



PhD Course

“Medicina Clinica e Sperimentale”

XXVIII Ciclo

Titolo specifico del Programma di Ricerca

*Il ruolo delle Cancer Stem Cell nel
carcinoma orale a cellule squamose*

Coordinatore

Prof. Lorenzo Lo Muzio

Tutor Prof. Lorenzo Lo Muzio

Dottorando Dott. Mario Dioguardi

Indice

1. Il carcinoma orale.....	5
1.1 Introduzione ed epidemiologia.....	5
1.2 Fattori di rischio.....	7
1.3 Aspetti clinici.....	7
1.4 Istopatologia.....	8
1.5 Diagnosi e stadiazione.....	9
1.6 Eziopatogenesi.....	10
2. Cellule Staminali E Cancer Stem Cells.....	11
2.1 Cellule Staminali.....	11
2.2 Ciclo Cellulare.....	12
2.3 Classificazione.....	14
2.4 Cancer Stem Cells (CSC).....	14
2.5 I principali marker di CSC	16
2.6 I marker di CSC in OSCC.....	20
3. Obiettivo dello studio.....	22
4. Materiali e Metodi.....	24
4.1 Coltura Cellulare.....	24
4.2 Coltura Primaria.....	24

4.3 Saggio di sphere formation (formazione di sfere).....	25
4.4 Saggio di vitalità cellulare.....	26
4.5 Immunocitochimica.....	26
4.6 Estrazione di RNA.....	27
4.7 Real Time PCR quantitativa.....	27
4.8 Attività enzimatica NNMT.....	29
4.9 Animali.....	30
4.10 Saggio di cancerogenicità.....	31
4.11 Immunoistochimica.....	32
4.12 Analisi Statistica.....	33
5. Risultati.....	34
5.1 Caratterizzazione delle linee cellulari di HNSCC in vitro e in vivo.....	34
5.2 Sphere formation da linee cellulari Hep-2 e colture primarie di HNSCC.....	34
5.3 L'espressione dei marker delle cellule staminali nelle sottopopolazioni arricchite di CSC.....	35
5.4 Analisi di espressione di NNMT e il saggio di attività enzimatica nella linea cellulare Hep-2.....	35

5.5 Tumorigenicità in vivo delle popolazioni arricchite di CSC.....	36
6. Discussione.....	38

1. Il Carcinoma Orale

1.1 Introduzione ed epidemiologia

Il carcinoma a cellule squamose è il tumore a maggiore prevalenza, il più aggressivo e con gli esiti peggiori della regione testa collo. Questo è dovuto sia all'elevato numero di recidive che alla diagnosi tardiva. In tutto il mondo il numero dei nuovi casi supera i 640.000 (oralcancerfoundation.com)[1-4]. Pur essendo una patologia prevalentemente maschile con un rapporto uomo-donna di 6:1 negli ultimi dieci anni questo rapporto è diventato 2:1. Per quanto riguarda l'età di insorgenza, sono interessati pazienti sempre più giovani, pur essendo un tumore caratteristico della V-VII decade di vita[5]. L'eziologia di questa patologia è complessa e comprende numerosi fattori di rischio correlati al suo sviluppo. La carcinogenesi procede attraverso cambiamenti molecolari che conseguono alla perdita dell'integrità genomica dopo l'esposizione continuata a vari fattori di rischio. Tra i fattori di rischio più importanti vi sono l'uso di tabacco ed il consumo di alcool, che se presenti contemporaneamente hanno un effetto più che moltiplicativo. Altri fattori ancora sconosciuti (genetici, virali, nutrizionali o occupazionali) potrebbero influenzare il rischio soprattutto nel gruppo dei pazienti più giovani. Il papilloma virus umano (HPV) è emerso di recente come possibile fattore eziologico primario soprattutto dei tumori sviluppati nella lingua e nell'orofaringe associati, peraltro, anche ad un'età più giovane al momento della diagnosi. L'aspetto clinico della neoformazione può essere bianca, rossa o mista, assumere una forma ulcerativa, quindi come una perdita di tessuto, una forma nodulare, come una neoformazione più o meno

dura alla palpazione, oppure una forma esofitica, papillare o verrucosa, ovvero un'escrecenza che si accresce progressivamente ed appare più spesso come una forma mista ovvero come un nodulo ulcerato e con una parte verrucosa.

