



**Identificación de Marcadores TRA-1-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en Muestras
de Células Madre Cancerosas de Pacientes Diagnosticados con Cáncer Oral**

Karen Daniela Trujillo Reyes

Cod:20571626563

Diego Andrés Bustos Pérez

Cod: 20571629907

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Neiva, Colombia

2022

**Identificación de Marcadores TRA-1-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en Muestras
de Células Madre Cancerosas de Pacientes Diagnosticados con Cáncer Oral**

Karen Daniela Trujillo Reyes

Cod:20571626563

Diego Andrés Bustos Pérez

Cod:20571629907

Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:

Odontólogo

Director (a) Temático:

Biólogo Celular Dr. Manuel García Flores

Director Metodológico (a):

Dra. Claudia Lorena García Rojas MSc

Línea de Investigación:

Promoción y Prevención en Salud Oral.

Universidad Antonio Nariño

Programa de Odontología

Facultad de Odontología

Neiva, Colombia

2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

El trabajo de grado titulado Identificación de Marcadores TRA-1-60, OCT-4, TRA, NANOG y S SEA-4 en Muestras de Células Madre Cancerosas de Pacientes Diagnosticados con Cáncer Oral, Cumple con los requisitos para optar Al título de odontólogo.

Firma del Tutor

Firma Jurado

Firma Jurado

Neiva, 26 de abril de 2022.

Contenido

Pág.

Resumen.....	13
Abstract.....	14
Introducción	15
1. Antecedentes.....	17
2. Planteamiento del problema.....	20
3. Justificación.....	21
4. Objetivos.....	23
4.1. Objetivo General	23
4.2. Objetivos Específicos.....	23
5. Marco teórico	24
5.1. Generalidades	24
5.2. Marcadores de Células Madre.....	27
5.2.1. <i>TRA</i>	27
5.2.2. <i>OCT- 4</i>	28
5.2.3. <i>NANOG</i>	29
5.2.4. <i>S SEA-4</i>	29
6. Diseño metodológico.....	30
6.1. Tipo De Estudio	30
6.2. Población.....	30
6.2.1. <i>Muestra</i>	30
6.3. Criterios.....	31
6.3.1. <i>Criterios De Inclusión</i>	31
6.3.2. <i>Criterios de exclusión</i>	31
6.4. Descripción de procedimientos	31
6.5. Análisis de los datos.....	32

6.6. Aspectos éticos de la investigación.....	33
7. Resultados.....	35
7.1. Marcador TRA	36
7.1.1. <i>Bien diferenciado</i>	36
7.1.2. <i>Moderadamente diferenciado</i>	39
7.1.3. <i>Pobremente diferenciado</i>	41
7.2. Marcador NANOG.....	44
7.2.1. <i>Bien diferenciado</i>	44
7.2.2. <i>Moderadamente diferenciado</i>	47
7.2.3. <i>Pobremente diferenciado</i>	50
7.3. Marcador OCT-4.....	51
7.3.1. <i>Bien diferenciado</i>	51
7.3.2. <i>Moderadamente diferenciado</i>	51
7.3.3. <i>Pobremente diferenciado</i>	54
7.4. Marcador SSEA4.....	56
7.4.1. <i>Bien diferenciado</i>	56
7.4.2. <i>Moderadamente diferenciado</i>	59
7.4.3. <i>Pobremente diferenciado</i>	62
7.5. Cuantificación de la fluorescencia.....	63
7.5.1. <i>Niveles de marcadores y correlación</i>	66
8. Conclusiones.....	71
9. Recomendaciones.....	72
Referencias Bibliográficas.....	73

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Carcinoma de células escamosas	26
Figura 2. Equipos de análisis de datos	32
Figura 3. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.	36
Figura 4. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.	37
Figura 5. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.	38
Figura 6. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED.	39
Figura 7. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC.	40
Figura 8. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC.	41
Figura 9. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 DSRED.	42
Figura 10. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC.	43
Figura 11. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.	44
Figura 12. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.	45
Figura 13. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.	46
Figura 14. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD- 2223 FIT- C1-C2	47
Figura 15. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD, 2223 C1-C2 DSRED	48
Figura 16. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD-2223, C3 DSRED-FITC.	49
Figura 17. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular PD 3074, C3 DSRED-FITC.	50
Figura 18. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular 1975 MD, C1-C2 FITC.	51
Figura 19. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular MD, 2223 C1-C2 DSRED	52
Figura 20. Marcación para el anticuerpo OCT4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C2 DSRED-FITC.	53
Figura 21. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular PD 3074, C1-C2 FITC.	54
Figura 22. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular PD 3074, C1-C2 DSRED.	55
Figura 23. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.	56
Figura 24. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.	57
Figura 25. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.	58
Figura 26. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular 1975 BD, C1-C2 FITC.	59
Figura 27. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED.	60
Figura 28. Marcación para el anticuerpo SSE4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC.	61
Figura 29. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC.	62
Figura 30. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC.	63
Figura 31. Cuantificación de la fluorescencia mediante plots.	65
Figura 32. Nivel de diferencia para marcador OCT 4.	66
Figura 33. Nivel de diferencia para marcador TRA-1-60.	66
Figura 34. Nivel de diferencia para marcador NANOG	67
Figura 35. Nivel de diferencia para marcador SSEA4.	67

(Dedicatoria)

*A Dios como primera medida y a nuestros
padres por su gran apoyo y dedicación a graves del
tiempo, a su gran esfuerzo, a su fe y buenos deseos de
alcanzar nuestros objetivos*

Agradecimientos

A nuestros tutores, por ese apoyo y aporte constante, a su dedicación y entrega, a sus consejos y buenas formas de dirigir este proyecto; a la Universidad Antonio Nariño, a todos y cada uno de los profesores que con sus conocimientos aportaron en la construcción de nuestro proceso de formación profesional.

Resumen

Introducción: El cáncer oral puede ser el resultado de una lesión primaria u originarse desde otra lesión tumoral distante o adyacente que conduzca a neoplasias malignas en las estructuras y tejidos de la cavidad bucal (metástasis). **Objetivo:** Identificar marcadores TRA-I-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en células madre cancerígenas de pacientes diagnosticados con cáncer oral. **Materiales y Métodos:** Corresponde a una investigación de tipo experimental descriptiva de corte trasnversal, por el método de Inmunofluorescencia, los cortes de 5 μm serán desparafinados de forma rutinaria y posteriormente rehidratados. se realizará la recuperación antigénica en tampón 10 mm citrato buffer, Ph 6.0 durante 15 minutos en olla de presión eléctrica. las láminas se incubarán en H₂O₂ 1% por 15 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. En seguida se usará BSA 3% por una hora para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se dejarán en incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondientes (antiTral-60, anti-OCT- 4, anti NANOG, anti-S SSE-4), en una dilución 1:100 en BSA 1%. **Resultados:** El marcador OCT 4 se manifestó con mayor intensidad en el cáncer bien diferenciado, el marcador SSEA4 aumenta con la desdiferenciación del tejido y los marcadores NANOG y TRA-1-60 se mantienen constantes durante la progresión del tumor. **Conclusiones:** De los diferentes marcadores analizados relacionados con células progenitoras, todos se encontraron en las muestras de los pacientes, indicando entre ellos diferencias de marcación más evidentes.

Palabras clave: Carcinoma Escamocelular, TRA-1-60, OCT-4, TRA, NANOG y S SEA-4.

Abstract

Introduction: Oral cancer can result from a primary lesion or originate from another distant or adjacent tumor lesion leading to malignant neoplasms in the structures and tissues of the oral cavity (metastasis). Objective: To identify TRA-I-60, OCT-4, NANOG and S SEA-4 markers in cancer stem cells of patients diagnosed with oral cancer. Materials and Methods: It corresponds to an experimental type research, by Immunofluorescence method, 5 μ m slices will be routinely deparaffinized and then rehydrated. antigenic recovery will be performed in buffer 10 mm citrate buffer, Ph 6.0 for 15 minutes in an electric pressure cooker. the slides will be incubated in H₂O₂ 1% for 15 minutes, to block endogenous peroxidase. Then 3% BSA will be used for one hour to block nonspecific binding. The sections will be incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibody (anti-Tral-60, anti-OCT-4, anti-NANOG, anti-S SSE-4), at a 1:100 dilution in 1% BSA. Results: OCT 4 marker manifested with higher intensity in well-differentiated cancer, SSEA4 marker increases with tissue dedifferentiation and NANOG and TRA-1-60 markers remain constant during tumor progression. Conclusions: Of the different markers analyzed related to progenitor cells, all were found in the patient samples, indicating among them more evident marker differences.

Key words: Squamous cell carcinoma, TRA-I-60, OCT-4, TRA, NANOG and S SEA-4.

Introducción

La Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) define el cáncer oral como la neoplasia originada en los labios, cavidad oral, orofaringe, nasofaringe e hipofaringe. Esta misma organización, calcula la incidencia mundial del cáncer de labio y de cavidad bucal desde 4 casos por 100.000 habitantes, hasta 20 casos por 100.000 habitantes en algunas regiones (OMS, 2019)

El cáncer oral puede ser el resultado de una lesión primaria u originarse desde otra lesión tumoral distante o adyacente que conduzca a neoplasias malignas en las estructuras y tejidos de la cavidad bucal (metástasis). Todos los tipos de cáncer en la cavidad oral y la orofaringe se conocen como cáncer oral o cáncer de boca; entre ellos se encuentra el cáncer epitelial (especialmente células escamosas), cáncer de glándulas salivales, cáncer de tejidos blandos, cáncer hematolinfoide y carcinoma odontogeno; el carcinoma de células escamosas (SCC) constituye > 90% de todos los cánceres orales.

El proceso carcinogénico es complejo: intervienen genes y proteínas reguladoras del proceso neoplásico, desde división y proliferación celular, hasta destrucción tisular e invasión metastásica.

Algunos de estos genes y proteínas (marcadores biológicos) involucrados en estas fases, pueden ser útiles como marcadores de la patología y pueden orientar el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del Cáncer.

Los marcadores biológicos, “son alteraciones celulares, bioquímicas o moleculares que se pueden medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos

normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica; el siguiente proyecto tiene como objetivo determinar los índices de proliferación celular para establecer correlaciones con los estadios de cáncer escamocelular de cavidad oral bien diferenciado, moderadamente diferenciado y pobremente diferenciado.

Por otra parte, el desarrollo del estudio presenta un nivel de importancia e innovación elevado para la región y para la Universidad Antonio Nariño, sede Neiva; ya que permite la aplicación de los enfoques teóricos y clínicos con el fin de poder realizar diagnósticos tempranos a través de la caracterización clínica que nos ayuden a redirigir un tratamiento más oportuno de la patología debido a su alta prevalencia en el departamento; por otra parte son muy pocos los estudios relacionados con relación a marcadores de proliferación de cáncer oral a nivel regional, el documento resultante de la investigación servirá como herramienta de consulta y guía para la comunidad de las áreas de la salud en la UAN y otros claustros universitarios con formación a fin al área de la salud.

1. Antecedentes

Narusaka et al (2021), realizaron una investigación la cual se centró en el potencial terapéutico del control del hierro utilizando quelantes de hierro para las CSC en el cáncer de esófago; de acuerdo con los autores entre 134 casos analizados inmunohistoquímicamente, la expresión de Nanog fue alta en 98 casos y baja en 36 casos. La alta expresión de Nanog se correlacionó con supervivencias bajas en general y libres de enfermedad. Los quelantes de hierro deferasirox (DFX) y SP10 suprimieron la proliferación y expresión de marcadores de tallo en células TE8 y OE33; la expresión de Nanog parece estar relacionada con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de esófago, y la inhibición de las secreciones de tallo y la secreción compensatoria de IL-6 por parte de los quelantes de hierro pueden ofrecer una nueva estrategia terapéutica para el cáncer de esófago. no pudo suprimir la expresión de los marcadores de troncalidad (Narusaka, 2021)

Esta Küstner (2019), realizó un estudio de caracterización de marcadores, con miras a poder realizar mejores diagnósticos de las lesiones precancerosas. Este término orienta hacia el potencial o riesgo de malignización (más o menos elevado) de la lesión en cuestión. Sin embargo, los datos que aportan el examen clínico y el estudio histopatológico rutinario no son totalmente satisfactorios. Por esta razón, numerosos investigadores estudian la posibilidad de emplear, de una forma selectiva, otros exámenes más específicos, que permitan valorar las alteraciones celulares (Küstner, 2019).

Aghajani et al (2018), realizó un estudio de caracterización de marcadores, a pesar del creciente interés por las células madre aisladas de pulpa remanente de dientes temporales, aún no se ha establecido un marcador específico para ellas. El estudio tuvo como objetivo investigar si SSEA-4 (antígeno embrionario específico de la etapa) sería un

marcador adecuado para aislar células madre de dientes deciduos exfoliados humanos (SHED) para aumentar su potencial de diferenciación hacia el tejido óseo; los autores concluyeron que los SHED tienen un alto potencial de diferenciación incluso en las células no clasificadas. Aunque los SHED positivos para SSEA-4 mostraron un potencial osteogénico ligeramente mejor, las diferencias no fueron abundantes para vincular la expresión de SSEA-4 con una potencia de diferenciación superior (Aghajani, 2018)

Para Valdez & Brennan (2017), las manifestaciones producto del cáncer oral y su tratamiento tiene consecuencias negativas en la calidad de vida de los pacientes; estos pueden experimentar una disfunción significativa al hablar, tragar, con alteración de la apariencia estética y deterioro sensorial, así como dolor crónico entre otras; el estudio tuvo como objetivo medir la calidad de vida de pacientes con cáncer oral a partir de un cuestionario que mide los diferentes comportamientos que tienen los pacientes a partir de esta patología; los resultados indicaron que los efectos adversos físicos a nivel de cara, habla, voz y la deglución pueden atribuirse al tumor o de procedimientos antes o durante el tratamiento del cáncer, como traqueostomía, dolor por mucositis, xerostomía, amputación de estructuras orales o fibrosis debida a radioterapia, afectando a su vez aspectos físicos y de la atenuación de la voz que hace que el paciente hable ronco, altera la anatomía de la lengua y edema laríngeo crónico (Valdez & Brennan, 2018).

