en CTC en COCE. Hasta la fecha, no se ha demostrado que un único marcador identifique a esta población celular y es probable que las CTC se organicen en subconjuntos. Por esto, se utilizan diversas combinaciones de marcadores⁶³. Algunos de los marcadores de troncalidad en el estudio en la carcinogénesis son SOX2, OCT4 y NANOG⁶⁴. Estos, se consideran reguladores maestros para el mantenimiento de la población de células

troncales en estado indiferenciado⁶³. Además, se han identificado en tumores de diversos orígenes, incluyendo cánceres de cabeza y cuello, formando una red reguladora central que se coordina para determinar la autorrenovación y pluripotencia, a través de la interacción con otros factores de transcripción y diferentes vías de señalización celular^{60,61,64,66,77-79}, por lo que su sobreexpresión se ha utilizado para identificar poblaciones de CTC en CCE^{80,81} (Figura 8).

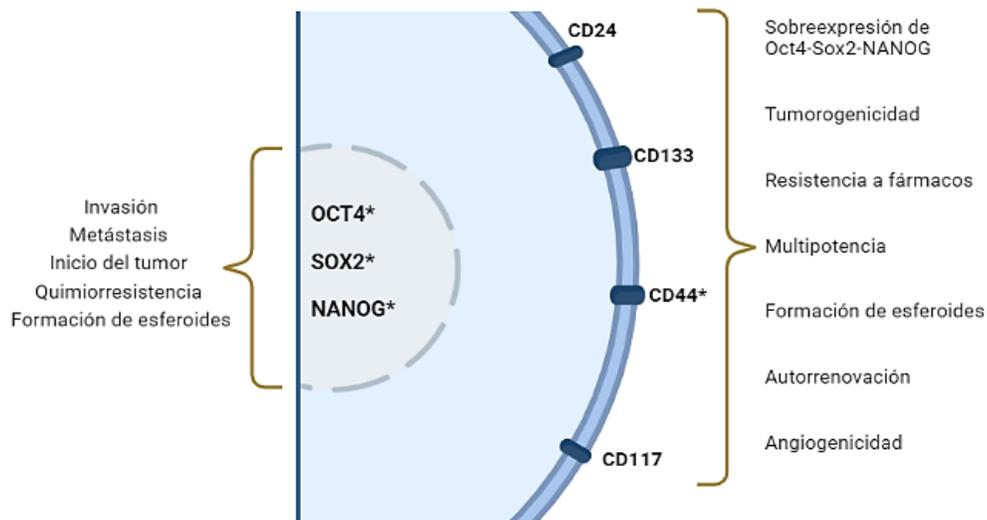


Figura 8. Marcadores moleculares utilizados para el aislamiento e identificación de células troncales de cáncer oral. El diagrama muestra los principales reguladores nucleares (OCT4, SOX2, NANOG) y marcadores de superficie (CD44, CD133, CD117, CD24). Modificado de Tahmasebi *et al* (2020). BioRender (2022).

1.4.1 OCT4

OCT4 es una proteína miembro de la familia de factores de transcripción del dominio POU^{63,71}. Se identificó por primera vez hace aproximadamente 30 años y ha sido estudiado ampliamente como un factor de transcripción de gran importancia. Pertenece a los factores de transcripción de Yamanaka, junto con SOX2, Krüppel-like factor 4 (KLF4) y c-MYC, los cuales han sido identificados como reguladores de la pluripotencialidad y autorrenovación de las células troncales⁸².

OCT4, controla el desarrollo de los embriones mamíferos y es indispensable para formación de las tres capas germinales, por lo tanto, su expresión no es detectable en

la mayoría de los tejidos adultos sanos^{82,83}. Es decir, específicamente OCT4 es responsable del mantenimiento de la autorrenovación, pluripotencia y el mantenimiento indiferenciado de las células troncales embrionarias^{82,84}.

Por otro lado, OCT4 también ha sido relacionado en la carcinogénesis, teniendo la capacidad de actuar como oncogén en distintos tipos de cáncer y se ha descrito su expresión en cáncer de mama, cérvix, ovario, próstata, testículo, gástrico y oral^{60,63,67,82}.

Específicamente en COCE, se ha reportado que tiene un papel importante en la transición epitelio-mesénquima, la transformación tumoral, invasión y metástasis y resistencia al tratamiento^{63,82,85}. Por lo tanto, su expresión se ha utilizado para definir la población de CTC en COCE junto con otros marcadores⁸⁶ y se ha visto que favorece la formación de tumores en modelos murinos y en células derivadas de tumores humanos de CCECyC en cultivo tridimensional^{60,63}. Se han descrito diferencias en la expresión de OCT4 con relación al sitio anatómico del tumor, por ejemplo, en tumores moderadamente diferenciados provenientes de la mucosa bucal se observó dentro de los nidos tumorales, del estroma peritumoral y los vasos dentro del estroma peritumoral, mientras que en CCE moderadamente diferenciado de lengua su expresión se vio restringida a una subpoblación de CTC dentro del estroma peritumoral⁶³. La eliminación de OCT4, da como resultado la inhibición de la formación de tumores, observándose una disminución en el crecimiento de esferoides tumorales⁶⁰.

Los niveles elevados de expresión de OCT4 en COCE han sido asociados con estadios tempranos de la enfermedad y un pronóstico más favorable^{63,87}. Qiao *et al.* reportaron sobreexpresión tanto en COCE, como en lesiones potencialmente malignas⁶⁰. Sin embargo, el mecanismo molecular que explica esta asociación no se ha dilucidado por completo⁶³.

Se ha descrito que la expresión de los oncogenes E6/E7 del VPH puede regular al alza OCT en CCE cervical, participando proceso de reprogramación celular⁸³. Por otro

lado, en un estudio que incluyó 69 casos de cavidad oral y orofaringe no se encontró significancia pronóstica en la expresión de OCT4⁷¹, por lo que resultaría relevante seguir estudiando sus función e interacción con el VPH en cáncer de cabeza y cuello.

1.4.2 NANOG

Descrito por primera vez en 2003, NANOG es un factor de transcripción de células troncales que tiene un papel importante en la regulación del desarrollo humano. Participa en la determinación del destino celular, la proliferación y la apoptosis y en células troncales embrionarias es crucial para mantener la pluripotencialidad^{66,71,88}. Después del nacimiento, se expresa en niveles muy bajos o se mantiene silenciado y permanece así durante toda la vida, sin embargo, NANOG puede ser detectado en las CTC⁸⁹, por lo que ha sido relacionado con tumorigénesis, pérdida de diferenciación, invasión y metástasis, así como resistencia al tratamiento^{60,64,73,89-92}.

Se ha visto que la expresión de esta proteína aumenta en pacientes con lesiones precancerosas con el riesgo de progresión a carcinoma *in situ*⁹³. Diferentes tipos de tumores malignos muestran niveles detectables de NANOG⁸⁸, incluyendo COCE y CCE faríngeo⁶⁴. Incluso, se ha considerado a NANOG como un fuerte predictor pronóstico en CCE orofaríngeo^{71,89}. Se sugiere que promueve la formación de CCE, actuando como un activador celular autónomo de la transición epitelio-mesénquima (TEM) en las células epiteliales⁶⁷.

En un metaanálisis sobre la importancia pronóstica de NANOG que incluyó nueve estudios sobre CCE de cabeza y cuello, la expresión de NANOG fue asociado con tasas de supervivencia más baja⁹⁴. Además, Grubelnik *et al.* sugieren que la expresión de NANOG aumenta en CCE y tiene una importante asociación con el desarrollo, la transformación y la metástasis de tumores⁸⁹.

En contraste con esto, Pedregal *et al.* asociaron la expresión NANOG con un mejor pronóstico en su estudio de cohorte, con variaciones significativas en el impacto pronóstico de la expresión, dependiendo del sitio del tumor y la infiltración de los ganglios linfáticos, en donde hubo una mayor expresión en pacientes con metástasis en ganglios linfáticos⁶⁴. Debido a las diferencias planteadas en los resultados de diversos autores, sería de gran importancia analizar la expresión y la función de NANOG en CCE oral e hipofaríngeo.

1.4.3 SOX2

SOX2 se describió en 1990, un factor de transcripción ubicado en el gen SRY (por sus siglas en inglés “*sex-determining region Y*”)⁹⁵. Hasta la fecha, se han encontrado 20 genes SOX en el genoma humano, los cuales se han dividido en ocho subgrupos dependiendo de sus propiedades bioquímicas y sus funciones⁹⁶. SOX2 es miembro del subgrupo SOXB1, junto con SOX1 y SOX3⁹⁷, el gen SOX2 humano codifica una proteína de 317 aminoácidos y se ha visto que resulta esencial para la autorrenovación en células troncales, por lo que se expresa en el desarrollo embrionario temprano⁹⁷. SOX2 se expresa generalmente en células pluripotentes de la masa celular interna de embriones⁹⁵ y se ha reconocido por su papel en la reprogramación de células somáticas en células troncales pluripotentes inducidas (iPSC)⁵⁷. Este factor de transcripción participa en el control de los procesos de desarrollo de linajes celulares de origen ectodérmico y endodérmico⁹⁵.

La desregulación de la expresión de SOX2 también es un factor importante que contribuye a la patogénesis del cáncer. Se ha visto una sobreexpresión desregulada de SOX2 se ha implicado en la patogenia de los carcinomas escamosos⁹⁶. SOX2 controla varias características de las células cancerosas, como la proliferación, la transición epitelial a mesenquimatosa (TEM), la migración, la invasión, la metástasis, la formación de esferoides y colonias, la iniciación de tumores, la formación de células troncales cancerosas, así como la resistencia a la apoptosis y la terapia^{63,97,98}. En cabeza y cuello, se ha visto una contribución parcial de SOX2 como regulador de

expresión de la proteína NANOG⁶⁴. A través de una interacción cooperativa, SOX2 y OCT4 impulsan la expresión específica de diferentes genes⁶⁴.

La alta expresión de SOX2 ha sido asociado con un mal pronóstico en algunos estudios, como en cáncer de mama, esfóago, nasofarínge y cavidad oral^{97,99,100}. En contraste, otros autores han informado que una alta expresión de este marcador, por ejemplo se ha asociado con la ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos y un mejor pronóstico en pacientes con COCE⁶⁴. Además, SOX2 se ha encontrado asociado a tumores VPH positivos⁷¹. En cáncer de cabeza y cuello se ha relacionado con mantenimiento de CTC, potencial tumorigénico mejorado, evasión de la apoptosis y resistencia a la terapia. SOX2 ahora se considera un impulsor clave de la carcinogénesis escamosa⁹⁶.

La expresión de SOX2 en cáncer se ha asociado también con la expresión de CD44 y se ha correlacionado con metástasis de COCE⁹². Se han reportado distintos patrones de expresión de SOX2 en CTC de COCE, mostrando tanto localización nuclear como citoplasmática⁶². Por lo que su estudio sigue siendo necesario en los diferentes tipos de tumores.

1.4.4 Otros marcadores de troncalidad

El panel de biomarcadores de troncalidad es vasto. La literatura describe una gran variedad de proteínas utilizadas como marcadores de células troncales, entre las cuales se encuentran: CD133, CD29, CD166, CD44, BMI1, entre otros. Por ejemplo, CD44, ha sido descrito como un marcador útil en el reconocimiento, aislamiento y caracterización de las CTC, sin embargo, estudios recientes muestran que no es específico de células troncales^{60,101} ya que también está expresada en otros tipos de células, como las de tejidos conectivos y la médula ósea¹⁰². La correlación entre la expresión de CD44 y las CTC fue descrita por primera vez por Prince *et al.*⁶⁹ y se ha reportado su sobreexpresión de CD44 en tumores como mama, páncreas, estómago y próstata¹⁰¹.

1.5 Marcadores asociados a la unión escamocolumnar

Estudios recientes han obtenido un panel de biomarcadores localizados en células de la unión escamocolumnar (células localizadas entre las células del endocérvix y el exocérvix) en neoplasias intraepiteliales grado 3 de cérvix, los cuales podrían explicar la relación de la presencia del VPH y el comportamiento del tumor, en donde se incluyen: AGR-2 (proteína de gradiente anterior 2), CD63 y citoqueratina 7 (CK-7)^{44,103}.