Para Toro & Cortes (2015), la capacidad de autorrenovación y la diferenciación son características de las células madre que varían entre los diferentes tipos celulares según el tejido en el que residen y el microambiente circundante. En estos procesos intervienen inhibidores del ciclo celular, genes implicados en reordenamientos cromosómicos, proteínas de desarrollo esenciales y vías de señalización específicas. La autorrenovación está regulada

por diferentes mecanismos, siendo los más importantes las vías Wnt, Notch y Hedgehog, y los factores BMI – 1, p16^{Ink4a}, ARF, NANOG, OCT3 / 4, HOXB4 y sus parálogos (Acevedo, 2015).

Al igual que Badcock (2014), las células del carcinoma embrionario humano (CE) son las células madre de los teratocarcinomas y son componentes clave de los tumores de células germinales (TCG), se expresan en varios antígenos de glicoproteínas de alto peso molecular que se regulan negativamente tras la diferenciación. Uno de estos antígenos, definido por el anticuerpo monoclonal TRA-1-60, puede detectarse en el suero de pacientes con TCG y proporciona un complemento útil a los marcadores séricos establecidos de gonadotropina coriónica humana y alfa-fetoproteína, especialmente en aquellos pacientes sin niveles elevados de suero humano. gonadotropina coriónica o alfa-fetoproteína. Para examinar la relación del antígeno definido por TRA-1-60 con antígenos similares definidos por otros anticuerpos monoclonales, hemos llevado a cabo análisis comparativos de inmunoprecipitación y transferencia Western de líneas celulares derivadas de GCT humanos con anticuerpos monoclonales TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2 y K21 (Badcock, 2014)

2. Planteamiento del problema

El cáncer de cavidad oral es uno de los tipos de cáncer de cabeza y cuello más comunes que se presentan. Para hablar del cáncer, es necesario aclarar la presentación de éste como una enfermedad en el cuerpo humano. Aparece cuando existe un daño en el ADN, lo que implica que las células no pueden seguir cumpliendo sus funciones de crecimiento, desarrollo, formación y división.

Este daño que se presenta en el DNA puede ser heredado por los padres y producido a su vez por agentes “carcinógenos” o por ambas cosas. Los factores externos podría ser los responsables del 90% de los cánceres. La mitad de estos se producen principalmente por el tabaquismo, el alcoholismo, el sobrepeso o la inactividad física.

Una vez pronunciado el COCE las alteraciones morfológicas, también conocidas como desordenes altamente malignos (DPM) desarrollan un potencial maligno sobre el carcinoma, por lo cual es importante aclarar el papel de las células madre en esta neoplasia, para así poder conocer la influencia de éstas en la diferenciación y progresión del cáncer oral.

El cáncer oral tiene una etiología multifactorial y por lo tanto queremos investigar ¿cuál es el nivel de expresión de los marcadores TRA-1-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en la diferenciación y progresión de las células progenitoras en el desarrollo del cáncer oral? Saber si la expresión de estas células está relacionada con la agresividad del tumor para clasificarlo; bien diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado.

3. Justificación

El cáncer oral incluye carcinoma de células escamosas orales (OSCC), cabeza y cuello. El OSCC, es un cáncer altamente heterogéneo genéticamente, es la sexta neoplasia maligna más importante, con una prevalencia mundial anual de 275.000 casos. El OSCC puede recidivar incluso después de décadas de cirugía, radiación, quimioterapia y terapia dirigida. Los factores de riesgo identificados para este tipo de cáncer incluyen masticar tabaco a largo plazo, fumar tabaco e ingerir bebidas alcohólicas. Es por eso por lo que la identificación de los mecanismos responsables de la OSCC es un tema de suma importancia para desarrollar tratamientos más efectivos y mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes que sufren esta enfermedad (HERZUMA, 2020).

Estudios previos han demostrado que algunas proteínas se expresan como marcadores putativos de CSC en muestras tumorales y líneas celulares de OSCC. Por lo tanto, estos marcadores podrían utilizarse para detectar y enfocar CSCs en el tumor OSCC. (SEOM, 2020). Hay múltiples marcadores en las células madre que juegan un papel clave en la OSCC. Además, estos marcadores están asociados con otros marcadores o vías que conducen a la displasia epitelial. Por lo tanto, se necesitan más estudios para investigar estos marcadores.

El avance en oncología molecular ha mejorado el conocimiento de la tumorigénesis; sin embargo, la utilización práctica de estos marcadores genéticos en el diagnóstico de displasia oral sigue sin resolverse. Aunque se han estudiado muchas moléculas como marcadores intermedios, ninguna de ellas se ha utilizado con fines diagnósticos en la práctica clínica habitual. Hay estudios limitados que investigan la correlación de los marcadores genéticos en el nivel molecular con los índices clínicos y los resultados.

Por lo tanto, se necesitan más estudios para promover estos marcadores para que puedan ser utilizados rutinariamente con mayor sensibilidad, previsibilidad y reproducibilidad.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Identificar marcadores TRA-I-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en células madre cancerígenas de pacientes diagnosticados con cáncer oral.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar las células madre en las muestras de cáncer oral.
- Medir los niveles de expresión de los marcadores, TRA-I-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en las células madre.
- Correlacionar los niveles de expresión en las muestras que tuvieron células madre.
- Establecer niveles de marcadores en las muestras de células madre.

5. Marco teórico

5.1. Generalidades

El cáncer es uno de los problemas que más aqueja a la salud pública. A su vez es una patología que constituye un gran reto en la investigación biomédica. A pesar de los grandes avances logrados hasta el presente, tanto en lo concerniente a los mecanismos moleculares implicados en su origen y evolución, como en el desarrollo de nuevos tratamientos más específicos y efectivos, esta enfermedad todavía no se ha logrado controlar plenamente (OMS, 2021).

Dentro de esta realidad se sigue investigando y hoy resaltan los estudios con las células madre, las cuales han abierto nuevas posibilidades al confirmarse que estas células, en su forma malignizada, constituyen una subpoblación del conjunto de todas las células que forman un tumor canceroso.

En este sentido, la presentación del marco teórico estará enfocada en poder establecer unos antecedentes que muestren el estado del arte sobre este tema en cuanto investigación se refiere. En primer lugar, el estudio de Mohajertehran Et Al (2018) realiza unas disertaciones sobre los panoramas en los cuales se encuentra el COCE, a su vez pone en manifiesto la promesa de los marcadores TRA-I-60, OCT-4, NANOG y S SEA-4 en las células madre que se encuentran en diagnóstico, así como el tratamiento de la displasia epitelial y el carcinoma de células escamosas orales (Mohajertehran, 2018).

En el caso del cáncer oral, se presenta como el carcinoma oral de células escamosas, también conocido como COCE. Este cáncer es el que más se presenta en la cavidad oral, tanto así que la Organización Mundial de la Salud, (2005) la define como una neoplasia epitelial invasiva con diferentes grados de diferenciación escamosa y propensa metastatizar hacia los ganglios linfáticos en un estado temprano, teniendo presencia constante entre los 50 y 60 años de vida.

La presencia de este cáncer sobre la salud pública ha instaurado que se atienda el caso de manera más rigurosa, ya que cantidad de casos han aumentado en esta última década y se esperan, según estudio de la Fuente, J.; Muñoz, P.; Patrón, C.; Rojas, H.; Ramírez, M.; & Acosta, L. (2014) que para el 2020 se presenten 15 millones de nuevos casos.

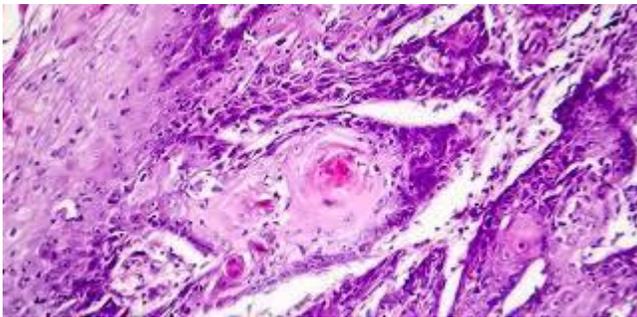
Por tal motivo es importante resaltar esta problemática en el campo de la salud bucal, ya que este cáncer puede tener factores de riesgo que actúan como factores carcinógenos. Así mismo el COCE puede presentarse por lesiones o algunas condiciones precancerosas. Es de importancia poder resaltar que los hábitos alimenticios, las bebidas y el consumo de tabaco hacen que el cáncer se presente como una secuencia de mutaciones, también del intercambio de entre varios carcinógenos y promotores.

Una vez pronunciado el COCE las alteraciones morfológicas, también conocidas como desordenes altamente malignos (DPM) desarrollan un potencial maligno sobre el carcinoma, por lo cual es importante aclarar el papel de las células madre en esta neoplasia, para así poder conocer la influencia de éstas en la diferenciación y progresión del cáncer oral.

Esto se debe a que los estudios que se han venido realizando para tratar de salvar la vida de los pacientes que sufren de esta enfermedad le han apostado a métodos más efectivos, sin embargo esto se puede saber gracias a los procesos que se lleven a cabo: las capacidades diagnosticadas de los pacientes, la eficacia de los tratamientos que a su vez tienen una dependencia de las estrategias terapéuticas, así como del riesgo de recaída, el tiempo del diagnóstico y la metástasis de ganglios linfáticos. (Patel, 2014)

El carcinoma de células escamosas

Figura 1. Carcinoma de células escamosas



Nota. Carcinoma oral de células escamosas (Shutterstock), Oreamuno (2017)

Es la entidad maligna de mayor frecuencia en la región orofacial (alrededor del 90%), y aunque su incidencia es menor a la de otros tipos de cáncer, su importancia radica en su mortalidad y las secuelas físicas y psicológicas que origina. Puede presentarse como carcinoma *in situ* (no invasivo) o poseer características invasivas. Histológicamente los carcinomas invasivos son bien diferenciados, moderadamente diferenciados, poco diferenciados o indiferenciados (Sidrón A & Pérez M.L, 2015).

5.2. Marcadores de Células Madre

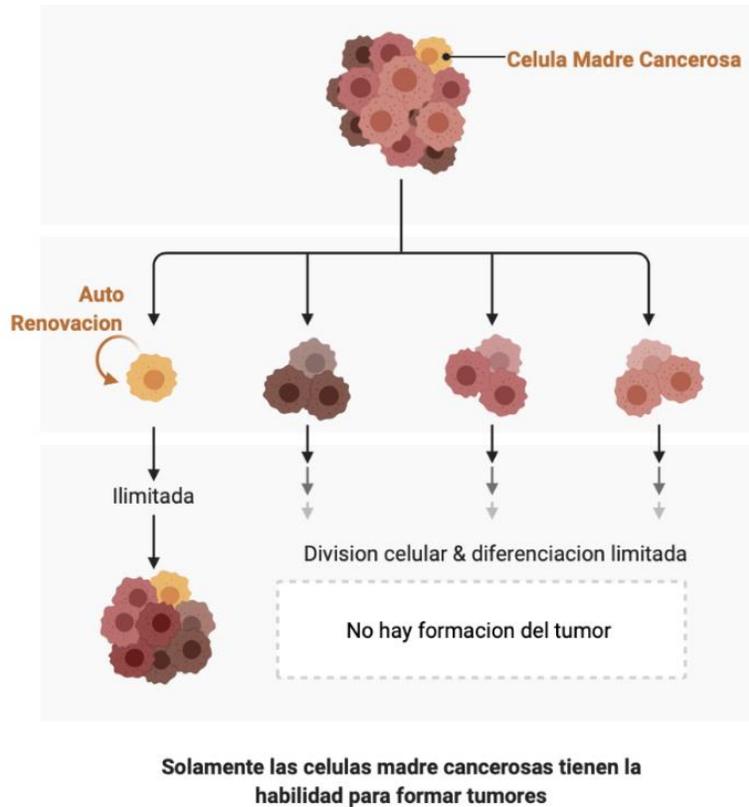
Los marcadores de células madre son productos de expresión génica que son únicos relacionadas con las células madre. Las células madre también se identifican como únicas ciertos marcadores (Fernández, 2008).

Los marcadores únicos de las células madre se sugieren a ser los componentes de una red reguladora básica de factores en las células madre embrionarias que son responsables de la auto renovación, mantenimiento de estado indiferenciado y reprogramación de células adultas (Hernán & Dorticós B, 2004).

Similares a las células madre embrionarias, las células madre cancerosas en el cáncer de cavidad oral expresar muchas de estas proteínas básicas de la red reguladora (Alcalá P, 2014)

5.2.1. TRA 1-60

TRA -1-60 es un epítipo de carbohidrato resistente a neuraminidasa expresado en podocalyxin-like 1, que pertenece a la familia de sialomucina relacionada con CD34, y se expresa en la superficie de células madre embrionarias humanas (ESC) y es pluripotente inducido células madre (células IPS), que se regulan a la baja a medida que se diferencian de células (Nakata, Saito, & Maruyama, 2019)



5.2.2. OCT- 4

OCT-4 es el principal factor de transcripción vinculado con el estado stemness y en humanos está localizado en el cromosoma 6 y puede codificar para dos variantes OCT-4A, que se encuentra principalmente en el núcleo, regulando los procesos de autorrenovación y pluripotencia y OCT-4B, que estando localizado en el citoplasma y su función no se vincula con el estado "stemness (Herrera B, 2013).