1.5.1 Citoqueratina 7

Las citoqueratinas (CKs) pertenecen a un grupo de aproximadamente 20 proteínas estructurales del citoesqueleto presentes en epitelios. Específicamente, la CK7, es una queratina de tipo II que se encuentra en epitelios de transición, ductales y glandulares (pulmón, mama, páncreas, endometrio, ovario, glándulas salivales)¹⁰⁴. Se le ha descrito como un marcador del epitelio simple y cilíndrico y, por ello, se piensa que pertenece al tejido derivado del endodermo¹⁰⁵. Se ha sugerido que no se localiza en las células del epitelio escamoso estratificado normal, sin embargo, sí parece expresarse específicamente en sitios de unión y de transición¹⁰⁶. Se ha descrito su presencia, en la unión escamo-celular de cérvix, el sitio más frecuente de las células troncales de la mayoría de los CCE de cérvix⁴⁴.

En cabeza y cuello, CK7 parece expresarse también en sitios de unión, como la cripta amigdalina, el cual representa un sitio susceptible a la transformación maligna^{54,105,107,108}. Se considera que en la cripta amigdalina es el lugar donde se inicia la integración del VPH¹⁰⁹. Es posible que exista una pequeña subpoblación de células que expresan CK7 en otras partes del tumor que actúan como CTC, en donde la expresión de CK7 que se pierde conforme las células se diferencian¹¹⁰.

Se sabe poco sobre los roles que desempeñan CK7 en la patogenia del CCE relacionado con VPH. Sin embargo, algunos estudios han analizado las interacciones

entre el ARNm de E7 de HPV16 y CK7 en líneas celulares de cáncer de cuello uterino y en CCE orofaríngeos primarios⁴⁴. Se descubrió que CK7, junto con otras proteínas como p16, estaban directamente reguladas por la oncoproteína viral E7 del VPH-16¹⁰⁵.

Algunos CCE de cabeza y cuello y de cérvix comparten características histopatológicas e inmunohistoquímicas. Ambos surgen en células de unión escamocolumnar positivas para CK7 infectadas por VPH⁵⁴.

1.5.2 CD63

CD63 es una glicoproteína de superficie celular de la familia de las tetraspaninas y fue la primera tetraspanina caracterizada¹¹¹. CD63 se expresa en casi todos los tipos de células y tejidos y se encuentra no solo en la membrana citoplasmática, sino también en endosomas tardíos, lisosomas y cuerpos multivesiculares¹¹². Cuando las tetraspaninas se asocian con otras proteínas, forman complejos supramoleculares en la superficie celular y logran desencadenar vías de transducción de señales involucradas en procesos celulares básicos, como proliferación celular, migración, adhesión, diferenciación, motilidad e incluso invasión tumoral^{112,113}.

Al estar presente en lisosomas y endosomas tardíos, CD63 tiene un papel específico en la infección de células epiteliales con varios papilomavirus¹¹⁴, ya que el VPH es capaz de ingresar en las células huésped a través de una vía endocítica¹¹¹. CD63 proporciona un vínculo físico crítico entre las partículas virales internalizadas y la maquinaria endocítica intracelular mediante el complejo formado con sintetina-1¹¹¹. Se ha propuesto que la sintetina-1 tiene un papel central en la regulación en la infección por VPH¹¹¹. Además, se han encontrado diferentes tipos de VPH (dentro de ellos, VPH16) en colocación con CD63, en la membrana plasmática y en vesículas¹¹⁵. Adicionalmente, CD63 se ha implicado en las vías de señalización metastásica en varios tipos de cáncer, como cáncer de pulmón, próstata, mama, páncreas y melanoma¹¹⁶. Se ha reportado que la expresión de CD63 generalmente disminuye en las últimas etapas del desarrollo del cáncer, lo que se correlaciona con

un aumento de metástasis de las células tumorales^{55,114}. Esto debido a que CD63 participa en la motilidad celular y podría asociarse con integrinas, las cuales median la unión a la matriz extracelular. Se ha planteado la posibilidad es que CD63 influya en la actividad y estabilidad de las integrinas a través de su interacción con otras tetraspaninas en la transición epitelio-mesénquima y también ha sido implicada en la regulación del transporte de otras proteínas implicadas en el desarrollo de tumores^{55,116}.

1.5.3 AGR-2

El homólogo de gradiente anterior 2 (AGR2) codifica una proteína de 17 kDa que está muy conservada en los vertebrados. *AGR2* se describió por primera vez en *Xenopus laevis*¹¹⁷. *AGR-2* es una proteína disulfuro isomerasa, presenta una fuerte expresión en tejidos que contienen células secretoras, como tráquea, pulmón, estómago, colon, próstata e intestino delgado. *AGR2* muestra dos localizaciones subcelulares: intracelular (iAGR2) y extracelular (eAGR2), en donde tiene un papel regulador de la arquitectura del tejido epitelial y juega un papel en el fenotipo preneoplásico que contribuye a la tumorigenicidad epitelial¹¹⁸.

En células normales que expresan *AGR-2*, la forma predominante es iAGR-2, que reside en el retículo endoplásmico. Mientras que, las células cancerosas secretan y expresan eAGR2 en la superficie celular¹¹⁹. Fessart *et. al* reportaron que eAGR2 presente en la matriz extracelular es suficiente, por sí misma, para impedir la polarización celular, promoviendo un fenotipo desorganizado con propiedades invasivas¹¹⁸.

Además, esta proteína es capaz de regular el crecimiento de las células mediante la modulación de Ciclina D. *AGR2* es un supresor de P53 y promueve la metástasis del cáncer, por lo que su sobreexpresión se ha relacionado con un pronóstico negativo en los pacientes. Si-Rui *et. al* ha sugerido que *AGR2* puede actuar como un oncogén en células cancerosas humanas, en su estudio *AGR2* mostró alta expresión de este

marcador en citoplasma y membrana de células de CCECC lo que sugiere una correlación con el fenotipo agresivo tumoral⁷².

Estudios han demostrado que una expresión anormal de AGR2 podría estar relacionada con la tumorigénesis y progresión de cánceres humanos como cáncer de mama, ovario, próstata, esófago, tracto gastrointestinal y pulmón. En cabeza y cuello, se ha visto que el aumento en la expresión de AGR2 mejora la capacidad migratoria de las células en de COCE *in vitro* e *in vivo*¹²⁰.

Asimismo, se ha sugerido que AGR-2 podría ser una molécula secretora, ya que se han encontrado concentraciones de esta proteína significativamente elevadas en muestras de suero o plasma de pacientes con las neoplasias mencionadas anteriormente¹²¹. Por ejemplo, Herfs *et. al*, refieren que AGR-2 se ha encontrado sobreexpresada en las células de unión de epitelio escamocolumnar en cérvix^{44,109}. Sin embargo, resultaría relevante estudiar su presencia junto con los otros marcadores descritos anteriormente en este trabajo tanto en líneas VPH⁺ como negativas.

1.6 Cultivo celular tridimensional como modelo de estudio en CCECC

El cultivo celular de esferoides tridimensional es una herramienta relevante en el campo de estudio del cáncer¹²²⁻¹²⁴. Este tipo de modelos, presenta ciertas ventajas en comparación con los cultivos tradicionales como el cultivo en monocapa, ya que permite reproducir *in vivo* de manera más acercada a la realidad, las interacciones, tanto intercelulares como célula-matriz de líneas celulares cancerígenas^{122,125}.

El modelo tridimensional permite evaluar diversos procesos como la proliferación celular, la diferenciación, apoptosis y la expresión diversas moléculas. Esto, debido a que es posible imitar el microambiente tumoral y su heterogeneidad, reproduciendo propiedades biológicas propias de una neoplasia, como la invasión o la metástasis, así como la conservación de la migración y la subdiferenciación^{29,126,127}. Además, el

modelo tridimensional muestra otras características, como la distribución irregular de oxígeno y nutrientes que se encuentran en las células tumorales *in vivo*^{128,129}.

Los esferoides están compuestos por una capa externa de células en proliferación, una capa interna de células inactivas, y un núcleo interno de células necróticas (Figura 9). Esta disposición refleja el crecimiento en tumores sólidos, con presencia de células en proliferación cercanas al suministro de oxígeno y nutrientes y las células necróticas alejadas de capilares, por lo tanto, existe un gradiente de suministro de oxígeno y nutrición desde la superficie exterior hacia el núcleo^{29,123,125}. La hipoxia constante en el núcleo conduce a la glucólisis y síntesis de CO₂, piruvato y lactato, lo que resulta en una acidificación del medio. Las células tienen que adaptarse a este entorno para poder crecer^{125,130}.

Adicionalmente, se ha observado que las células de CCE de cabeza y cuello en cultivo, muestran una amplia similitud genética, citogenética y molecular a las células de tumores primarios¹²⁵. Se ha reportado que el cultivo tridimensional de células cancerosas conduce a la adquisición de un fenotipo similar a una célula troncal con una mayor expresión de nestina, CD44 y CD133. Así mismo, las células troncales cancerosas presentan un crecimiento más rápido en condiciones de cultivo. La formación de esferoides se utiliza comúnmente para enriquecer y cuantificar la población de este tipo células de células troncales con diversos fines de investigación¹³⁰.

A pesar de su extendido uso en diversos modelos de cáncer, la generación de esferoides en tercera dimensión se ha descrito en pocas líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas moderadamente y poco diferenciado¹²⁹. El factor limitante para el uso de esferoides, radica en la dificultad de establecer líneas celulares que puedan asociarse en grupos, formando esferoides de tamaño apropiado y sin agregados celulares. Aunque tanto, células normales como células neoplásicas pueden agregarse, solo ciertas células tumorales logran crecer como esferoides¹²⁷.

La concentración celular para la formación de esferoides dependerá de cada línea celular. En cáncer oral, Sievers *et al.*, lograron obtener un modelo de cultivo de la línea celular proveniente de CCE oral altamente diferenciado, en el cual tras sembrar 5,000 células por pocillo obtuvieron esferoide compacto, mientras que la adición de 10,000 o 15,000 células a cada placa de pocillos llevó a la formación de pequeños agregados de células, en lugar de un esferoide compacto. Así mismo, tras el tercer y cuarto día del cultivo, los esferoides alcanzaron entre 50 y 100 μm de diámetro, lo que coincide con lo reportado para el tamaño estándar de esferoides en el estudio de biomarcadores de cáncer de cabeza y cuello¹³¹.

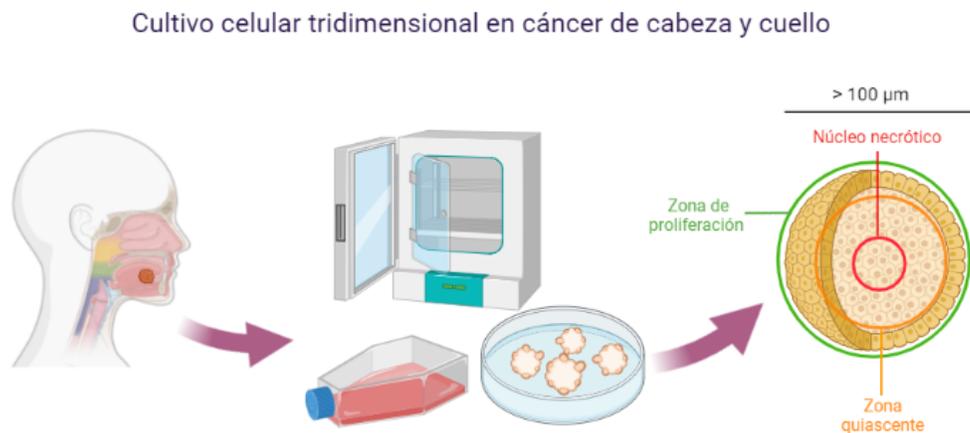


Figura 9. Cultivo celular en 3D en cabeza y cuello. Mediante cultivo celular se obtienen esferoides para investigación, los cuales están compuestos por una capa externa de células en proliferación, una capa interna de células inactivas o quiescentes, y un núcleo interno de células necróticas. BioRender (2022).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque la reinfección por VPH es necesaria para el desarrollo de lesiones intraepiteliales, el mecanismo inicial de este proceso se desconoce. Un dato interesante que pudiera explicar esto, es la expresión de proteínas que se observan en la unión escamocolumnar AGR-2, CD63 y CK-7, de las cuales su expresión ha sido reportada en lesiones intraepiteliales de cérvix, y se observa una relación entre su expresión y la presencia VPH16 de alto riesgo, sugiriendo que estas proteínas podrían ser un marcador del desarrollo de la carcinogénesis.