5.2.3. *NANOG*

NANOG es un importante factor de transcripción de células madre involucrado en el desarrollo humano y la cancerogénesis. Su expresión es compleja y regulada en diferentes niveles. Además, la proteína NANOG podría regular cientos de genes diana al mismo tiempo. NANOG es crucial para la fase de desarrollo preimplantacional y disminuye progresivamente durante la diferenciación de las células madre embrionarias, regulando así el desarrollo embrionario y fetal. Después del nacimiento, NANOG es indetectable o se expresa en cantidades muy bajas en la mayoría de los tejidos humanos.

La reexpresión de NANOG se puede detectar durante la cancerogénesis, ya en lesiones precancerosas, con niveles crecientes de NANOG en displasia de alto grado. Se cree que NANOG permite que las células cancerosas obtengan propiedades similares a las de las células madre, que se cree que son la fuente del crecimiento en expansión, el mantenimiento del tumor, formación de metástasis y recidiva tumoral (Grubelnik, Bostjan, & Pavlic, 2020).

5.2.4. *SSEA-4*

El antígeno embrionario específico de etapa-4 (SSEA-4), un marcador específico para las células madre pluripotentes, juega un papel importante en el comportamiento maligno de varios tipos de cáncer.

6. Diseño metodológico

Es una investigación experimental porque se van a realizar parámetros cuantificables.

6.1. Tipo De Estudio

Esta investigación es de tipo experimental descriptiva de corte transversal, en la cual se tienen diferentes grupos donde se comparan y se describen parámetros cuantificables. De corte transversal porque la muestra tomada corresponde a pacientes que fueron atendidos en el hospital universitario Hernando Moncaleano de Neiva con cáncer en cavidad oral como faringe, laringe, lengua, epiglotis en el año 2014-2016.

6.2. Población

36 muestras de láminas en parafina que fueron recolectadas de pacientes diagnosticados con cáncer oral.

6.2.1. Muestra

Corresponde a 20 muestras de pacientes con cáncer oral.

6.3. Criterios

6.3.1. *Criterios De Inclusión*

Se seleccionaron los pacientes que fueron atendidos en el hospital universitario Hernando Moncaleano de Neiva con cáncer en cavidad oral como faringe, laringe, lengua, epiglotis en el año 2014-2016.

6.3.2. *Criterios de exclusión*

Todos los pacientes que no fueron diagnosticados con cáncer en cavidad oral. Se excluyeron también los pacientes con cáncer de labio ya que está relacionado con la exposición solar y otros factores.

6.4. Descripción de procedimientos

Las muestras que se utilizaron en esta investigación fueron clasificadas de acuerdo con lineamientos internacionales, dados por el Dr. Fernando Bolaños, Patólogo Adscrito al Departamento de Patología del HUHMP

6.4.1. *Toma de la muestra, procesamiento de la muestra*

Los cortes de 5 μm fueron desparafinados de forma rutinaria y posteriormente rehidratados. Se realizó la recuperación antigénica en tampón 10 mm citrato buffer, Ph 6.0 durante 15 minutos en olla de presión eléctrica; las láminas se incubaron en H₂O₂ 1% por 15 minutos, para bloquear la peroxidasa endógena. En seguida se usó BSA 3% por una hora

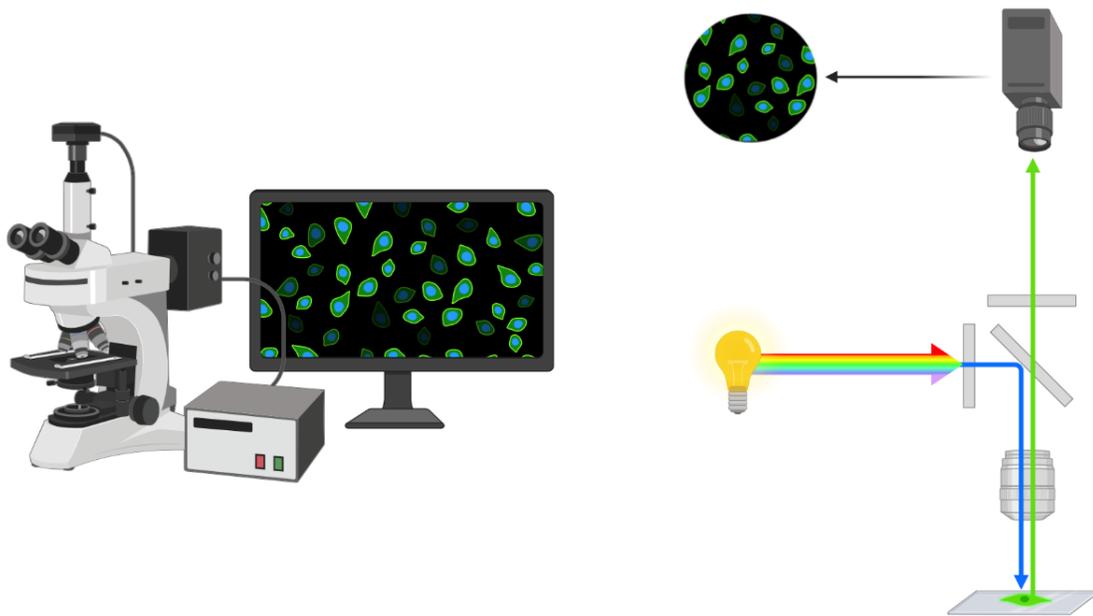
para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se dejaron en incubación durante la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondientes (antiTral-60, anti-OCT- 4, anti NANOG, anti-S SSE-4), en una dilución 1:100 en BSA 1%.

Los controles negativos se incubaron solamente con BSA 1% sin el anticuerpo secundario complementario. Se uso el anticuerpo secundario policlonal antimouse desarrollado en conejo, acoplado a la enzima HRP (peroxidasa de rábano). Las reacciones fueron reveladas con el complejo revelador dako en visión. Para esto se hizo una combinación 1 ml de tampón sustrato con 1 gota (20ml) de cromógeno líquido dab (diaminobenzidina) (dakocytomation inc., carpenteria, ca, usa).

6.5. Análisis de los datos

La intensidad de las reacciones fueron medidas en pixeles utilizando el programa Image J. Se comparo la expresión de los marcadores con el grupo de control de tejido sano. Se tuvo en cuenta las medidas de la intensidad en pixeles y se compararon las diferencias entre los grupos utilizando un análisis de varianza.

Figura 2. Equipos de análisis de datos



Fuente: Autor

6.6. Aspectos éticos de la investigación

Este estudio está en la categoría de investigación con riesgo mínimo: estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico o tratamientos rutinarios, entre los que se consideran: pesar al sujeto, de conformidad con el artículo 47-48 (de la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y cadáveres de seres humanos) y del artículo 11 siendo esta investigación sin riesgo. Contemplado en la resolución 8430 de 1993. La realización de este trabajo está acorde con las normas rectoras de la investigación

clínica vigente a nivel nacional e internacional, de la declaración de Helsinki de 1964 adaptada a su última enmienda en 2004.

Esta investigación ofrece nuevos datos sobre la participación de células progenitoras en la etiología del cáncer oral, área aún poco explorada que merece atención, por la gravedad de esta patología y su etiología multifactorial; el hospital universitario Hernando Moncaleano al brindarnos acceso a los datos de las historias clínicas y muestras de tejido en parafina, ya almacenadas nos brindará un banco de tejidos con gran información biológica latente que merece ser estudiada. Por otro lado, con este proyecto se plantea una integración importante de la investigación clínica y básica, será desarrollado por un grupo interdisciplinario que permitió un trabajo desde varias ópticas. Además, la presentación en congresos y en publicaciones permitirá divulgación de los resultados aquí obtenidos.

Por tratarse de un estudio retrospectivo no se tendrá contacto en ningún momento con los pacientes, y todas las variables sociodemográficas y biológicas serán manejadas de forma ética y responsable, de acuerdo con los lineamientos contenidos en el acuerdo de confidencialidad.

7. Resultados

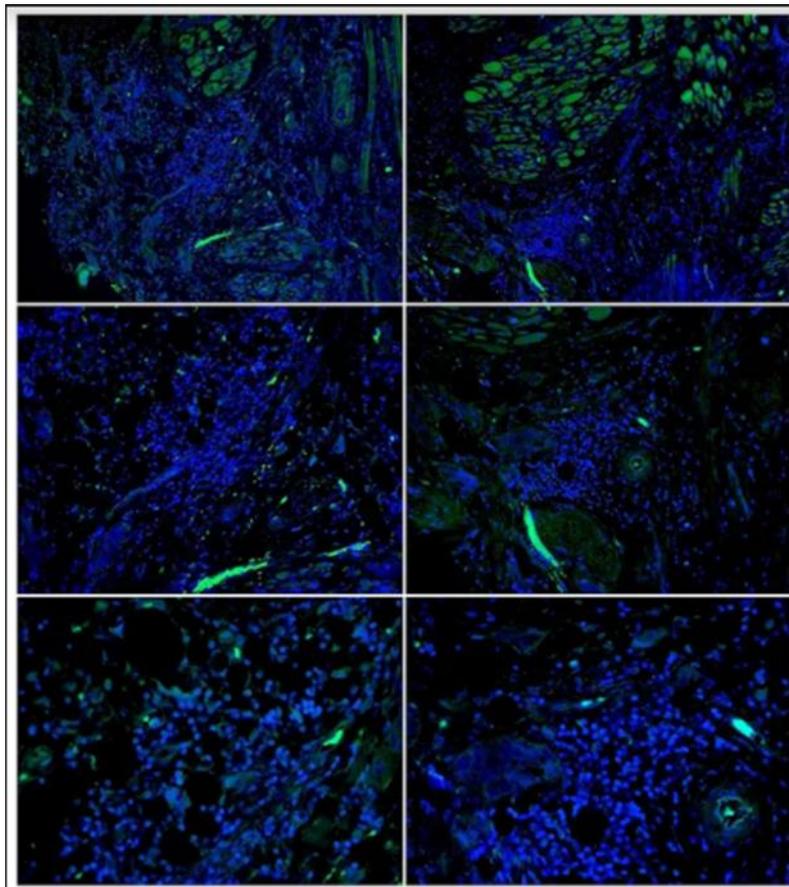
En esta etapa se tienen cortadas el material para realizar los análisis histológicos, se tomaron 20 muestras correspondientes a bloques de biopsias de pacientes con cáncer de cavidad oral.

De las 20 muestras se cortaron 120 láminas con tejido teñido con Hematoxilina y Eosina y Láminas en Blanco quedando listas para la realización de las reacciones de inmunofluorescencia para cuando tengamos los anticuerpos.

7.1. Marcador TRA

7.1.1. Bien diferenciado.

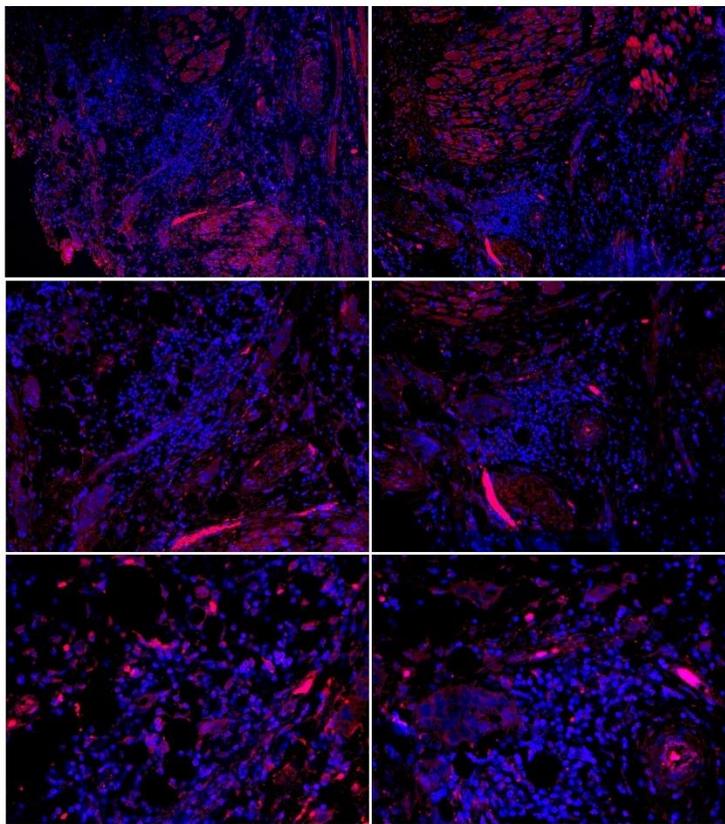
Figura 3. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 3 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 con el marcador TRA-I-60.