La presencia de marcadores de células troncales cancerosas ha sido investigada en tumores de cabeza y cuello. Si bien ya se ha reportado la presencia de células troncales en tumores de cavidad oral, aún no se describe la asociación de estos marcadores y los descritos con anterioridad localizados en la unión escamocolumnar de cérvix. Por ello, es necesario caracterizar la presencia de estos marcadores, determinar su expresión en líneas positivas y negativas a VPH, determinar si existe diferencia en la expresión de estas proteínas de expresión embrionaria y de troncalidad. Lo anterior con la finalidad de contar con mejores herramientas de diagnóstico, pronóstico y posibles blancos terapéuticos que permitan mejorar los tratamientos de pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

3. HIPÓTESIS

Las líneas celulares de carcinoma escamoso de cavidad oral e hipofaringe SCC25, SCC090, FaDu y SCC152, serán positivas a marcadores como CD44, NANOG, SOX2, OCT4 y a marcadores de la unión escamocolumnar descritos en cérvix, tales como AGR-2, CD63 y CK-7, expresando diferencialmente estas proteínas en las líneas VPH⁻ y VPH⁺, así mismo las líneas VPH⁺ serán transcripcionalmente activas para el transcrito de E6 de VPH tipo 16.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Identificar la expresión marcadores de troncalidad (NANOG, SOX2, OCT4) y de unión escamocolumnar (AGR-2, CD63 y CK-7) en cultivos obtenidos a partir de líneas celulares establecidas de carcinoma de células escamosas de lengua e hipofaringe VPH⁻ y VPH⁺ (SCC090, SCC25, SCC152 y FaDu), y determinar la expresión de E6.

4.2 Objetivos específicos.

- Obtener cultivos de esferoides enriquecidos en células troncales cancerosas de las líneas celulares SCC090, SCC25, SCC152 y FaDu.
- Caracterizar la presencia de las proteínas NANOG, SOX2, OCT4, CK-7, AGR-2, CD63 en cultivos de esferoides.
- Identificar en las líneas celulares SCC152 y SCC090 expresión de los transcritos de E6 de VPH16 presentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Líneas celulares

Línea celular SCC25 (CRL-1628™), FaDu (HTB-43™), SCC152 (CRL- 3240™) , SCC090 (CRL- 3239™) obtenidas de ATCC® (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

5.1.2 Reactivos

Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) y Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), medio Eagle's minimum essential medium (EMEM), suero fetal bovino (SFB), sustituto de suero, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), glutamina, tripsina-EDTA, diaminobenzidina (Invitrogen, Carlsbad CA); PBS 1X (0.14 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 0.1% (w/v) pH 7.3) (Gibco, Thermo Fisher Scientific); Kit de inmunohistoquímica Ventana (Roche, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA); hematoxilina y eosina, anticuerpos anti-CD44 (bioLegend) , NANOG, SOX2, OCT4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), CK-7, CD63 y AGR-2 (AbCam).

5.1.3 Materiales

Placas de 100 mm x 20 mm (Corning Incorporated ®, Corning, NY, USA), adherentes y de baja adherencia, tubos clínicos de 15 mL, puntas para micropipeta (1000, 100, 10 µL), tubos eppendorf (1.5 y 0.5 mL); laminillas y cubreobjetos (Merck Millipore KGaA, Darmstadt, Alemania).

5.1.4 Equipo

Micropipetas Unicanal (0.5-10, 0.5-2, 10-100, 100-1000 mL) (Olab); Prepipeta (Termifisher scientific); balanza analítica 120g-0.001g/PW124) (Clay Adam); pHmetro (Hanna); Agitador orbital, campana de flujo laminar (Biobase); incubadora (New Brunswick), plancha para desparafinar (Cimarec, Thermo Fisher Scientific), microscopio óptico (Carl Zeiss).

5.2 Metodología

5.2.1 Cultivos celulares. Cultivos en monocapa. Se emplearon las líneas celulares humanas procedentes de cáncer escamoso de lengua SCC25 (VPH⁻) y SCC090 (VPH⁺) e hipofaringe FaDu (VPH⁻), SCC152 (VPH⁺) obtenidas de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). Utilizando placas de 100 mm x 20 mm, que permiten la adhesión de las células a la superficie (Corning Incorporated®, Corning, NY, USA), las líneas celulares SCC090 y FaDu se cultivaron con medio Eagle's minimum essential medium (EMEM), mientras que la línea celular SCC152 con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y la línea SCC25 con Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), suplementados con 10% de suero bovino fetal incubando a 37°C y 5% de CO₂. Los cultivos en estas condiciones se denominan cultivos en monocapa.

Nota: La línea SCC090 se reporta de origen tumoral metastásico del mismo paciente donde se obtuvo la línea SCC152 la cual se reportó que se obtuvo de un tumor recurrente. Ambas líneas son VPH16⁺.

5.2.2 Cultivos en esferoides. A partir de los cultivos en monocapa de cada línea celular confluentes en un 75% se obtuvo una suspensión de células en PBS. Se colocaron concentraciones crecientes de células medio en placas de 100mm de diámetro para permitir la adherencia de las células y se mantuvo con Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12), suplementado con factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), y reemplazo de suero (Gibco™ Sustituto de suero KnockOut™, Thermo Fisher Scientific). Se incubó a 37°C y un 5% de CO₂. Se sembraron a diversas concentraciones de cel/mL (3, 4, 6, 8, 10 x10³ células/mL) para determinar qué concentración favorecía la eficiencia de formación de

esferoides a los días del día 1 al 9. Se realizó el conteo de esferoides por campo, tomando en cuenta la presencia de esferoides mayores a 50 μm en tres campos diferentes. La eficiencia en la formación de esferoides resulta de importancia debido a que, es necesario, una vez obtenidas estas estructuras sean abundantes para ser fijadas y obtener cortes con número adecuado de estructuras esferoidales para la posterior tinción de las proteínas de interés en este estudio.

5.2.3 Tinción Hematoxilina & Eosina (H&E). Para observar la disposición y características celulares de los esferoides, las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 2%. Terminado el tratamiento se realizaron tres lavados con PBS 1X. Posteriormente, se colocaron en una matriz de agar al 1% para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm y se tiñeron con H&E. Las laminillas se montaron con Entellan® para ser observadas al microscopio.

5.2.4 Identificación de los marcadores. Mediante inmunohistoquímica se identificaron los marcadores de troncalidad y de unión escamocolumnar en los esferoides. De los cultivos celulares se obtuvieron suspensiones de células individuales, las cuales se fijaron con PFA al 2% y se colocaron en una matriz de soporte para ser embebidas en parafina. Se realizaron los cortes y se incubaron las laminillas con anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas utilizando el kit de inmunohistoquímica Ventana (Roche, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA): anti-NANOG, anti-SOX2, anti-OCT4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-CK-7, anti-CD63 y anti-AGR-2 (AbCam). Las diluciones utilizadas fueron las siguientes: 1:50; CK-7, 1:1000; CD63 y AGR-2, 1:200; NANOG, Sox2, OCT4.

5.2.5 Expresión del transcrito de E6. De las líneas celulares se extrajo ADN y se cuantificó empleando NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific), 150 ng fueron utilizados para realizar PCR para la región E6 empleando oligonucleótidos específicos para observar la expresión de este oncogén (5'GCAACAGTTACTGCGACGTG3' /

5'GGACACAGTGGCTTTTGACA 3). Se utilizó ADN de células SiHa como control y posteriormente se realizó secuenciación por SANGER.

5.2.6 Análisis de datos. Los experimentos se analizaron utilizando el programa GraphPad. Se obtuvo el promedio de tres experimentos y se comparó con el control en cada caso. Los datos presentados corresponden a la media \pm error estándar del número de observaciones. Posteriormente se realizó un análisis estadístico ANOVA. Las diferencias entre las medias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Esferoides de las líneas SCC090, SCC152 (VPH⁺) y SCC25, FaDu (VPH⁻)

Para poder determinar la concentración de células ideal para la formación de esferoides de líneas celulares de CCE de cabeza y cuello fue indispensable tomar en cuenta las características de crecimiento de cada una de las líneas. Los datos mostraron que estas líneas celulares en cultivos monocapa lograron homogeneidad, estabilidad y viabilidad.

En los ensayos realizados, bajo las condiciones de cultivo en suspensión previamente descritas, las cuatro líneas celulares formaron estructuras esféricas entre las 24 y 48 horas, mostrando variación en cuanto a la longitud y eficiencia en el número de esferoides según la condición del ensayo.

Para la línea celular de COCE proveniente de lengua (SCC090/VPH⁺) el análisis de medición y conteo de esferoides indicó que la concentración de 4×10^3 células/mL en el tercer y cuarto día de cultivo reunió las condiciones adecuadas para identificar las proteínas de nuestro interés, originando estructuras más homogéneas, con menor presencia de agregados celulares a comparación de concentraciones mayores y obteniendo una longitud de promedio de 107 μm (Figura 10A, 10B). Durante los ensayos

de formación de esferoides mostró un promedio de 2 por campo entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 10C).

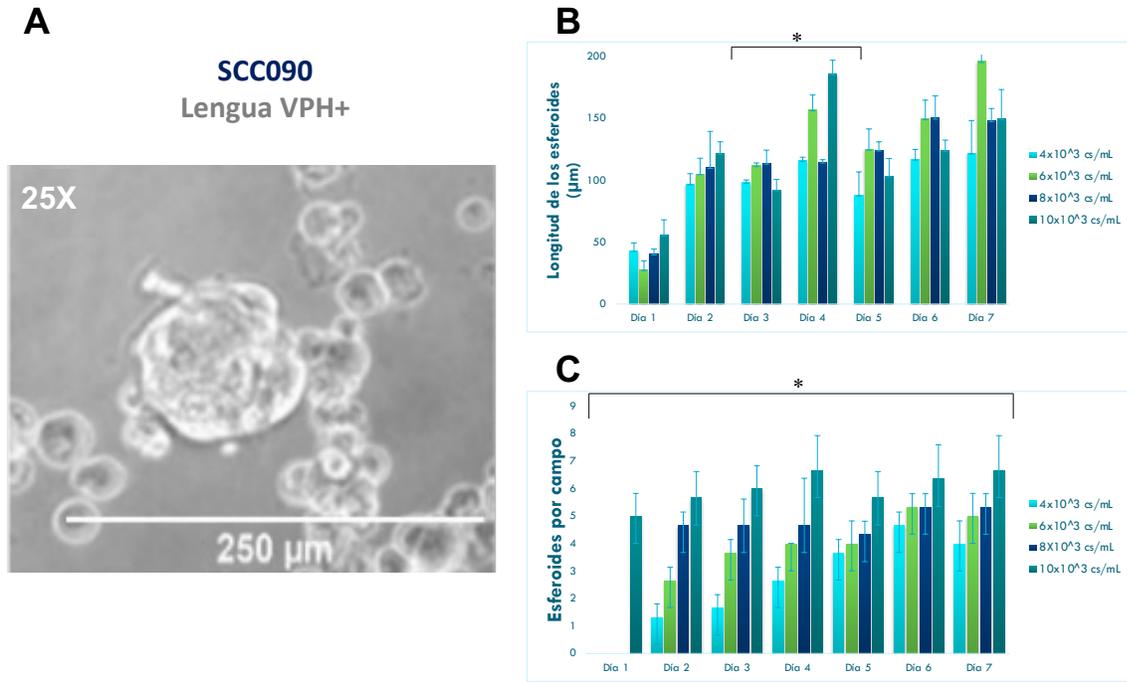


Figura 10. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC090 (lengua, VPH⁺). **A.** Microfotografía representativa (25X) de la formación de esferoides de la línea celular SCC090 proveniente de carcinoma de células escamosas de lengua a una concentración de 4×10^3 células/mL al tercer día. **B.** Longitud en μm de los esferoides durante 7 días a diferentes concentraciones celulares. **C.** Número de esferas por campo sembradas a diferentes concentraciones durante 7 días ($> 50 \mu\text{m}$) a diferentes concentraciones celulares. Los asteriscos indican las diferencias significativas ($*p < 0.05$) determinadas por la prueba de ANOVA. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos son presentados como la media \pm DE ($n=3$).

Los ensayos en la línea celular de CCE proveniente de hipofaringe (SCC152/VPH⁺) mostraron un comportamiento similar al de la línea SCC090. De la misma manera, SCC152 mostró estructuras compactas, homogéneas y con un menor número de agregados bajo la condición de 4×10^3 células/mL entre el tercer y cuarto día de cultivo, formando esferoides con un promedio de $92 \mu\text{m}$ de longitud (Figura 11A, 11B). Respecto al número de esferoides por campo, entre el tercer y cuarto día, se obtuvo un promedio de 6 esferas por campo, más del doble de los esferoides formados bajo las mismas condiciones de la línea celular de lengua VPH⁺ SCC090 (Figura 11C).

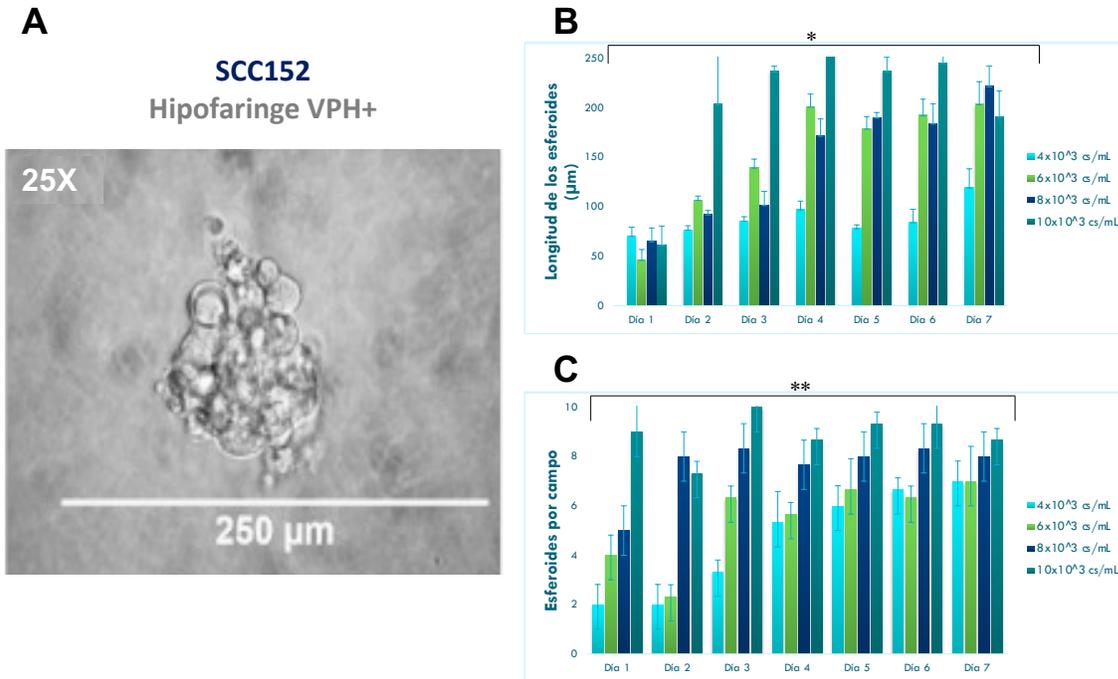


Figura 11. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC152 (hipofaringe, VPH⁺). **A.** Microfotografía representativa (25X) de la formación de esferoides de la línea celular SCC152 proveniente de carcinoma de células escamosas de hipofaringe a una concentración de 4×10^3 células/mL al tercer día. **B.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando en cuenta el diámetro. **C.** Número de esferas por campo sembradas a diferentes concentraciones durante 7 días ($> 50 \mu\text{m}$). Los asteriscos indican las diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$) determinadas por la prueba de ANOVA. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos son presentados como la media \pm DE ($n=3$).

La línea celular SCC25 derivada de COCE de lengua (VPH⁻), mostró mejores condiciones de crecimiento a una concentración de 4×10^3 células /mL, encontrando estructuras compactas y homogéneas (Figura 12A), con un promedio de $86 \mu\text{m}$ entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 12B) . Se obtuvo un promedio de 29 esferoides por campo entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 12C).

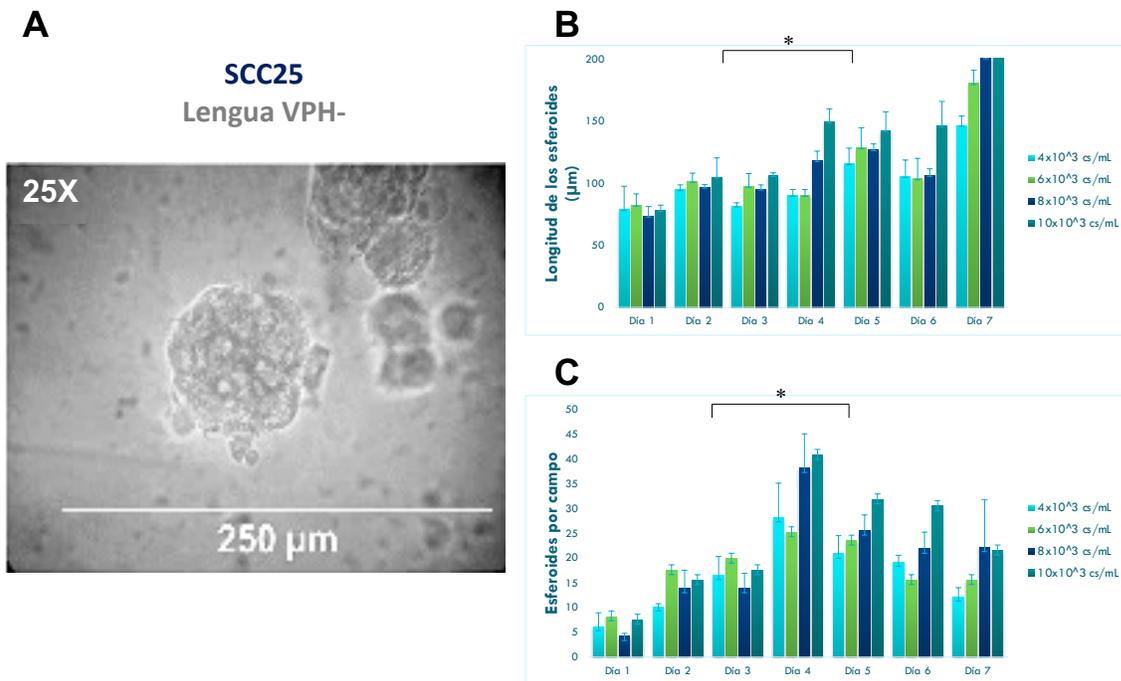


Figura 12. Crecimiento de esferoides de la línea celular SCC25 (lengua, VPH). **A.** Microfotografía representativa (25X) de la formación de esferoides de la línea celular SCC25 proveniente de carcinoma de células escamosas de lengua a una concentración de 4×10^3 células/mL al tercer día. **B.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando en cuenta el diámetro. **C.** Número de esferas por campo sembradas a diferentes concentraciones durante 7 días ($> 50 \mu\text{m}$). Los asteriscos indican las diferencias significativas ($*p < 0.05$) determinadas por la prueba de ANOVA. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos son presentados como la media \pm DE ($n=3$).

A diferencia de las líneas descritas anteriormente, la línea celular de CCE de hipofaringe FaDu (VPH-) mostró un eficiente crecimiento clonal y esferoides de tamaño más homogéneo a una concentración más alta: 6×10^3 células/mL, entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 13A), dando origen a estructuras con una longitud promedio de $96 \mu\text{m}$ (Figura 13B) y una media de 19 esferas por campo entre el tercer y cuarto día de cultivo (Figura 13C).

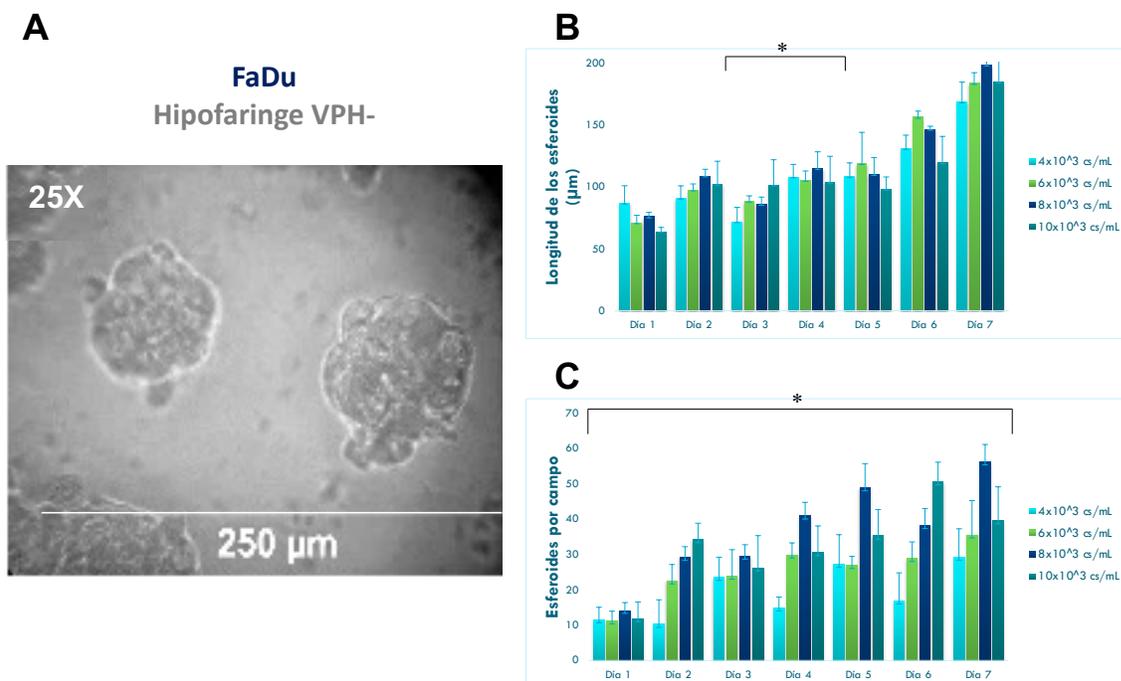


Figura 13. Crecimiento de esferoides de la línea celular FaDu (hipofaringe, VPH). **A.** Microfotografía representativa (25X) de la formación de esferoides de la línea celular FaDu proveniente de carcinoma de células escamosas de hipofaringe a una concentración de 4×10^3 células/mL al tercer día. **B.** El tamaño de las esferas fue determinado usando el programa ImageJ y tomando en cuenta el diámetro. **C.** Número de esferas por campo sembradas a diferentes concentraciones durante 7 días ($> 50 \mu\text{m}$). Los asteriscos indican las diferencias significativas ($*p < 0.05$) determinadas por la prueba de ANOVA. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos son presentados como la media \pm DE ($n=3$).

La tabla 2 muestra un resumen del comportamiento de las cuatro líneas celulares utilizadas en este estudio y las características correspondientes a su estandarización en la formación de esferoides.

Línea celular	Origen	VPH	Concentración (células/mililitro)	Longitud promedio (μm)*	Esferoides por campo*
SCC090	Lengua	Positivo	4×10^3	107	2
SCC152	Hipofaringe	Positivo	4×10^3	92	6
SCC25	Lengua	Negativo	4×10^3	86	29
FaDu	Hipofaringe	Negativo	6×10^3	96	19

Tabla 2. Estandarización de líneas celulares para la formación de esferoides. Se muestra el origen de la línea celular, positividad o no al VPH, la concentración utilizada en cada línea para la obtención de los esferoides utilizados en este estudio, longitud promedio en micrómetros de los esferoides obtenidos y el número de estructuras por campo. * Todas entre el tercer y cuarto día de cultivo.