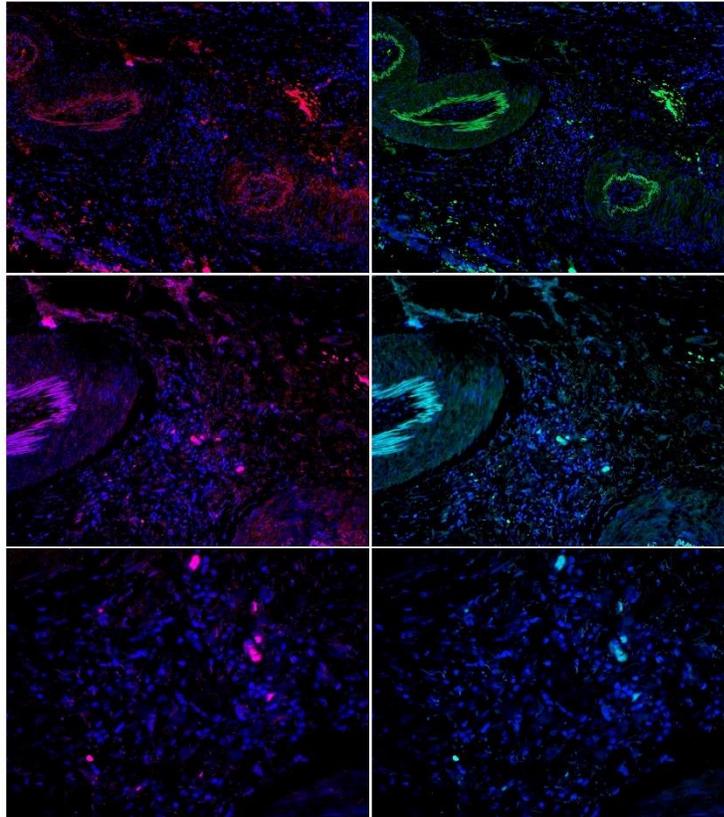
Figura 4. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 4 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 para el marcador TRA-I-60.

Figura 5. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.

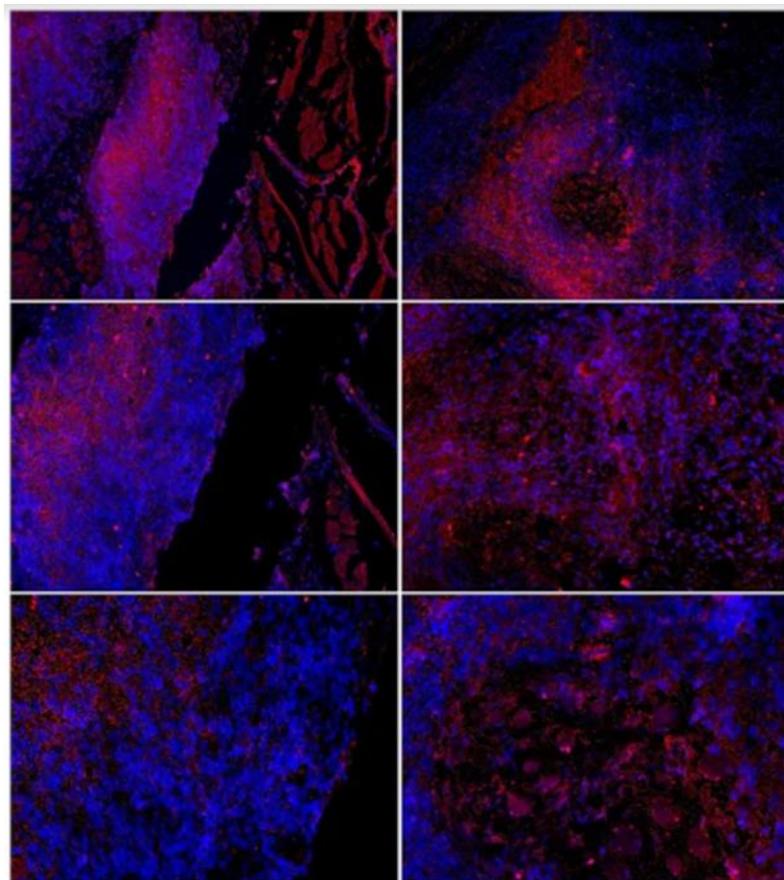


Fuente: Programa Image J.

La figura 5 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células BD en el campo C3, de la plancha 3596 con el marcador TRA-I-60.

7.1.2. *Moderadamente diferenciado.*

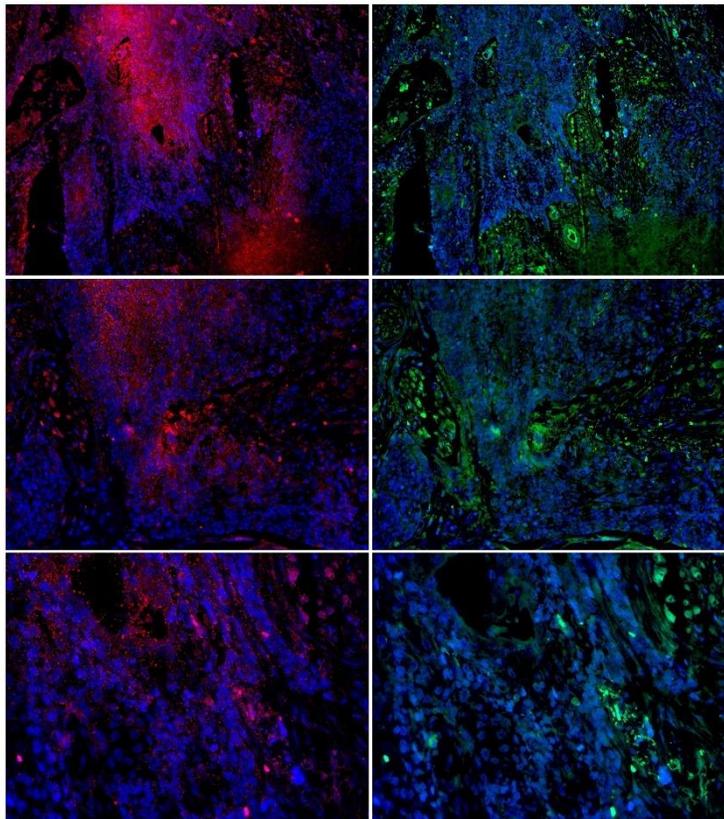
Figura 6. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 6 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células MD entre el campo C1-C2, de la plancha 1975 para el marcador TRA-I-60.

Figura 7. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC.

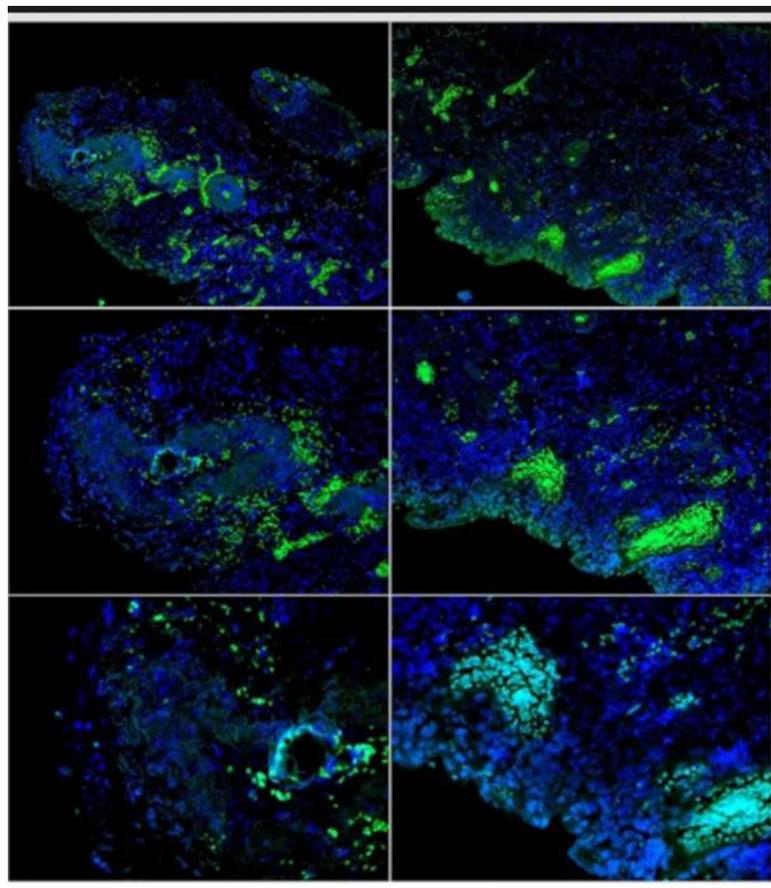


Fuente: Programa Image J.

La figura 7 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células MD en el campo C3, de la plancha 1975 con el marcador TRA-I-60.

7.1.3. Pobremente diferenciado.

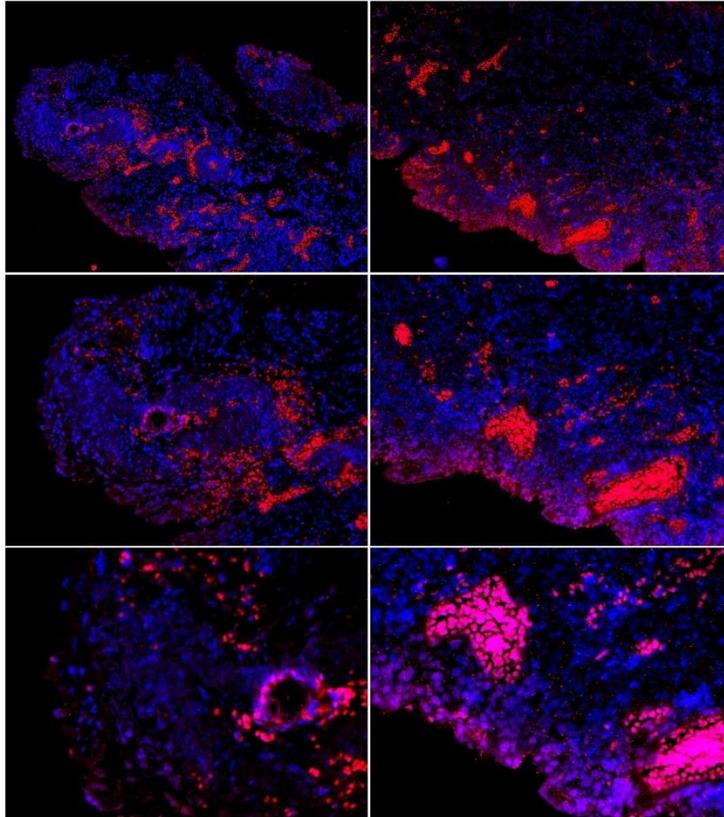
Figura 8. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 8 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60.

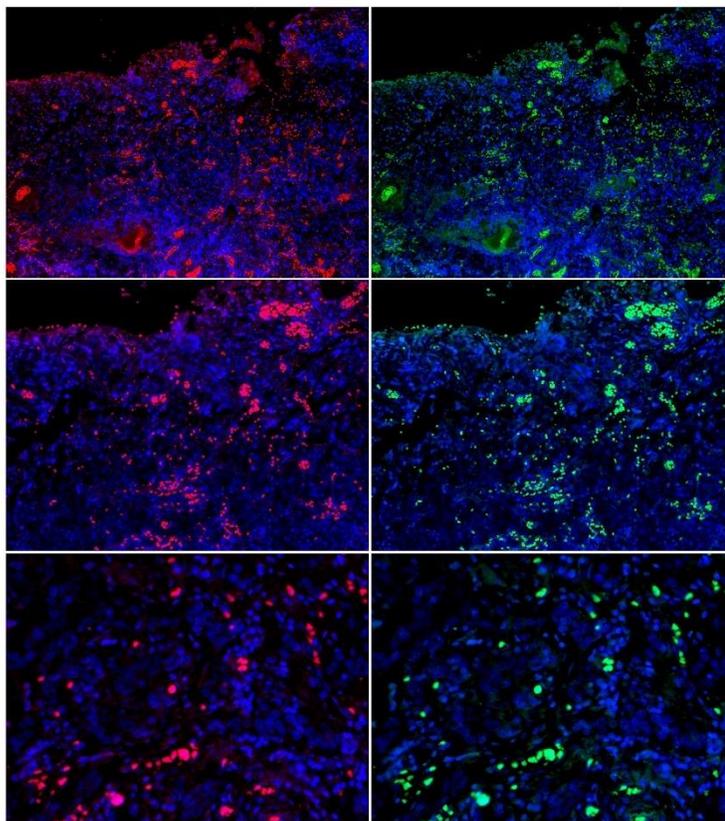
Figura 9. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 9 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60.

Figura 10. Marcación para el anticuerpo TRA-I-60 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC.



Fuente: Programa Image J.

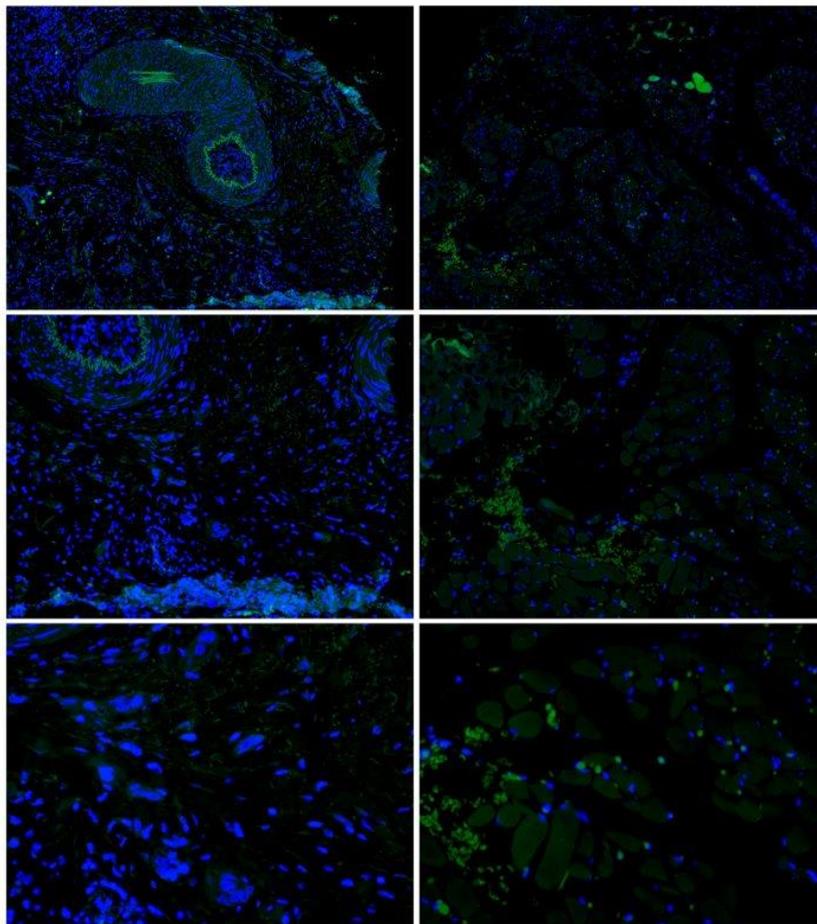
La figura 10 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 6718 con el marcador TRA-I-60.

7.2. Marcador NANOG.

La marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular pobremente diferenciado.

7.2.1. Bien diferenciado.

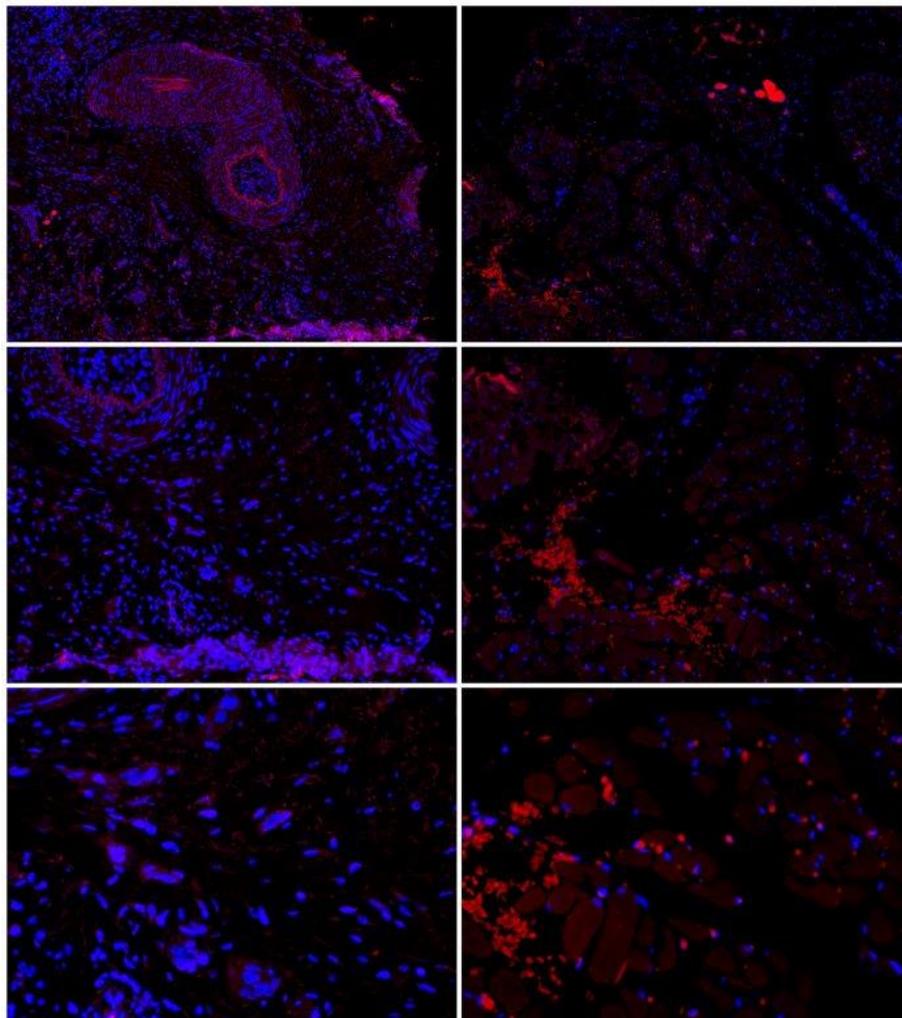
Figura 11. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 11 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 con el marcador NANOG.

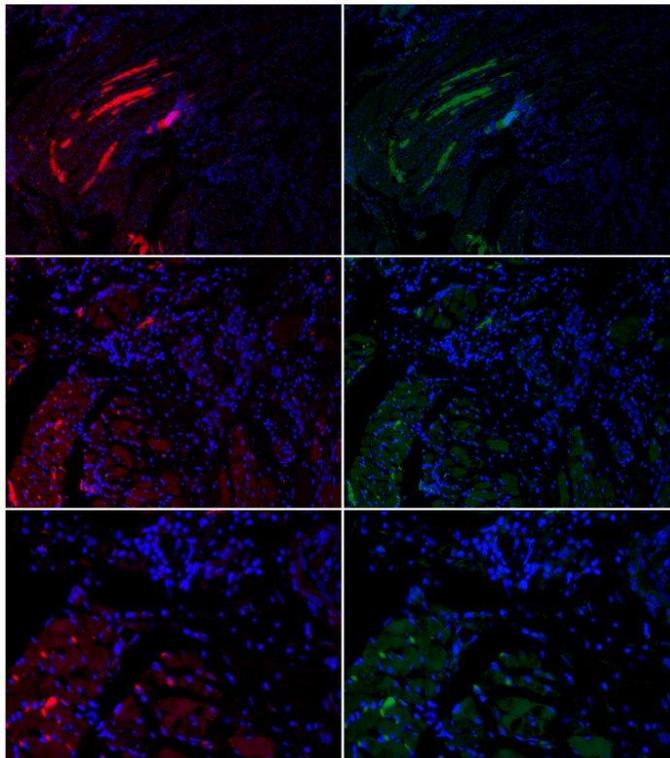
Figura 12. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 12 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 para el marcador NANOG.

Figura 13. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.

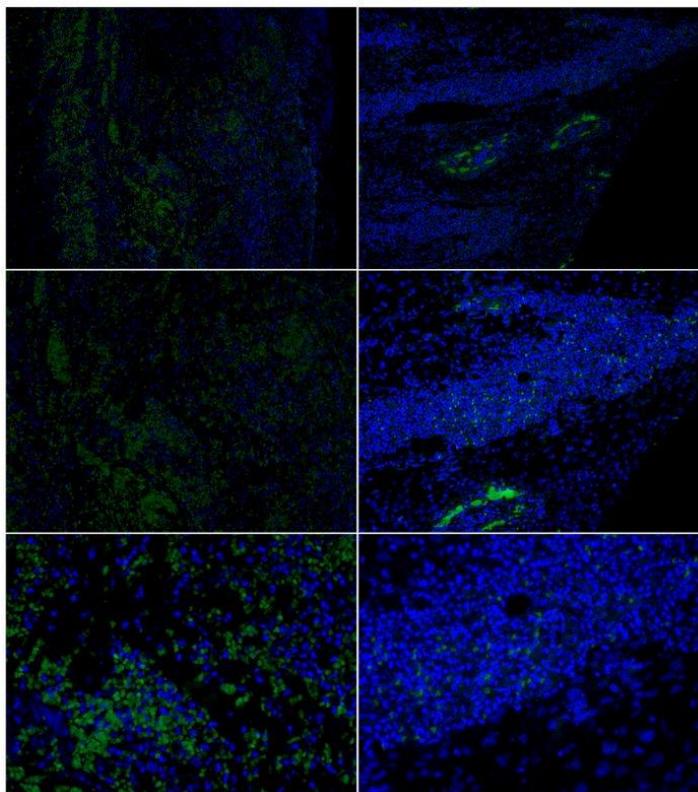


Fuente: Programa Image J.

La figura 13 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células BD en el campo C3, de la plancha 3596 con el marcador NANOG.

7.2.2. *Moderadamente diferenciado.*

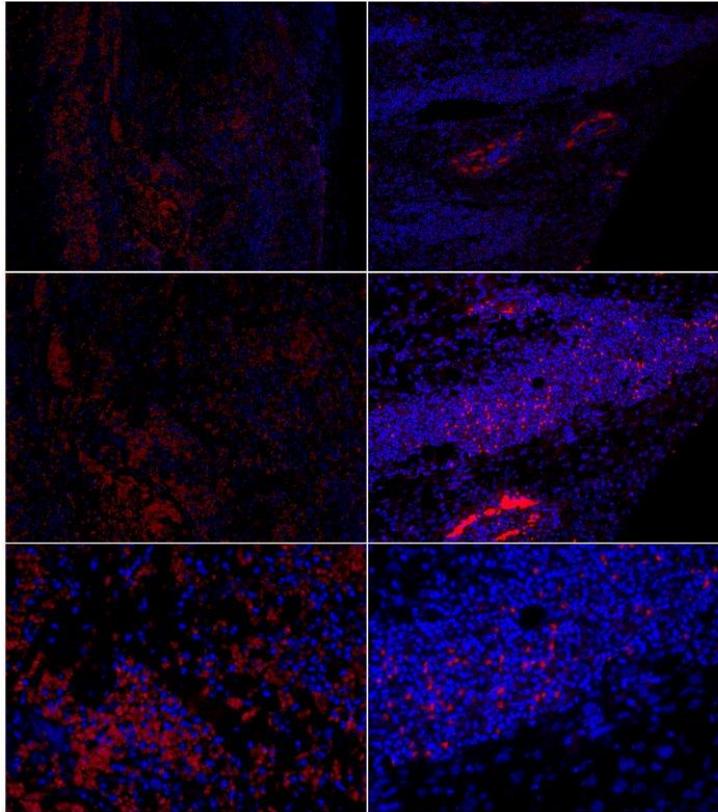
Figura 14. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD- 2223 FIT- C1-C2.



Fuente: Programa Image J.

La figura 14 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células MD en el campo C1-C2 de la plancha 2223.

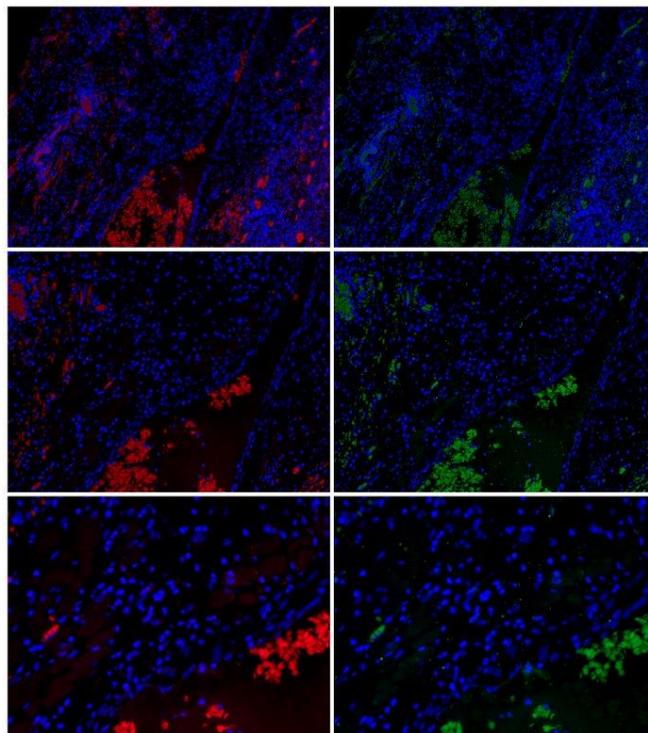
Figura 15. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD, **2223 C1-C2 DSRED**.



Fuente: Programa Image J.

La figura 15 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células MD entre el campo C1-C2, de la plancha 2223 para el marcador NANOG.

Figura 16. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular MD-2223, C3 DSRED-FITC.

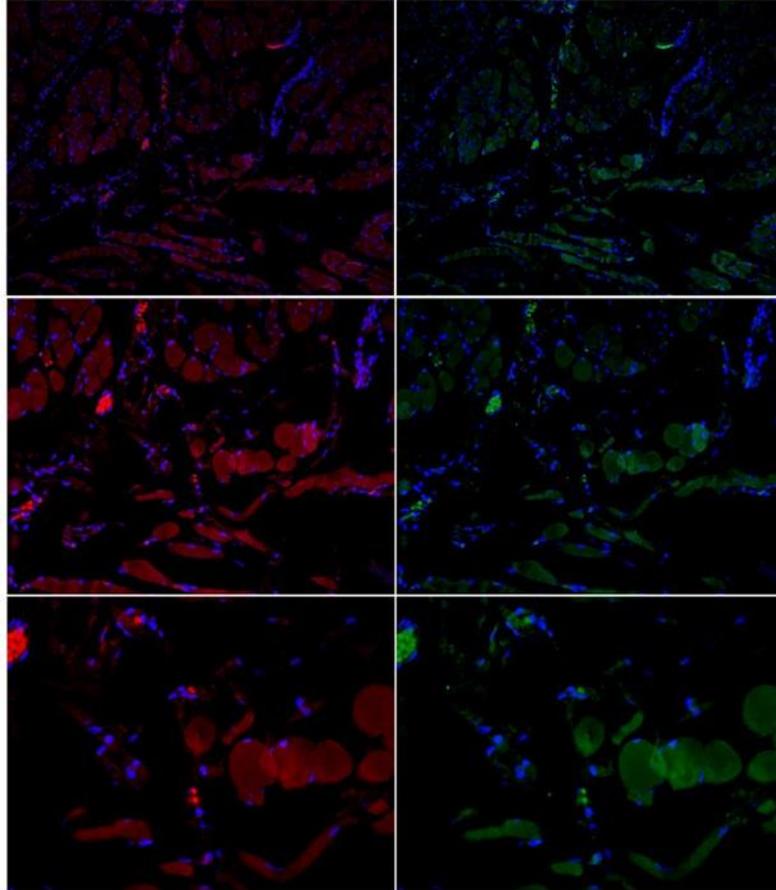


Fuente: Programa Image J.