6.2 Identificación del transcrito de E6 en las líneas VPH⁺

Para validar la positividad de las líneas SCC090 y SCC152 al VPH se realizó PCR con un fragmento específico para la oncoproteína E6 (Figura 14A). Posteriormente realizó el análisis de secuencia por BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). El producto de la PCR (215 pb) resultó positivo VPH⁺ y se determinó que ambas líneas corresponden a una variante europea, predominante en población mexicana (Figura 14B).

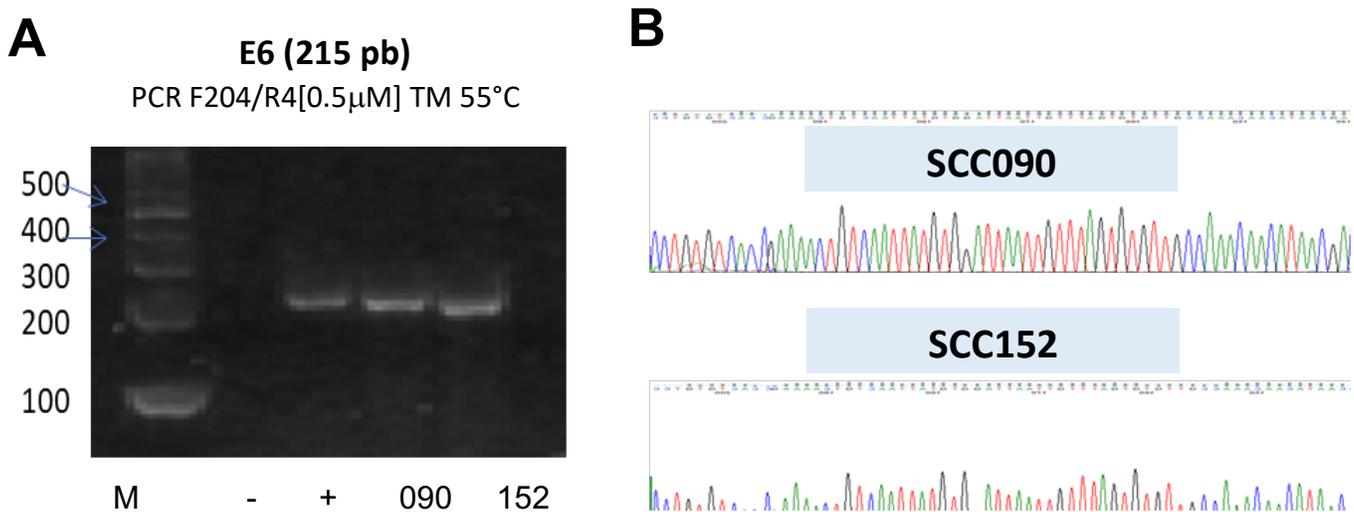


Figura 14. Expresión del transcrito de la oncoproteína E6. A. Amplicón para la proteína E6 (215 pb). Se utilizó ADN de la línea celular SiHa como control. **B.** El producto de la PCR corresponde a VPH16 variante europea, resultado de la secuenciación por SANGER y análisis en BLAST.

6.3 Expresión de biomarcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar en las líneas celulares VPH-positivas y VPH-negativas

Una vez obtenidos los cultivos tridimensionales, se realizaron cortes histológicos y posteriormente se tiñeron con H&E para poder determinar si los esferoides resultaban viables para la tinción por inmunohistoquímica. Los datos mostraron estructuras homogéneas, compactas, con células organizadas concéntricamente, y estructuras celulares bien definidas: núcleos prominentes, citoplasmas y membranas íntegras, resultando estructuras con características viables para la tinción y la identificación de proteínas (Figura 15A).

La titulación de anticuerpos se realizó utilizando como control positivo cortes de carcinoma de células escamosas de cérvix, del mismo modo, se utilizaron otros tejidos como amígdala, colon, recto y testículo, reportados como controles positivos en el *Human Protein Atlas*, se observó tinción positiva para todos los casos. Como controles negativos se utilizaron muestras adyacentes al tumor y cortes de los tejidos antes descritos sin anticuerpo primario, las muestras fueron negativas a la tinción. (Figura 15B).

6.3.1 Expresión de biomarcadores de troncalidad

Se ha demostrado que los cultivos de esferoides incrementan la población de células que expresa marcadores de troncalidad¹³². Tras el análisis, la expresión de OCT4, NANOG y SOX2 resultó positiva (Figura 15C), mostrando un patrón nuclear para los tres marcadores, pero OCT4 presentó una tenue tinción citoplasmática, tanto en líneas positivas como en líneas negativas al VPH (Figura 15D). Por lo tanto, con estos resultados, podemos inferir que la expresión de estos marcadores de troncalidad en esferoides de líneas de carcinoma de células escamosas no es dependiente de la presencia del Virus del Papiloma Humano.

6.3.2 Expresión de biomarcadores la unión escamocelular

Con el propósito de conocer la expresión de biomarcadores de la unión escamocelular, ya descritos con anterioridad en cérvix, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para identificar la presencia de CK7, CD63 y AGR-2. En el caso de CK7, esta proteína mostró una expresión positiva tanto en líneas celulares de CCE de cabeza y cuello VPH⁺, como VPH⁻. Por otro lado, en el caso de CD63 se observó una expresión dependiente de la presencia del VPH, CD63 solo mostró expresión positiva en líneas VPH⁺ (SCC152 y SCC090) (Figura 15D). Por último, los datos mostraron una expresión negativa de AGR-2 para ambas líneas (Figura 15C).

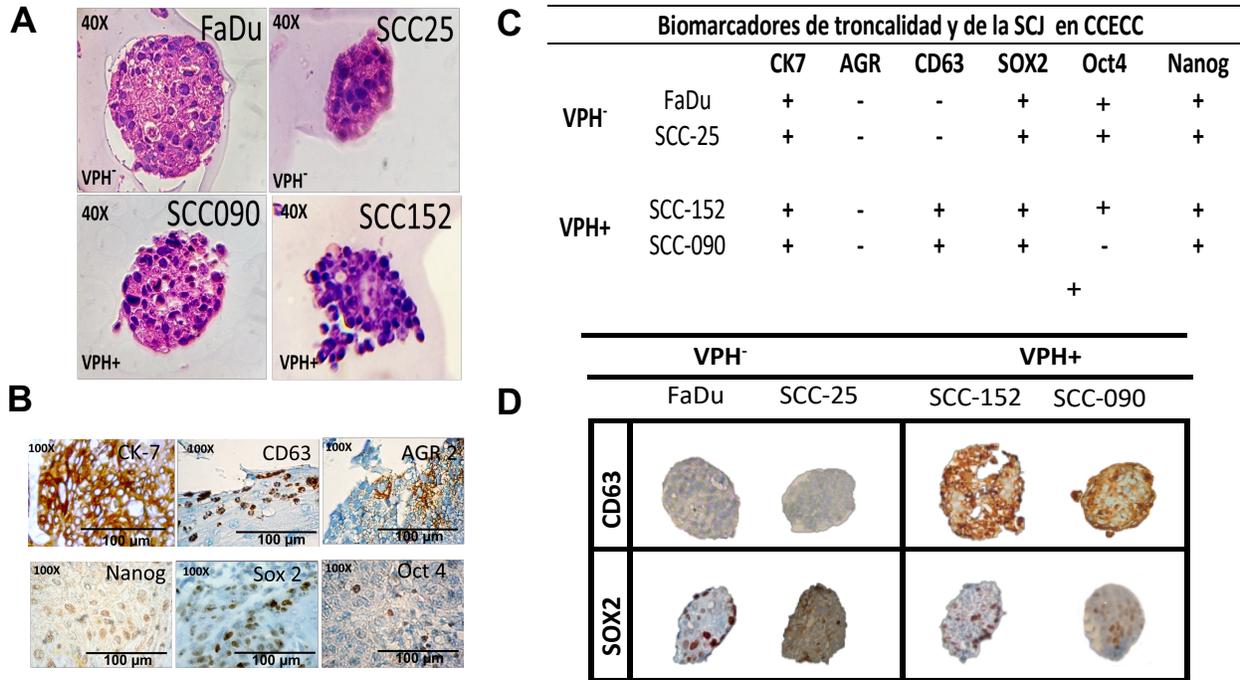


Figura 15. Expresión de biomarcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar en las líneas celulares VPH-positivas y VPH-negativas. A. Tinción de los esferoides con hematoxilina y eosina (H&E). **B.** Microfotografías representativas de casos de carcinoma cervicouterino usados como controles positivos. **C.** Expresión de biomarcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar líneas celulares de CCE de cabeza y cuello VPH⁺ y VPH⁻ **D.** Imágenes representativas de la expresión de SOX2 y CD63 en líneas celulares de CCE de cabeza y cuello mediante inmunohistoquímica.

7. DISCUSIÓN

El cultivo tridimensional se considera un modelo adecuado en la investigación del cáncer y la generación de esferoides se ha descrito en pocas líneas celulares de CCE de cabeza y cuello^{131,133}. El cultivo en esferoides presenta ciertas ventajas sobre el cultivo en monocapa, como una reproducción más fiel de las interacciones intercelulares y del micromambiente tumoral^{134,135}. De hecho, múltiples estudios han mostrado efectos similares en los pacientes y reacciones *in vitro*. Debido a esto, decidimos obtener esferoides de las líneas celulares SCC090, SCC152 (VPH⁺), SCC25 y FaDu (VPH⁻) para realizar los ensayos de inmunohistoquímica de este trabajo. Para poder identificar la expresión de marcadores de troncalidad y de la unión escamocolumnar estandarizamos la obtención de esferoides de líneas celulares establecidas de CCE de cabeza y cuello VPH⁺ (SS090 y SCC152) y VPH⁻ (SCC25 y FaDu).

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que es posible obtener estructuras tridimensionales de líneas celulares establecidas de CCE de cabeza y cuello que permiten generar un micromambiente similar al de los tumores y que resulten útiles para la identificación de diversos biomarcadores, como marcadores de troncalidad (i.e. OCT4, SOX2 y NANOG), ya que se ha demostrado que los cultivos tridimensionales incrementan la población de células que expresa marcadores de troncalidad^{132,136}, como lo son las CTC, las cuales son células que perpetúan el crecimiento y contribuyen a la heterogeneidad del tumor mediante la división asimétrica, además son resistentes a la terapia y permiten la flexibilidad fenotípica que conduce a la invasión y la metástasis¹³⁷⁻¹⁴⁰.

Diversos estudios basados en la expresión de biomarcadores han reiterado la importancia del cultivo tridimensional y han descrito criterios como lo son los coagregados y la longitud de los esferoides que deben de ser considerados para la identificación de biomarcadores. Algunos investigadores han planteado que los esferoides formados por agregación celular tienden a presentar uniones más inestables, por lo que, las condiciones óptimas para la formación de esferoides resulta del crecimiento clonal derivado de la proliferación celular y no de la agregación celular^{141,142}. Un dato interesante que observamos en nuestros resultados fue que las líneas celulares de CCE de cabeza y cuello VPH negativas mostraron una mayor eficiencia en la formación de esferoides a comparación de las líneas VPH positivas y exhibieron una menor presencia de coagregados a concentraciones de 6×10^3 , 8×10^3 y 10×10^3 células/mL, lo cual sugeriría que la presencia de VPH en las líneas celulares promueve la coagregación y la adhesión celular.