La figura 16 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células MD en el campo C3, de la plancha 2223 con el marcador NANOG.

7.2.3. Pobremente diferenciado

Figura 17. Marcación para el anticuerpo NANOG en carcinoma escamo celular PD 3074, C3 DSRED-FITC.



Fuente: Programa Image J.

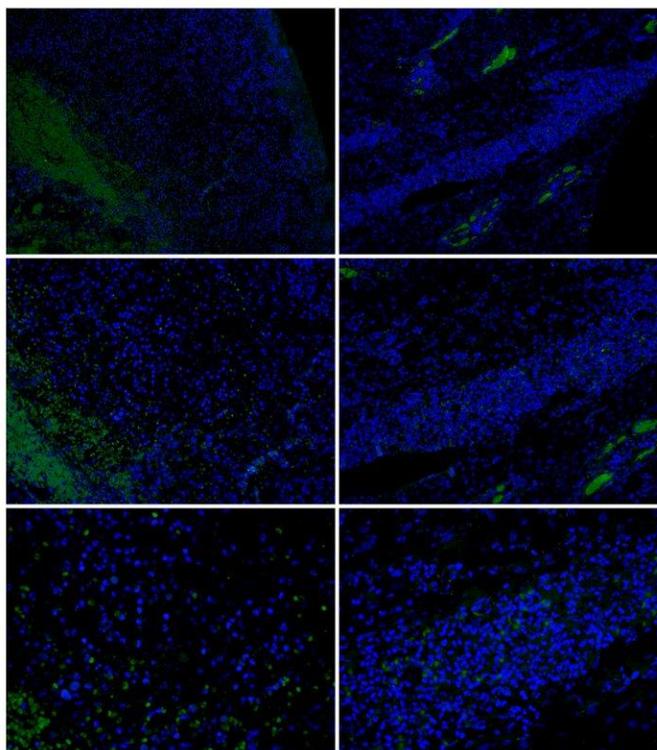
La figura 17 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 3074 con el marcador NANOG.

7.3. Marcador OCT-4.

7.3.1. *Bien diferenciado.*

7.3.2. *Moderadamente diferenciado.*

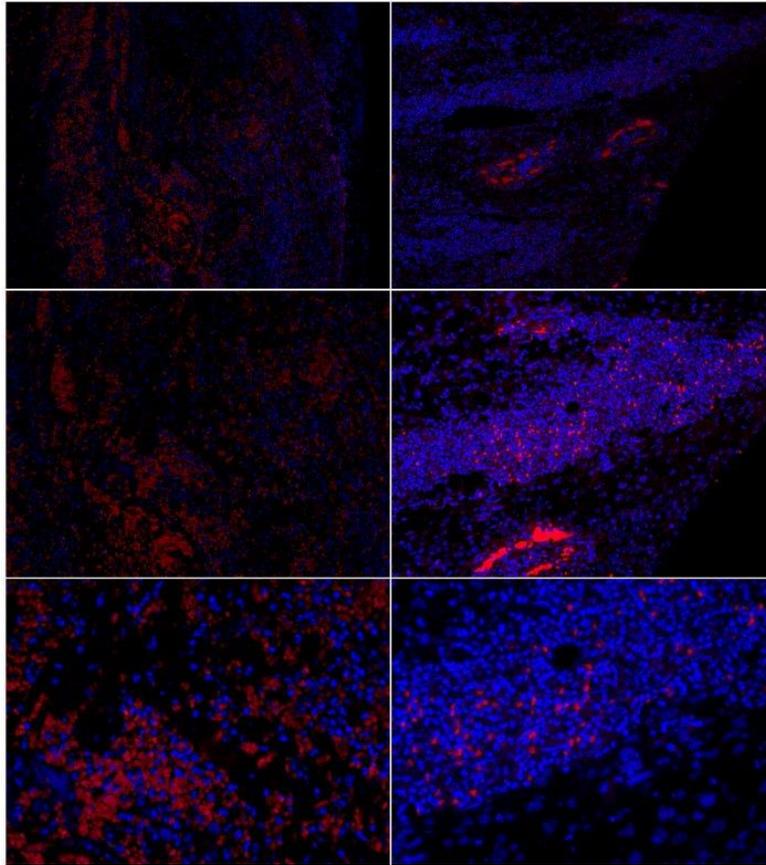
Figura 18. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular 1975 MD, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 18 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células MD en el campo C1-C2 de la plancha 1975.

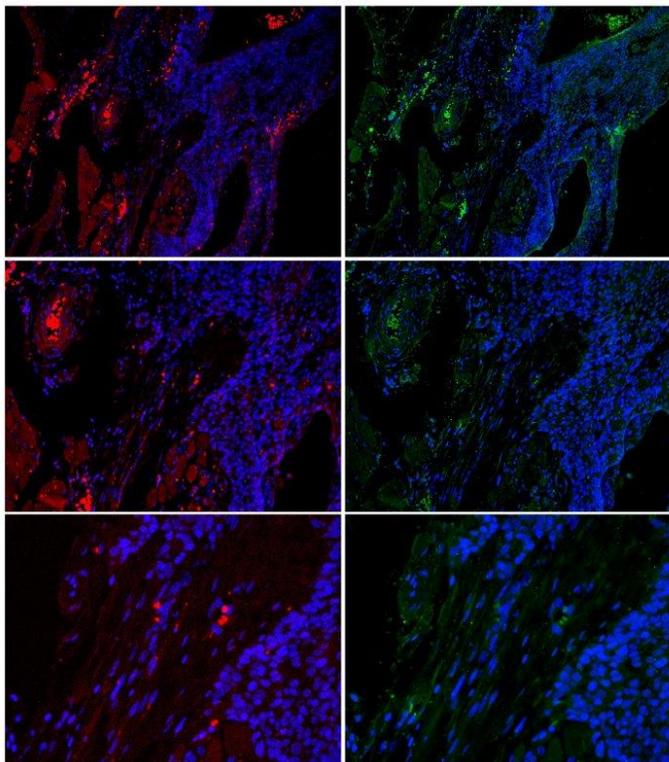
Figura 19. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular MD, 2223 C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 19 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células MD entre el campo C1-C2, de la plancha 2223 para el marcador OCT4.

Figura 20. Marcación para el anticuerpo OCT4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C2 DSRED-FITC.

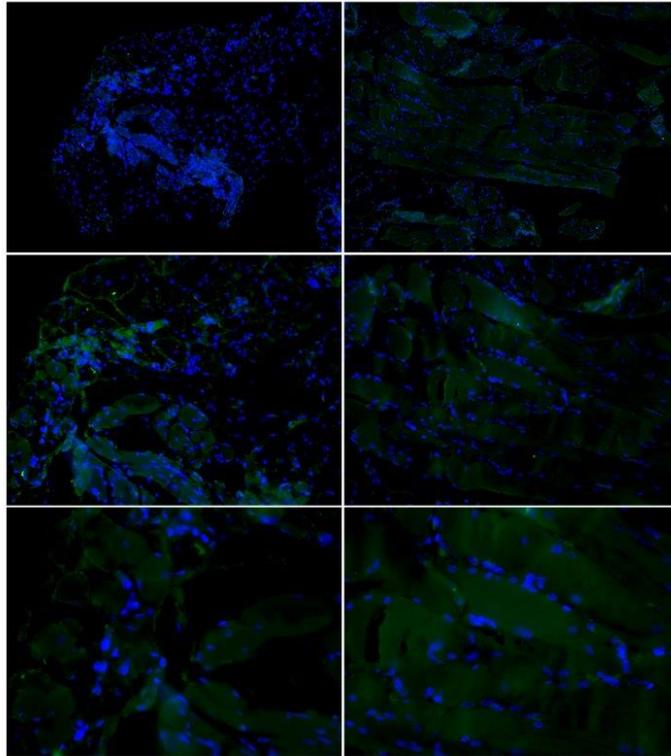


Fuente: Programa Image J.

La figura 20 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 1975 con el marcador OCT4.

7.3.3. Pobremente diferenciado.

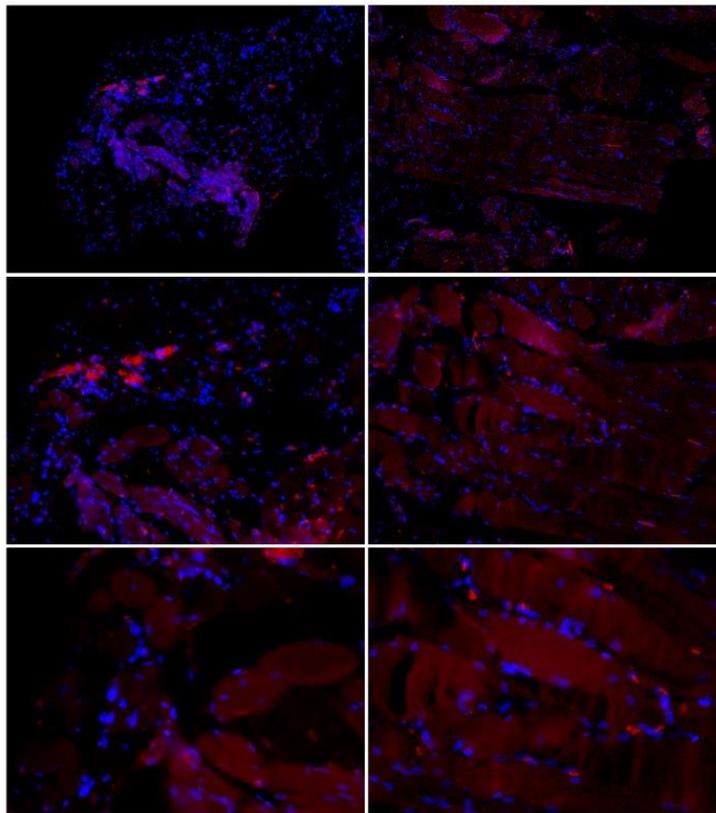
Figura 21. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular PD 3074, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 21 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 3074 con el marcador OCT-4.

Figura 22. Marcación para el anticuerpo OCT-4 en carcinoma escamo celular PD 3074, C1-C2 DSRED.



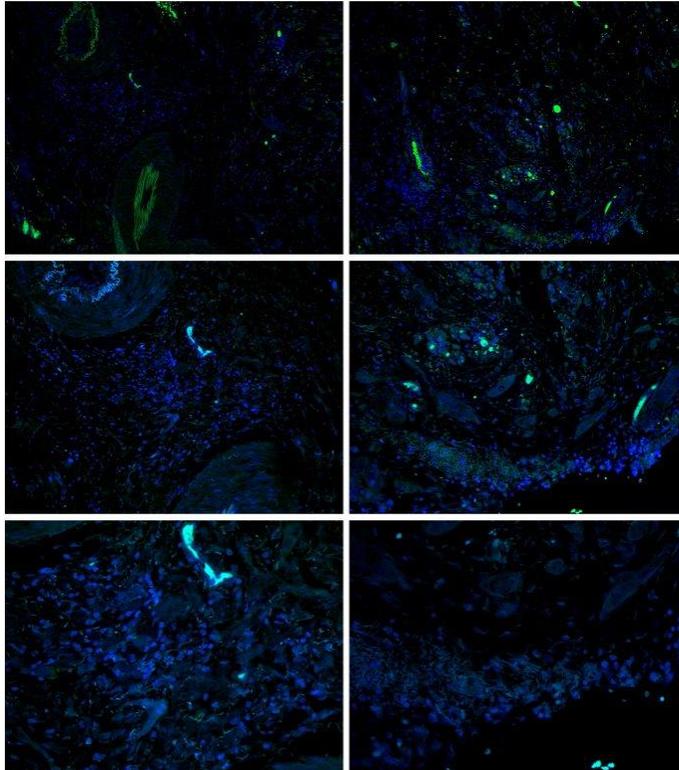
Fuente: Programa Image J.

La figura 22 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 3074 con el marcador OCT4.

7.4. Marcador SSEA4.

7.4.1. Bien diferenciado.

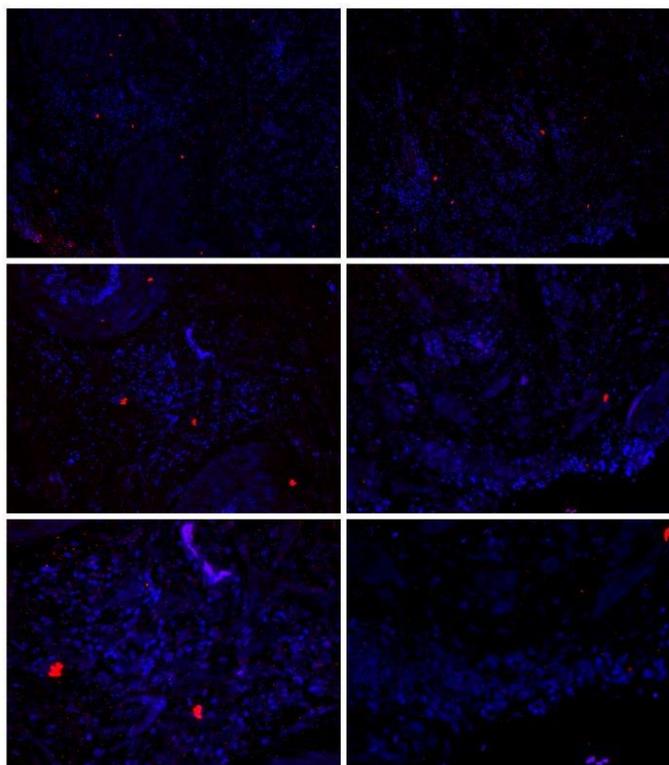
Figura 23. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular 3596 BD, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 23 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 con el marcador SSEA4.