Según lo descrito por Young el crecimiento tumoral *in vitro* e *in vivo* ocasionalmente contiene una región necrótica que se forma debido a los gradientes de oxígeno y la restricción de nutrientes¹⁴³. Reportes previos mostraron que el desarrollo de un núcleo necrótico en pacientes con cáncer se correlaciona con un mayor tamaño del tumor y un mal pronóstico¹⁴⁴. El COCE, presenta características clínicas diferentes de otros tumores

sólidos, una de ellas es que la necrosis se observa en solo alrededor del 10% de los casos con un alto grado de malignidad¹⁴⁵, como tal, no es común que los tumores en cabeza y cuello crezcan lo suficiente como para observar necrosis central¹⁴³. En este sentido, buscamos obtener esferoides con la menor cantidad de coagregados celulares entre 80-120 micrómetros, evitando de esta manera, la formación de núcleos necróticos, lo que coincide con lo reportado por Sievers *et. al*, en su estudio utilizando líneas celulares de CCE de cabeza y cuello¹³¹. Además de tomar en cuenta la longitud de los esferoides, buscamos contar con el mayor número de esferoides por campo para realizar los cortes y las tinciones correspondientes para identificar los marcadores incluidos en este trabajo.

La obtención del modelo tridimensional utilizado en este estudio, mostró particularidades específicas para la línea celular SCC090, la cual en el cultivo adherente presentó un crecimiento celular dependiente de señalización paracrina y de una fase logarítmica de crecimiento inicial lenta, llegando hasta los 30 días para obtener una confluencia del 60%. A partir de este punto, las clonas obtenidas se logran estabilizar en un periodo de tres meses, por lo que el proceso de obtención de los esferoides requiere de periodos largos para su obtención.

A partir de cultivos adherentes de las cuatro líneas celulares se obtuvieron esferoides que cumplieron los criterios de crecimiento clonal y de longitud no mayor a 120 μm entre el tercer y cuarto día de cultivo a una concentración de 4×10^3 células/mL de las líneas celulares SCC090, SCC152, bajo estas condiciones estas tres líneas celulares disminuyen la cantidad de agregados celulares. En el caso de la línea celular FaDu, los esferoides con las mejores características resultaron los sembrados a una concentración de 6×10^3 células/mL. Sievers *et al.*, también describieron que concentraciones de 10×10^3 células/mL promueven la formación esferoides de mayor tamaño con un incremento en el número de agregados celulares¹³¹, modelos que para nuestro estudio no cumplen con los parámetros requeridos para la identificación de los biomarcadores de estudio.

Para confirmar la positividad a VPH de alto riesgo realizamos ensayos de PCR de la proteína E6 que es distintiva de la infección de este virus. Tanto la línea SCC090 (lengua,

VPH⁺) como SCC152 (hipofaringe, VPH⁺) resultaron positivas a la presencia del VPH16, el genotipo con mayor prevalencia en CCE de cabeza y cuello en todo el mundo^{41,146,147}, consistente a lo reportado por Ferris *et al.* en 2005 en su estudio con la línea celular SCC090¹⁴⁸. Mediante la secuenciación y el análisis se determinó que ambas líneas presentan la variante europea. Esto resulta relevante, ya que esta variante se ha reportado como la predominante en población mexicana, además se ha informado que las variantes europeas son menos oncogénicas a comparación de variantes como la africana o la asiático-americana^{149,150}, en este sentido, es importante que las líneas celulares en estudio compartan características similares a las que se presentan en la población en la cual podría tener impacto esta investigación.

Por otra parte, los trabajos de Wang en 2011, indicaban que una población celular particular localizada en la unión escamocolumnar del esófago y el estómago, eran las responsables del origen celular del esófago de Barrett, el precursor del adenocarcinoma esofágico¹⁵¹. Herfs, en el 2012, indica que existen poblaciones similares a las encontradas por Wang en 2011 y demuestran la expresión de biomarcadores de estadio embrionario en una discreta población de células de la unión escamocelular de cérvix, sugiriendo que estas son las responsables de neoplasias vinculadas a tumores asociados al VPH¹⁵². Para demostrar la expresión de los marcadores de la unión escamocolumnar descritos por Wang y Herfs, y su relación con células con características de troncalidad, se realizaron las tinciones de inohistoquímica en cortes histológicos de esferoides provenientes de líneas celulares establecidas de CCE de cabeza y cuello, observando una expresión negativa para AGR-2, tanto en líneas positivas como en líneas negativas al VPH. Li *et al.*, reporta que la expresión de esta proteína mejora la capacidad migratoria de las células de COCE *in vitro* e *in vivo*¹²⁰, mientras que, Si-Rui *et. al.*, mostró alta expresión en células de CCECC de estadios avanzados, lo que sugiere una correlación con el fenotipo agresivo tumoral⁷². En nuestro caso, la negatividad a AGR-2 en los esferoides de las cuatro líneas celulares puede deberse a que son esferoides en días tempranos de cultivo y que las líneas celulares no pertenecen a una estadificación tardía, por lo que resultaría conveniente evaluar su expresión en esferoides de mayor tamaño y en días posteriores al cuarto día de cultivo.

En el caso de CK7, esta se identificó en las líneas positivas y negativas al VPH. Los reportes indican que esta proteína juega un papel preponderante en la formación del citoesqueleto y se ha visto expresada en tumores de pulmón, mama y cérvix. Resultaría relevante evaluar cuantitativamente su expresión ya que se ha descrito que esta proteína está directamente regulada por la oncoproteína E7 del VPH16¹⁰⁵.

En cuanto a CD63, observamos inmunopositividad dependiente de la presencia del virus. CD63 sólo resultó positivo en las líneas VPH⁺. Lo cual, coincide con lo descrito por Spoden *et al.*, quien describe que esta proteína juega un papel específico en el transporte endosomal durante la infección por VPH de células epiteliales ¹¹⁴, ya que el VPH es capaz de ingresar en las células huésped a través de una vía endocítica¹¹¹.

En el caso de los marcadores de troncalidad SOX2, OCT4 y NANOG, de los cuales se ha descrito su expresión en tumores de cabeza y cuello, observamos que los esferoides de las cuatro líneas celulares resultaron positivos, coincidiendo con lo reportado por la literatura en donde estos marcadores se han sugerido como marcadores específicos de CTC y se consideran reguladores maestros para el mantenimiento de células troncales. En tumores de cabeza y cuello, estas proteínas, forman una red que coordina la autorrenovación y pluripotencia, a través de la interacción con otros factores de transcripción y diferentes vías de señalización celular^{63,154,155}, por lo que su sobreexpresión permite identificar poblaciones de CTC en CCE^{80,81}.

8. CONCLUSIONES

La obtención de esferoides que cumplan con los criterios establecidos para la identificación de biomarcadores es relevante en el estudio de la carcinogénesis. Nuestros datos sugieren que, las características de crecimiento de cada línea celular son diferentes y que la capacidad clonal de las mismas es un dato a tomar en cuenta para construir los modelos de estudio que sustenten los hallazgos encontrados y que sean representativos de lo que sucede en el microambiente tumoral de los pacientes.

Los resultados obtenidos durante esta investigación demuestran que los esferoides de las cuatro líneas celulares de CCE de cabeza y cuello, presentan poblaciones celulares enriquecidas con células con características de troncalidad ya que fueron positivas a SOX2, OCT4 y NANOG, y también presentan poblaciones celulares con expresión de CK7 y CD63, dos de los biomarcadores descritos en las poblaciones celulares de las uniones escamocolumnares reportados por Wang y Herfs, sugiriendo que las CT localizadas en los tumores podrían estar participando en el proceso de carcinogénesis asociado a VPH en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

9. PERSPECTIVAS

Realizar la identificación de la coexpresión por inmunofluorescencia de los marcadores de troncalidad y de los reportados de la unión escamocolumnar por Wang y Herfs, permitiría determinar si estas proteínas son importantes para las células con características de troncalidad en el proceso de carcinogénesis asociado al VPH. Finalmente, la evaluación de los biomarcadores incluidos en este estudio en muestras de tejido de pacientes con diagnóstico de CCE de cabeza cuello podría indicar si hay una asociación entre la estadificación de los tumores, la presencia de estos marcaodres y la supervivencia de los pacientes, lo anterior con la finalidad de encontrar biomarcadores confiables de la respuesta a la terapia, así como, la recurrencia y sobrevida de los pacientes.

REFERENCIAS

1. Agrawal GP, Shirish Joshi P, Agrawal A, Mokni M, Sonzogni A, Stringer A. Role of HPV-16 in Pathogenesis of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma and Correlation of p16INK4A Expression in HPV-16 Positive Cases: An Immunohistochemical Study. Article ID. 2013;2013.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, Cell. Elsevier; 2011. p. 646–74.
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Vol. 100, Cell. Elsevier; 2000. p. 57–70.
4. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. Vol. 10, Human Molecular Genetics. Oxford University Press; 2001. p. 699–703.
5. Pérez-Cabeza De Vaca R, Cárdenas-Cárdenas E, Mondragón-Terán P, Argentina A, Solís EV. Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. Vol. 22, Rev Esp Méd Quir. 2017 May.
6. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. Nature Reviews Cancer 2018 18:5. 2018 Mar 2;18(5):269–82.
7. Tirado L, Granados M, Granados-García M. Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. Vol. 2, Cancerología. 2007.
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. Academic Press; 2018. p. 228–40.
9. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. Oral Oncology. 2009 Jul;45(7):633–9.
10. Slootweg PJ, Grandis JR. Tumours of the hypopharynx, larynx, trachea and parapharyngeal space. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata Takashi, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon: IARC; 2017. p. 81–4.
11. Sánchez-González RA, Canseco-Ávila LM DAS. Cáncer de cabeza y cuello en pacientes que acuden al Hospital Regional de Alta Especialidad «Ciudad Salud». Evidencia Médica e Investigación en Salud. 2013;6(1):S12–5.
12. Tirado L, Granados M, Granados-García M. Epidemiología y Etiología del Cáncer de la Cabeza y el Cuello. Vol. 2, Cancerología. 2007.
13. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata Takashi, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata Takashi, Slootweg PJ, editors. Lyon: IARC Press; 2017. 1–347 p.
14. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2017 Jan;67(1):51–64.
15. Garneau JC, Bakst RL, Miles BA. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review. Oral Oncology. 2018 Nov 1;86:244–50.
16. Wycliffe ND, Grover RS, Kim PD, Simental A. Hypopharyngeal cancer. Topics in Magnetic Resonance Imaging [Internet]. 2007 Aug [cited 2022 May 13];18(4):243–58. Available from: https://journals-lww-com.pbidi.unam.mx:2443/topicsinmri/Fulltext/2007/08000/Hypopharyngeal_Cancer.4.aspx
17. Kato MG, Baek CH, Chaturvedi P, Gallagher R, Kowalski LP, Leemans CR, et al. Update on oral and oropharyngeal cancer staging – International perspectives. World Journal of Otorhinolaryngology - Head and Neck Surgery. 2020 Mar 1;6(1):66–75.
18. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2015 Sep 1;65(5):401–21.
19. Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2022 Jan 25];6(1):92. Available from: [/pmc/articles/PMc7944998/](https://www.nature.com/articles/PMc7944998/)
20. Keane FK, Chen YH, Tishler RB, Schoenfeld JD, Haddad RI, Goguen LA, et al. Population-based validation of the recursive partitioning analysis–based staging system for oropharyngeal cancer. Head and Neck. 2016 Oct 1;38(10):1530–8.
21. Yin X, Shan C, Wang J, Zhang H. Factors associated with the quality of life for hospitalized patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. Oral Oncology. 2020 Apr 1;103:104590.
22. Juárez-Nieto O, Gutiérrez-González J. Prevalencia del carcinoma escamoso de orofaringe y su relación con los genotipos del VPH. Anales de Otorrinolaringología Mexicana. 2017;62(4):228–34.
23. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394–424.
24. Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, Würdemann N, Knuth J, Reder H, et al. HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. Vol. 97, Laryngo- rhino- otologie. NLM (Medline); 2018. p. S48–113.

25. Lechien JR, Seminerio I, Descamps G, Mat Q, Mouawad F, Hans S, et al. Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Cells*. 2019 Sep 10;8(9).
26. Nair S, Datta S, Thiagarajan S, Chakrabarti S, Nair D, Chaturvedi P. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in exclusive smokers, chewers, and those with no habits. *Indian Journal of Cancer*. 2016 Oct 1;53(4):538.
27. Vargas-Soto Omar, Molina-Frechero Nelly, Castañeda-Castaneira Enrique, Bologna-Molina Ronell, Carreón-Burciaga Ramón Gil, González-González Rogelio. Carcinomas de cabeza y cuello, experiencia de un Centro Oncológico del Estado de Durango, México. *Revista ADM*. 2016 Apr;190-6.
28. RESULTADOS DEL SISTEMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE PATOLOGÍAS BUCALES. 2019.
29. Hagemann J, Jacobi C, Gstoettner S, Welz C, Schwenk-Zieger S, Stauber R, et al. Therapy testing in a spheroid-based 3D cell culture model for head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Visualized Experiments*. 2018 Apr 20;2018(134):57012.
30. Malik UU, Zarina S, Pennington SR. Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. Vol. 63, *Archives of Oral Biology*. Elsevier Ltd; 2016. p. 53-65.
31. Radoš L, Luce D. A review of risk factors for oral cavity cancer: The importance of a standardized case definition. Vol. 41, *Community Dentistry and Oral Epidemiology*. Community Dent Oral Epidemiol; 2013. p. 97-109.
32. Rivera C. Essentials of oral cancer. Vol. 8, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. E-Century Publishing Corporation; 2015. p. 11884-94.
33. Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. 2016 Apr 1;12(2):458.
34. Feller L, Lemmer J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Journal of Cancer Therapy*. 2012 Aug 9;03(04):263-8.
35. Contreras W, Venegas B, Carlos van Buren H. Virus Papiloma Humano en Cáncer Oral y Orofaringeo. Revisión de la Literatura Human Papilloma virus in Oral and Oropharyngeal Cancer. Review of the Literature. Vol. 9, *Int. J. Odontostomat*. 2015.
36. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. Vol. 62, *Dental Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 111-20.
37. Túri K, Barabás P, Csurgay K, Léhner G, Lorincz Á, Németh Z. An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a central-eastern european population. Vol. 19, *Pathology and Oncology Research*. Pathol Oncol Res; 2013. p. 353-63.
38. Panarese I, Aquino G, Ronchi A, Longo F, Montella M, Cozzolino I, et al. Oral and Oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. [Internet]. 2019 1;19(2):105-19.
39. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. Vol. 15, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. SAGE Publications; 2004. p. 188-96.
40. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecologic Oncology*. 2008 Sep;110(3 SUPPL.2).
41. Lu W, Feng L, Li P, Wang Y, Du Y, Chen X, et al. Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. *Oncology Reports* [Internet]. 2016; 35(1):99-106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26497405/>
42. Agrawal GP, Shirish Joshi P, Agrawal A, Mokni M, Sonzogni A, Stringer A. Role of HPV-16 in Pathogenesis of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma and Correlation of p16INK4A Expression in HPV-16 Positive Cases: An Immunohistochemical Study.;2013.
43. Castro AA, Fournier Pérez M. Virus del Papiloma Humano. *Ginecología: Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*. 2013;211-7.
44. Herfs M, Soong TR, Delvenne P, Crum CP. Deciphering the multifactorial susceptibility of mucosal junction cells to HPV infection and related carcinogenesis. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017.
45. Lizano-Soberón M, Carrillo-García A, Contreras-Paredes A. Infección por virus del Papiloma Humano: Epidemiología, Historia Natural y Carcinogénesis. *Cancerología*. 2009;205-16.
46. Budu VA, Decuseară T, Balica NC, Mogoantă CA, Rădulescu LM, Chirilă M, et al. The role of hvp infection in oropharyngeal cancer. Vol. 60, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. Editura Academiei Romane; 2019. p. 769-73.
47. Reimers LL, Anderson WF, Rosenberg PS, Henson DE, Castle PE. Etiologic heterogeneity for cervical carcinoma by histopathologic type, using comparative age-period-cohort models. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2009 Mar;18(3):792-800.
48. Lu W, Feng L, Li P, Wang Y, Du Y, Chen X, et al. Effects of HPV-16 infection on hypopharyngeal squamous cell carcinoma and FaDu cells. *Oncology Reports*. 2016 Jan 1;35(1):99-106.
49. Marur S, Burtness B. Oropharyngeal squamous cell carcinoma treatment: Current standards and future directions. Vol. 26, *Current Opinion in Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 252-8.
50. Wittekindt C, Wagner S, Sharma SJ, Würdemann N, Knuth J, Reder H, et al. HPV – Das andere Kopf-Hals-Karzinom. Vol. 97, *Laryngo- rhino- otologie*. NLM (Medline); 2018. p. S48-113.

51. Rethman MP, Carpenter W, Cohen EEW, Epstein J, Evans CA, Flalfz CM, et al. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. *Journal of the American Dental Association*. 2010;141(5):509–20.
52. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. Elsevier; 2011 [
53. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015;6(3):244–8.
54. Cho YK, Lee SJ, Woo JJ, Lee H, Lee H. Cytokeratin7 expression in histologic and cytologic specimens of cystic neck metastasis from HPV positive squamous cell carcinoma of the tonsil: A case report. *Diagnostic Cytopathology*. 2018 Apr 1;46(4):331–5.
55. Spoden G, Freitag K, Husmann M, Boller K, Sapp M, Lambert C, et al. Clathrin- and caveolin-independent entry of human papillomavirus type 16 - Involvement of tetraspanin-enriched microdomains (TEMs). *PLoS ONE*. 2008 Oct 2;3(10).
56. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*. 2015 Apr 3;6(3):244–8.
57. Nakano T, Yamamoto H, Nakashima T, Nishijima T, Satoh M, Hatanaka Y, et al. Molecular subclassification determined by human papillomavirus and epidermal growth factor receptor status is associated with the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Human Pathology*. 2016 Apr 1;50:51–61.
58. Rossi F, Noren H, Jove R, Beljanski V, Grinnemo KH. Differences and similarities between cancer and somatic stem cells: therapeutic implications. *Stem Cell Research & Therapy* 2020 11:1. 2020 Nov 18;11(1):1–16.
59. Marotta LLC, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. Vol. 19, *Current Opinion in Genetics and Development*. Elsevier Current Trends; 2009. p. 44–50.
60. Rodrigues MFSD, Xavier FC de A, Andrade NP, Lopes C, Miguita Luiz L, Sedassari BT, et al. Prognostic implications of CD44, NANOG, OCT4, and BMI1 expression in tongue squamous cell carcinoma. *Head & Neck*. 2018 Aug 1;40(8):1759–73.
61. Singh P, Augustine D, Rao RS, Patil S, Awan KH, Sowmya SV, et al. Role of cancer stem cells in head-and-neck squamous cell carcinoma - A systematic review. *J Carcinog*. 2021 Jan 1;20(1).
62. Van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST, Itinteang T. Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*. 2018 Jan 1;71(1):88–91.
63. Baillie R, Tan ST, Itinteang T. Cancer stem cells in oral cavity squamous cell carcinoma: A review. Vol. 7, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2017. p. 112.
64. Pedregal-Mallo D, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Montoro-Jiménez I, Allonca E, Pozo-Agundo E, et al. Prognostic significance of the pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4 in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers (Basel)*. 2020 Jul 1;12(7):1–15.
65. Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, Ande SR, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, et al. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. Vol. 14, *Trends in Molecular Medicine*. Trends Mol Med; 2008. p. 450–60.
66. Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, Zhang LS. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncology Letters*. 2012 Dec;4(6):1264–8.
67. Takeda D, Hasegawa T, Ueha T, Iwata E, Harada R, Sakakibara A, et al. Induced Pluripotent-stem-cell Related Genes Contribute to De-differentiation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2017 Mar 1;37(3):1075–82.
68. Ailles LE, Weissman IL. Cancer stem cells in solid tumors. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007 Oct 1;18(5):460–6.
69. 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 May 1;11(5).
70. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head & Neck*. 2017 Sep 1;39(9):1920–32.
71. Rizzo D, Graziani C, Gallus R, Zannoni GF, Lucchetti D, Parrilla C, et al. Stem cell markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas in relation to the site of origin and HPV infection: Clinical implications. *Acta Otorhinolaryngologica Italica*. 2020;40(2):90–8.
72. Ma SR, Wang WM, Huang CF, Zhang WF, Sun ZJ. Anterior gradient protein 2 expression in high grade head and neck squamous cell carcinoma correlated with cancer stem cell and epithelial mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2015;6(11):8807–21.
73. Palla AR, Piazzolla D, Alcazar N, Cañamero M, Graña O, Gómez-López G, et al. The pluripotency factor NANOG promotes the formation of squamous cell carcinomas. *Scientific Reports*. 2015 May 19;5.
74. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2015 Jul 1;51(7):643–51.
75. Ajani JA, Song S, Hochster HS, Steinberg IB. Cancer stem cells: The promise and the potential. *Seminars in Oncology*. 2015 Apr 1;42(S1):S3–17.
76. 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 May 1;11(5).

77. Farfán Tume LF. Las células madre del cáncer como centro de investigación de la inmunoterapia . *Revista Venezolana Oncológica*. 2014;26:199–216.
78. Major AG, Pitty LP, Farah CS. Cancer stem cell markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Stem Cells International*. 2013;
79. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research* 2007 17:1. 2007 Jan 9;17(1):42–9.
80. Habu N, Imanishi Y, Kameyama K, Shimoda M, Tokumaru Y, Sakamoto K, et al. Expression of Oct3/4 and Nanog in the head and neck squamous carcinoma cells and its clinical implications for delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2015 Oct 19;15(1).
81. Lee SH, Oh SY, Do SI, Lee HJ, Kang HJ, Rho YS, et al. SOX2 regulates self-renewal and tumorigenicity of stem-like cells of head and neck squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2014 Nov 25;111(11):2122–30.
82. Baek KH, Choi J, Pei CZ. Cellular Functions of OCT-3/4 Regulated by Ubiquitination in Proliferating Cells. *Cancers (Basel)*. 2020 Mar 1;12(3).
83. Panayiotou T, Michael S, Zaravinos A, Demirag E, Achilleos C, Strati K. Human papillomavirus E7 binds Oct4 and regulates its activity in HPV-associated cervical cancers. *PLoS Pathogens*. 2020 Apr 1;16(4).
84. Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, Lee JH, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2016 Feb 1;45(2):89–95.
85. Tulake W, Yuemaier R, Sheng L, Ru M, Lidifu D, Abudula A. Upregulation of stem cell markers ALDH1A1 and OCT4 as potential biomarkers for the early detection of cervical carcinoma. *Oncology Letters*. 2018 Nov 1;16(5):5525–34.
86. Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, et al. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene*. 2015 Apr 30;34(18):2317–24.
87. Mohajertehran F, Sahebkar A, Zare R, Mohtasham N. The promise of stem cell markers in the diagnosis and therapy of epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*. 2018 Nov 1;233(11):8499–507.
88. Grubelnik G, Boštjančič E, Grošelj A, Zidar N. Expression of NANOG and Its Regulation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International*. 2020;2020.
89. Grubelnik G, Boštjančič E, Grošelj A, Zidar N. Expression of NANOG and Its Regulation in Oral Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International*. 2020;2020.
90. Reid P, Marcu LG, Olver I, Moghaddasi L, Staudacher AH, Bezak E. Diversity of cancer stem cells in head and neck carcinomas: The role of HPV in cancer stem cell heterogeneity, plasticity and treatment response. *Radiotherapy and Oncology*. 2019 Jun 1;135:1–12.
91. 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. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015 Jun 1;36(2):784–98.
92. Fu TY, Hsieh IC, Cheng JT, Tsai MH, Hou YY, Lee JH, et al. Association of OCT4, SOX2, and NANOG expression with oral squamous cell carcinoma progression. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2016 Feb 1;45(2):89–95.
93. Luo W, Li S, Peng B, Ye Y, Deng X, Yao K. Correction: Embryonic Stem Cells Markers SOX2, OCT4 and Nanog Expression and Their Correlations with Epithelial-Mesenchymal Transition in Nasopharyngeal Carcinoma. *PLoS ONE*. 2013 Oct 11;8(10):56324.
94. Zhao L, Liu J, Chen S, Fang C, Zhang X, Luo Z. Prognostic significance of NANOG expression in solid tumors: A meta-analysis. Vol. 11, *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd.; 2018. p. 5515–26.
95. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. 2020 Dec 1;67:74–82.
96. Porter L, McCaughan F. SOX2 and squamous cancers. *Seminars in Cancer Biology*. 2020 Dec 1;67:154–67.
97. Novak D, Hüser L, Elton JJ, Umansky V, Altevogt P, Utikal J. SOX2 in development and cancer biology. *Seminars in Cancer Biology*. 2020 Dec 1;67:74–82.
98. Chou MY, Hu FW, Yu CH, Yu CC. Sox2 expression involvement in the oncogenicity and radiochemoresistance of oral cancer stem cells. *Oral Oncology*. 2015 Jan 1;51(1):31–9.
99. Schröck A, Bode M, Göke FJM, Bareiss PM, Schairer R, Wang H, et al. Expression and role of the embryonic protein SOX2 in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2014;35(7).
100. Kokalj Vokač N, Čizmarević B, Zagorac A, Zagradišnik B, Lanišnik B. An evaluation of SOX2 and hTERT gene amplifications as screening markers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Molecular Cytogenetics*. 2014 Jan 10;7(1):5.
101. Chen C, Zhao S, Karnad A, Freeman JW. The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*. 2018 May 10;11(1).
102. Morath I, Hartmann TN, Orian-Rousseau V. CD44: More than a mere stem cell marker. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2016 Dec 1;81:166–73.

103. Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Jun 26;109(26):10516–21.
104. Hrudka J, Fišerová H, Jelínková K, Matěj R, Waldauf P. Cytokeratin 7 expression as a predictor of an unfavorable prognosis in colorectal carcinoma. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
105. Woods RSR, Keegan H, White C, Tewari P, Toner M, Kennedy S, et al. Cytokeratin 7 in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A junctional biomarker for human papillomavirus-related tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2017 May 1;26(5):702–10.
106. Woods RSR, Keegan H, White C, Tewari P, Toner M, Kennedy S, et al. Cytokeratin 7 in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A junctional biomarker for human papillomavirus-related tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2017 May 1;26(5):702–10.
107. Chu P, Wu E, Weiss LM. Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: A survey of 435 cases. *Modern Pathology*. 2000;13(9):962–72.
108. Mehrad M, Dupont WD, Plummer WD, Lewis JS. Expression and Significance of Cytokeratin 7, a Squamocolumnar Junction Marker, in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathology*. 2018 Dec 1;12(4):448–54.
109. Morbini P, Capello G, Alberizzi P, Benazzo M, Paglino C, Comoli P, et al. Markers of squamocolumnar junction cells in normal tonsils and oropharyngeal cancer with and without HPV infection. *Histology and Histopathology*. 2015;30(7):833–9.
110. Pitiyage G, Lei M, Guerro Urbano T, Odell E, Thavaraj S. Biphenotypic human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: A report of two cases. *Diagnostic Pathology*. 2015 Jul 11;10(1).
111. Gräbel L, Fast LA, Scheffer KD, Boukhallouk F, Spoden GA, Tenzer S, et al. The CD63-Syntenin-1 Complex Controls Post-Endocytic Trafficking of Oncogenic Human Papillomaviruses. *Scientific Reports*. 2016 Aug 31;6.
112. Justo BL, Jasiulionis MG. Characteristics of TIMP1, CD63, and β 1-Integrin and the Functional Impact of Their Interaction in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Sep 1;22(17).
113. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63 [Internet]. Vol. 315, *Experimental Cell Research*. Academic Press Inc.; 2009. p. 1584–92.
114. Spoden G, Kuhling L, Cordes N, Frenzel B, Sapp M, Boller K, et al. Human Papillomavirus Types 16, 18, and 31 Share Similar Endocytic Requirements for Entry. *Journal of Virology*. 2013 Jul 1;87(13):7765–73.
115. Mikuličić S, Florin L. The endocytic trafficking pathway of oncogenic papillomaviruses. *Papillomavirus Research*. 2019 Jun 1;7:135.
116. Lai X, Gu Q, Zhou X, Feng W, Lin X, He Y, et al. Decreased expression of CD63 tetraspanin protein predicts elevated malignant potential in human esophageal cancer. *Oncology Letters*. 2017 Jun 1;13(6):4245–51.
117. Gupta A, Dong A, Lowe AW. AGR2 Gene Function Requires a Unique Endoplasmic Reticulum Localization Motif. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012 Feb 10;287(7):4773.
118. Fessart D, Domblides C, Avril T, Eriksson LA, Begueret H, Pineau R, et al. Secretion of protein disulphide isomerase AGR2 confers tumorigenic properties. *Elife*. 2016 May 30;5(MAY2016).
119. Liu AY, Kanan AD, Radon TP, Shah S, Weeks ME, Foster JM, et al. AGR2, a unique tumor-associated antigen, is a promising candidate for antibody targeting. *Oncotarget*. 2019;10(42):4276–89.
120. Li Y, Wang W, Liu Z, Jiang Y, Lu J, Xie H, et al. AGR2 diagnostic value in nasopharyngeal carcinoma prognosis. *Clinica Chimica Acta* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2020 Aug 6];484:323–7.
121. Li Y, Wang W, Liu Z, Jiang Y, Lu J, Xie H, et al. AGR2 diagnostic value in nasopharyngeal carcinoma prognosis. *Clinica Chimica Acta*. 2018 Sep 1;484:323–7.
122. Sievers D, Bunzendahl J, Frosch A, Perske C, Hemmerlein B, Schliephake H, et al. Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. *Molecular and Clinical Oncology*. 2017 Nov 27;8(2):323.
123. Adcock AF. Three-Dimensional (3D) Cell Cultures in Cell-based Assays for in-vitro Evaluation of Anticancer Drugs. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*. 2015 May 29;06(03):1–12.
124. Kochanek SJ, Close DA, Johnston PA. High content screening characterization of head and neck squamous cell carcinoma multicellular tumor spheroid cultures generated in 384-well ultra-low attachment plates to screen for better cancer drug leads. *Assay and Drug Development Technologies*. 2019 Jan 1;17(1):17–36.
125. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection. Vol. 29, *Head and Neck*. Head Neck; 2007. p. 163–88.
126. Kunz-Schughart LA, Doetsch J, Mueller-Klieser W, Groebe K. Proliferative activity and tumorigenic conversion: Impact on cellular metabolism in 3-D culture. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2000;278(4 47-4).
127. Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *Journal of Biomolecular Screening*. 2006 Dec;11(8):922–32.
128. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. Vol. 12, *Assay and Drug Development Technologies*. Mary Ann Liebert Inc.; 2014. p. 207–18.

129. Lee C, Lee C, Atakilil A, Siu A, Ramos DM. Differential spheroid formation by oral cancer cells - PubMed. *Anticancer Research*. 2014 Dec;34(12).
130. Hoarau-Véchet J, Rafii A, Touboul C, Pasquier J. Halfway between 2D and animal models: Are 3D cultures the ideal tool to study cancer-microenvironment interactions? Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018.
131. Sievers D, Bunzendahl J, Frosch A, Perske C, Hemmerlein B, Schliephake H, et al. Generation of highly differentiated BHY oral squamous cell carcinoma multicellular spheroids. *Molecular and Clinical Oncology* [Internet]. 2017;8(2):323.
132. Ryu NE, Lee SH, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* [Internet]. 2019;8(12).
133. Sant S, Johnston PA. The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery [Internet]. Vol. 23, *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier Ltd; 201. p. 27–36.
134. Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, et al. Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: Established models and rationale for selection [Internet]. Vol. 29, *Head and Neck*. Head Neck; 2007. p. 163–88.
135. Lee C, Lee C, Atakilil A, Siu A, Ramos DM. Differential spheroid formation by oral cancer cells - PubMed. *Anticancer Research* [Internet]. 2014;34(12).
136. Goričan L, Gole B, Potočnik U. Head and Neck Cancer Stem Cell-Enriched Spheroid Model for Anticancer Compound Screening. *Cells* 2020, Vol 9, Page 1707 [Internet]. 2020 Jul 16;9(7):1707.
137. Keysar SB, Le PN, Miller B, Jackson BC, Eagles JR, Nieto C, et al. Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2017 Jan 1 ;109(1).
138. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Feb 14];51(7):643–51.
139. Sagar J, Chaib B, Sales K, Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. 2007 [cited 2020 Aug 6]; Available from: <http://www.cancerci.com/content/7/1/9>
140. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* [Internet]. 2009;45(7):633–9.
141. Maliszewska-Olejniczak K, Brodaczevska KK, Bielecka ZF, Solarek W, Kornakiewicz A, Szczylik C, et al. Development of extracellular matrix supported 3D culture of renal cancer cells and renal cancer stem cells. *Cytotechnology* [Internet]. 2019;71(1):149.
142. Jauković A, Abadijeva D, Trivanović D, Stoyanova E, Kostadinova M, Pashova S, et al. Specificity of 3D MSC Spheroids Microenvironment: Impact on MSC Behavior and Properties. *Stem Cell Rev Rep* [Internet]. 2020 Oct 1;16(5):853–75.
143. Choi SY, Kang SH, Oh SY, Lee KY, Lee HJ, Gum S, et al. Differential angiogenic potential of 3-dimension spheroid of hnscc cells in mouse xenograft. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2021;22(15).
144. Tomes L, Emberley E, Niu Y, Troup S, Pastorek J, Strange K, et al. Necrosis and hypoxia in invasive breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2003;81(1):61–9.
145. Pires FR, Ramos AB, de Oliveira JBC, Tavares AS, de Luz PSR, dos Santos TCRB. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. *Journal of Applied Oral Science* [Internet]. 2013. 21(5):460.
146. Budu VA, Decuseară T, Balica NC, Mogoantă CA, Rădulescu LM, Chirilă M, et al. The role of hpv infection in oropharyngeal cancer [Internet]. Vol. 60, *Romanian Journal of Morphology and Embryology*. Editura Academiei Romane; 2019. p. 769–73.
147. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments [Internet]. Vol. 52, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press; 2018. p. 228–40.
148. Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, López-Albaitero A, Gollin SM, et al. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): A natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *European Journal of Cancer*. 2005. 1;41(5):807–15.
149. Antaño-Arias R, Moral-Hernández O del, Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero LDC, Navor-Hernández JA, Leyva-Vázquez MA, et al. E6/E7 Variants of Human Papillomavirus 16 Associated with Cervical Carcinoma in Women in Southern Mexico. *Pathogens* [Internet]. 2021;10(6).
150. Pérez-Quintanilla M, Méndez-Martínez R, Vázquez-Vega S, Espinosa-Romero R, Sotelo-Regil R, Pérez-Montiel MD, et al. High prevalence of human papillomavirus and European variants of HPV 16 infecting concomitantly to cervix and oral cavity in HIV positive women. *PLOS ONE* [Internet]. 2020;15(4):e0227900.
151. Wang X, Ouyang H, Yamamoto Y, Kumar PA, Wei TS, Dagher R, et al. Residual Embryonic Cells as Precursors of a Barrett's-Like Metaplasia. *Cell* [Internet]. 2011;145(7):1023.
152. Herfs M, Soong TR, Delvenne P, Crum CP. Deciphering the multifactorial susceptibility of mucosal junction cells to HPV infection and related carcinogenesis [Internet]. Vol. 9, *Viruses*. MDPI AG; 2017.

153. Cho YK, Lee SJ, Woo JJ, Lee H, Lee H. Cytokeratin7 expression in histologic and cytologic specimens of cystic neck metastasis from HPV positive squamous cell carcinoma of the tonsil: A case report. *Diagnostic Cytopathology* [Internet]. 2018;46(4):331–5.
154. Ling GQ, Chen DB, Wang BQ, Zhang LS. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. *Oncology Letters* [Internet]. 2012;4(6):1264–8.
155. Pedregal-Mallo D, Hermida-Prado F, Granda-Díaz R, Montoro-Jiménez I, Allonca E, Pozo-Agundo E, et al. Prognostic significance of the pluripotency factors NANOG, SOX2, and OCT4 in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020.12(7):1–15.