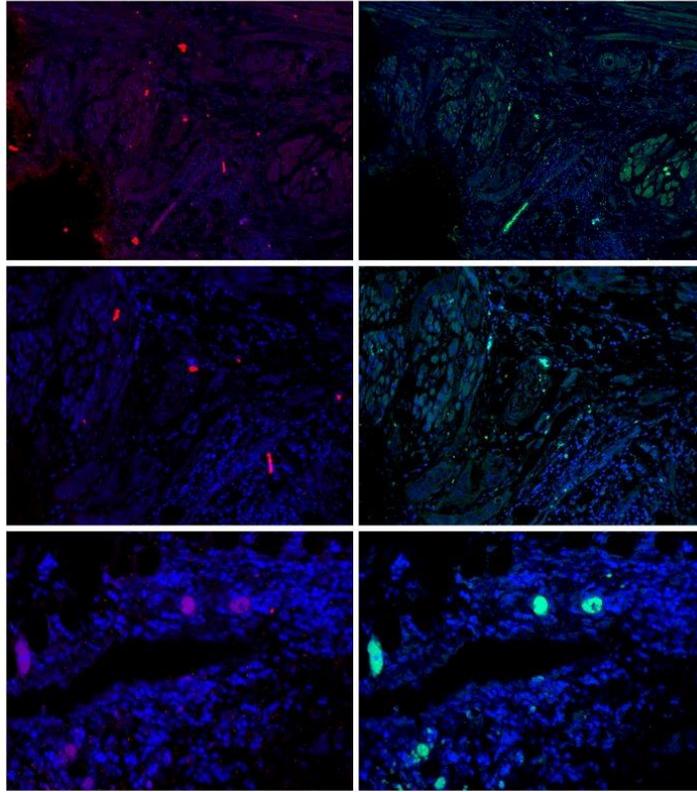
Figura 24. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 24 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 3596 para el marcador SSEA4.

Figura 25. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular BD, 3596 C3 DSRED-FITC.

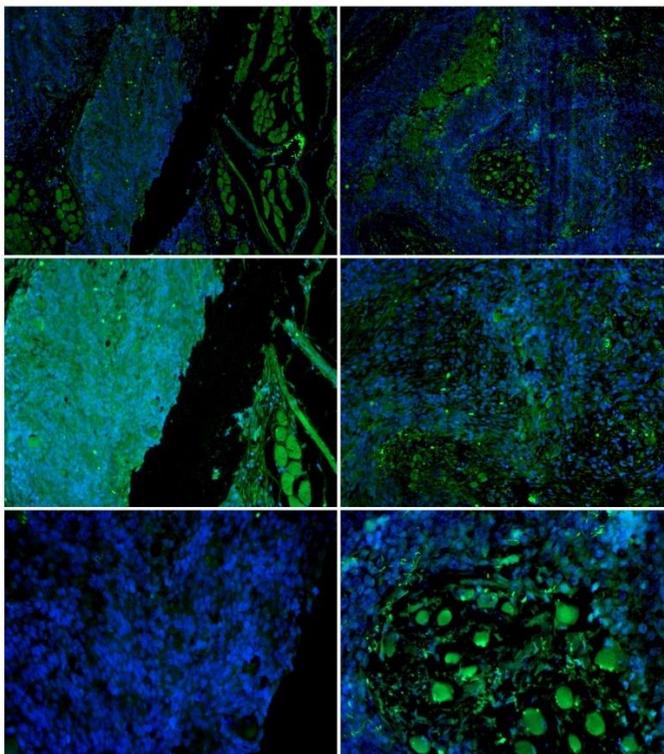


Fuente: Programa Image J.

La figura 25 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células BD en el campo C3, de la plancha 3596 con el marcador SSEA4.

7.4.2. *Moderadamente diferenciado.*

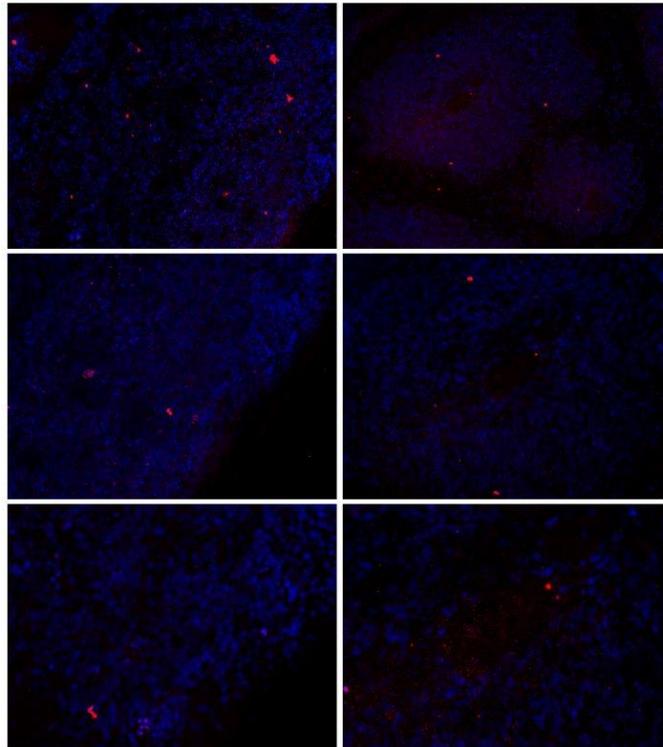
Figura 26. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular 1975 BD, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 26 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color verde de las células BD entre el campo C1-C2, de la plancha 1975 con el marcador SSEA4.

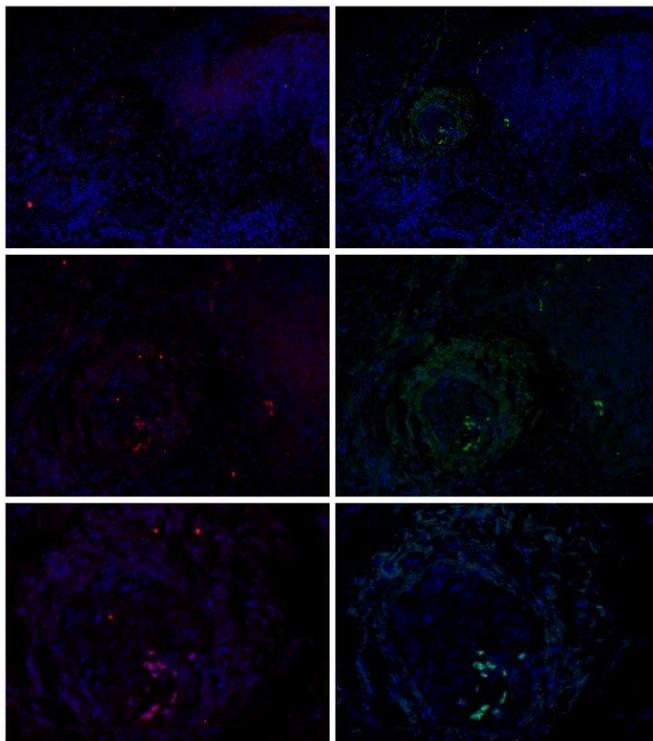
Figura 27. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C1-C2 DSRED.



Fuente: Programa Image J.

La figura 27 muestra la marcación con Inmunofluorescencia de color rojo de las células MD entre el campo C1-C2, de la plancha 1975 para el marcador SSEA4.

Figura 28. Marcación para el anticuerpo SSE4 en carcinoma escamo celular MD-1975, C3 DSRED-FITC.

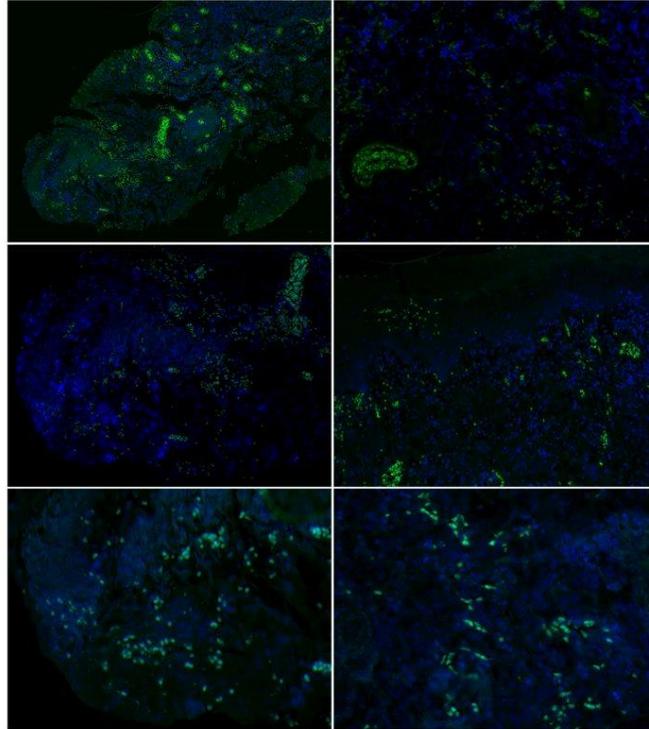


Fuente: Programa Image J.

La figura 28 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células MD en el campo C3, de la plancha 1975 con el marcador SSEA4.

7.4.3. Pobremente diferenciado.

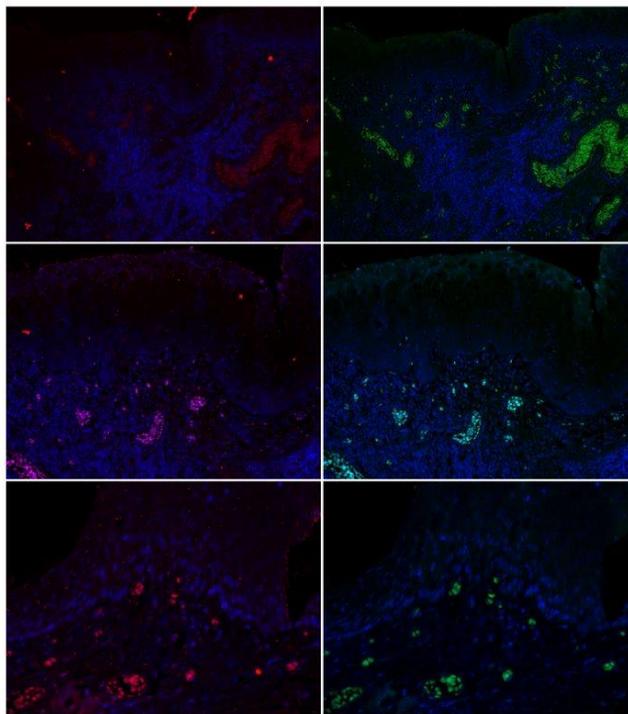
Figura 29. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular PD 6718, C1-C2 FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 29 muestra la marcación con Inmunofluorescencia verde de las células PD en el campo C1-C2, de la plancha 6718 con el marcador SSEA4.

Figura 30. Marcación para el anticuerpo SSEA4 en carcinoma escamo celular PD 6718, C3 DSRED-FITC.



Fuente: Programa Image J.

La figura 30 muestra la marcación con Inmunofluorescencia color rojo/verde de las células PD en el campo C3, de la plancha 6718 con el marcador SSEA4.

7.5. Cuantificación de la fluorescencia.

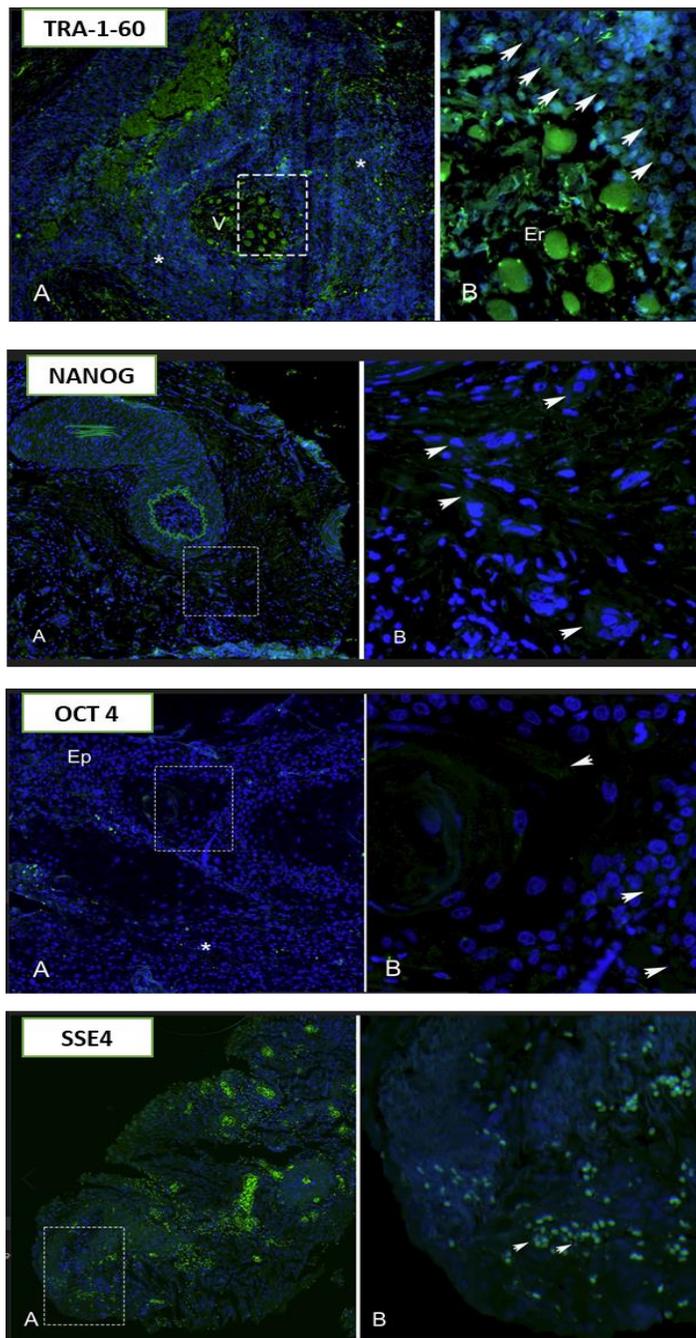
Por tratarse de material proveniente de biopsias de pacientes previamente fijadas con formol, incluidas en parafina y sometidas a desnaturalización de las proteínas, es difícil obtener una buena extracción de estas para realizar técnicas más precisas como el Western Blotting que requieren un preparado fresco y preservado con inhibidores de proteasas para tener buenos resultados. Por esta razón se cuantificó la fluorescencia obtenida previamente con la marcación específica de las proteínas, cuyo anticuerpo se usó en el canal verde (FITC).

Para tal fin se capturaron imágenes en el aumento de 10X y posteriormente fueron analizadas en el programa FIJI (<https://imagej.net/software/fiji/>) de libre distribución. Se resalto el brillo y contraste para eliminar el fondo (background) con fluorescencia inespecífica. Una vez las tres imágenes fueron procesadas, se seleccionó.

Enseguida en la opción análisis del programa se usó el plugin ROI (región de interés) para seleccionar un área de 2 pulgadas cuadradas representativas del tejido en cada lamina, enseguida se usó el plug in Plot Profile, que me muestra la intensidad de la Fluorescencia en el área seleccionada. Las figuras de los diferentes estadios tuvieron la misma área de selección de una región representativa del tejido y fueron sometidas al mismo análisis.

Los plots y las imágenes seleccionadas fueron agrupadas y organizadas en el programa Photoshop para su presentación final de acuerdo con la siguiente figura 20.

Figura 31. Cuantificación de la fluorescencia mediante plots.



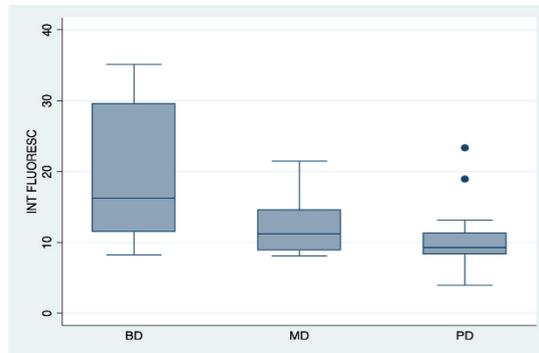
Fuente: Programa Image J

Con respecto a la figura 31, la imagen (a) muestra las células Bien diferenciado (BD), la imagen (b) moderadamente diferenciado (MD) y la imagen (c) pobremente diferenciado.

7.5.1. Niveles de marcadores y correlación.

De acuerdo con el análisis gráfico realizado los resultados de los niveles de diferenciación indican:

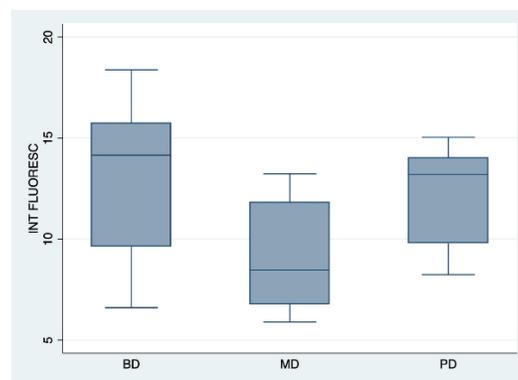
Figura 32. Nivel de diferencia para marcador OCT 4.



Fuente: Programa Image J.

Para el caso del marcador OCT 4 se encontró diferencias significativas entre el Bien diferenciado y pobremente diferenciado.

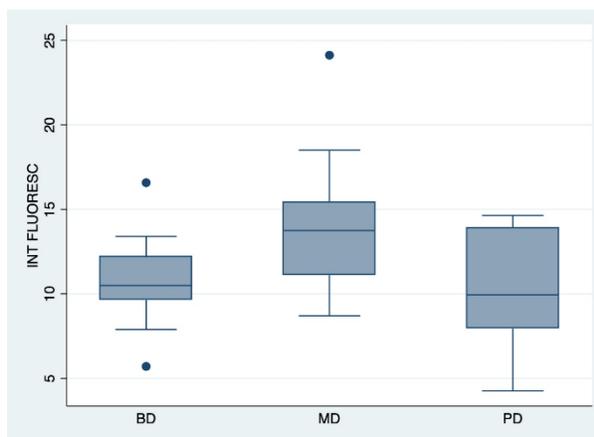
Figura 33. Nivel de diferencia para marcador TRA-1-60.



Fuente: Programa Image J.

Para el caso del marcador TRA-1-60 se encontró diferencias significativas en el Bien diferenciado y el moderadamente diferenciado.

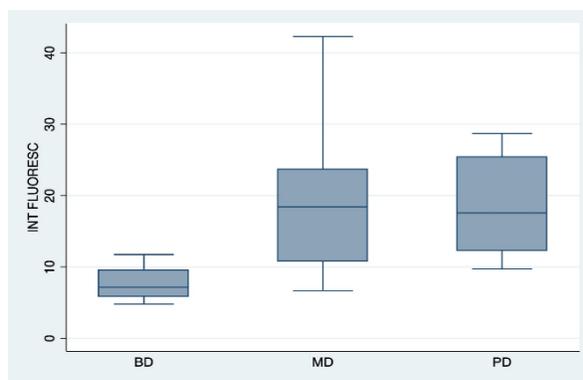
Figura 34. Nivel de diferencia para marcador NANOG



Fuente: Programa Image J.

Para el caso del marcador NANOG se encontró diferencias significativas en el moderadamente diferenciado y el bien diferenciado.

Figura 35. Nivel de diferencia para marcador SSEA4.



Fuente: Programa Image J.

Para el caso del marcador SSEA4 se encontró diferencias significativas en el moderadamente diferenciado y el bien diferenciado.

Para ver si existían diferencias estadísticas entre la intensidad de la fluorescencia de los diferentes grados del carcinoma de cavidad oral, Bien diferenciado (BD),

Moderadamente diferenciado (MD) y Pobrementemente Diferenciado (PD), significativos se usó la prueba de ANOVA. Como variable cuantitativa se tomó intensidad de la fluorescencia, la cual mostro una aparente diferencia entre el grupo bien diferenciado y los otros dos grupos.

Se realizo el análisis de varianza mediante programa SPP (Versión 14), con el fin de determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos, obteniendo los siguientes resultados: marcador TRA-1-60

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	99.1770587	2	49.5885294	5.59	0.0081
Within groups	292.483213	33	8.86312765		
Total	391.660271	35	11.1902935		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 2.2374$ Prob> $\chi^2 = 0.327$

Comparison of INT FLUORESC by GRADC (Bonferroni)		
Row Mean- Col Mean	BD	MD
MD	-3.85825 0.010	
PD	-.818917 1.000	3.03933 0.053

De acuerdo con este resultado el valor de p es < a 0,05 para MD, por lo tanto, la mediana difiere entre los grupos de estudio, con un nivel de significancia de 0.010, que no cumple con criterios de homogeneidad para los estadios BD Y MD.

Los resultados para el marcador NANOG muestran los siguiente:

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	494.733565	2	247.366782	5.35	0.0097
Within groups	1524.4268	33	46.1947515		
Total	2019.16037	35	57.6902961		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.2525$ Prob> $\chi^2 = 0.027$

Row Mean- Col Mean	BD	MD
MD	-7.00075 0.050	
PD	-8.50875 0.013	-1.508 1.000

Para el caso del marcador OCT 4 las pruebas estadísticas muestran lo siguiente:

Source	Analysis of Variance			F	Prob > F
	SS	df	MS		
Between groups	494.733565	2	247.366782	5.35	0.0097
Within groups	1524.4268	33	46.1947515		
Total	2019.16037	35	57.6902961		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.2525$ Prob> $\chi^2 = 0.027$

Row Mean- Col Mean	BD	MD
MD	-7.00075 0.050	
PD	-8.50875 0.013	-1.508 1.000

Para el marcador SSE4 se tienen los siguientes resultados:

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	494.733565	2	247.366782	5.35	0.0097
Within groups	1524.4268	33	46.1947515		
Total	2019.16037	35	57.6902961		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.2525$ Prob> $\chi^2 = 0.027$

Row Mean- Col Mean	BD	MD
MD	-7.00075 0.050	
PD	-8.50875 0.013	-1.508 1.000

Analysis of Variance					
Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	946.672923	2	473.336462	9.69	0.0005
Within groups	1611.72409	33	48.8401239		
Total	2558.39701	35	73.0970574		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 16.0681$ Prob> $\chi^2 = 0.000$

Row Mean- Col Mean	BD	MD
MD	10.9936 0.002	
PD	10.7589 0.002	-.234667 1.000

8. Conclusiones

El cáncer escamo celular de cavidad oral es una patología que afecta de forma dramática a la población que lo padece, lo cual se evidencia en sus manifestaciones orales como dolor intenso, úlceras entre otras.

Es importante que el profesional del área odontológica adquiera conocimientos sobre esta patología que le permitan promover su rol relevante al momento de tratar al paciente de forma integral verificando el estado de salud de forma general de cavidad oral.

Se deben investigar y desarrollar nuevas técnicas de biología celular y molecular, con el fin de integrarlas en los diagnósticos de tal forma que permita establecer nuevos marcadores.

El uso de la microscopia de fluorescencia permite el análisis de los tejidos permitiendo un mayor detalle en la cuantificación de marcadores específicos para establecer sus niveles de diferenciación que conllevan a identificar el nivel de avance de este.

De los diferentes marcadores analizados relacionados con células progenitoras, todos se encontraron en las muestras de los pacientes, indicando entre ellos diferencias de marcación más evidente.

El marcador OCT 4 se manifestó con mayor intensidad en el cáncer bien diferenciado y fue disminuyendo hacia el pobremente diferenciado.

El marcador SSEA4 aumenta con la dediferenciación del tejido.

Los marcadores NANOG y TRA-1-60 se mantienen constantes durante la progresión del tumor.

9. Recomendaciones

Se debe contar un número suficiente de células y se debe tener en cuenta la heterogeneidad del tumor, con el fin de tener un mayor espectro en el análisis.

Ampliar los estudios a poblaciones muestrales de mayor tamaño, con el fin de tener un amplio análisis experimental

Referencias Bibliográficas

- Acevedo, P. (2015). *Stem cells: general aspects, biological and molecular events*. Medellín: Scielo.
- Aghajani, F. (2018). *Evaluation of immunophenotyping, proliferation and osteogenic differentiation potential of SSEA-4 positive stem cells derived from pulp of deciduous teeth*. Teheran (Iran): pubmed.
- Alcalá P, D. (2014). *Células madre cancerígenas: conceptos actuales*. México D.F.: Medigraphic.
- Badcock, P. (2014). *The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan*. New yor.
- Fernández, A. (2008). *Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques*. Pamplona (España): scielo.
- Grubelnik, G., Bostjan, E., & Pavlic, A. (2020). *NANOG expression in human development and cancerogenesis*. Zagreb (Croacia): Pubmed.
- Hernán, R., & Dorticós B, E. (2004). *Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas*. Habana (Cuba): Scielo.
- Herrera B, J. (2013). In vitro Translocation Cytoplasm/nucleus of Embryonic Transcription Factor OCT-4 in Perivascular Cells Suggests that Aorta as a Niche of Quiescent Adult Stem Cells. *International Journal of Morphology*, 1430-1438.
- HERZUMA. (2020). *Programa Científico SEOM*. Barcelona (España): HERZUMA.
- Küstner, E. C. (2019). *Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares*. Barcelona (España): Scielo.
- Mohajertehran, F. (2018). *The promise of stem cell markers in the diagnosis and therapy of epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma*. Mashhad (Iran): Pubmed.
- Nakata, K., Saito, K., & Maruyama, S. (2019). *Identification of TRA-1-60-positive cells as a potent refractory population in follicular lymphomas*. Okayama, Japan: El sevier.

- Narusaka, T. (2021). *Nanog is a promising chemoresistant stemness marker and therapeutic target by iron chelators for esophageal cancer*. Okoyama (Japan): Pubmed.
- OMS. (18 de Junio de 2019). *OMS*. Recuperado el 3 de Septiembre de 2020, de OMS: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20bucal%20abarca%20los,casos%20por%20100%20000%20personas>.
- OMS. (12 de Septiembre de 2021). Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Patel, S. (2014). *Cancer stem cells and stemness markers in oral squamous cell carcinomas*. Gujarat (India): Pubmed.
- Sidrón A, M., & Pérez M.L, .. S. (2015). *Oral cancer: Genetics, prevention, diagnosis and treatment. Literature review*. Madrid (españa): Scielo.org.
- Valdez, J., & Brennan, M. (2018). Impact of Oral Cancer on Quality of Life. *Dent Clin*, 143-154.