I dati epidemiologici indicano che il carcinoma orale è una patologia tutt'altro che rara. Infatti, tra tutti i tumori maligni è, per mortalità, all'ottavo posto negli uomini e all'undicesimo nelle donne. Per avere un'idea della gravità della patologia basti pensare che nei soli Stati Uniti muore una persona ogni ora a causa del carcinoma orale. Inoltre, negli ultimi anni è stato registrato un trend in continuo aumento nella sua incidenza, un abbassamento dell'età media di insorgenza ed un maggior interessamento della popolazione femminile.

A livello mondiale, i dati epidemiologici riportano che nel 1998 ci sono stati 352.000 morti per questa malattia, mentre nel 2002 *i nuovi casi* sono stati 274.300 e circa 127.500 sono stati attribuiti al carcinoma orale, dei quali i 2/3 nei paesi in via di sviluppo. Un'elevata percentuale di pazienti affetti da carcinoma orale a cellule squamose è stata registrata nel subcontinente indiano (a causa all'abitudine di masticare foglie di betel e tabacco)[6-9]. Attualmente a Taiwan il carcinoma orale a cellule squamose rappresenta la prima causa di morte nei giovani maschi fra i 25 e 44 anni, probabilmente per il progressivo aumento del consumo di betel in questo gruppo di persone[10, 11].

L'*incidenza* dei tumori maligni del cavo orale è di circa 8,2 casi per 100.000 per anno negli uomini e 2,8 per 100.000 nelle donne. Degno di nota è il dato che, numericamente, i tumori maligni della lingua e del resto del cavo orale all'incirca si equivalgono[12].

In Italia l'incidenza media è di 8,44 nuovi casi all'anno ogni 100.000 abitanti tra gli uomini e di 2,22 tra le donne[13]. I tassi di incidenza del cancro orale sono più elevati nelle regioni

del nord-est; queste variazioni sono giustificate dalle differenze legate ad usanze locali quali il consumo di tabacco o l'assunzione di bevande alcoliche[14].

1.2 Fattori di rischio

Il *Fumo di tabacco* [15] e l'abuso di *bevande alcoliche*[16] sono i principali fattori di rischio per l'insorgenza del carcinoma squamoso del cavo orale. Si stima che circa l'80% di carcinomi a cellule squamose siano dovuti a tali agenti[17, 18] e che l'eliminazione di tabacco ed alcool comporterebbe, in Europa e negli Stati Uniti una riduzione del 60-80%[19].

A riprova del ruolo determinante svolto da tali fattori nella cancerogenesi orale negli USA lo stato a più bassa incidenza è lo Utah dove il 75% della popolazione è seguace della dottrina mormone che vieta il consumo di alcol e tabacco[20].

Evidenze scientifiche, tuttavia, suggeriscono l'importanza anche di altri fattori nei meccanismi di cancerogenesi orale. Tra questi ricordiamo taluni agenti infettivi (come il Papilloma virus[21-24] , l'Herpes Simplex[25, 26] e la candida[27, 28]), fattori nutrizionali dietetici[29], condizioni di scarsa igiene orale[30, 31], traumatismi orali cronici[32], radiazioni ultraviolette[33].

1.3 Aspetti Clinici

Il carcinoma orale si presenta con aspetti clinici che variano da una lesione bianca o rossa ad un'area ulcerativa o a una tumefazione[34]. La morfologia clinica è in funzione delle modalità di crescita della neoplasia per cui si possono osservare lesioni esofitiche di aspetto papillare o verrucoso o lesioni a crescita endofitica che assumono l'aspetto di ulcere penetranti[35].

Le aree della mucosa orale e periorale più colpite sono: labbro inferiore[36], bordi laterali della lingua[37], con un'incidenza del 40% e del 25% rispettivamente e a seguire pavimento orale, palato molle e trigono retro molare[38], gengiva[39, 40], cresta alveolare e mucosa vestibolare[41].

Nella maggioranza dei casi i carcinomi orali sono asintomatici; il dolore accompagnato ad ulcerazione si riscontra più frequentemente nei tumori a localizzazione linguale[42]. Nelle forme più avanzate vi può essere sanguinamento, ulcerazioni, alitosi, fistole cutanee, tumefazioni, difficoltà di fonazione e di apertura della mandibola, parestesie, mobilità dentarie, ingrossamenti linfonodali[43, 44] nonché metastasi polmonari,[45] ossee, epatiche e cerebrali[46, 47].

1.4 Istopatologia

In base al grado di differenziazione delle cellule neoplastiche[48], il carcinoma squamocellulare si suddivide in quattro gruppi:

- 1) Grado 1 - Tipo ben differenziato; le cellule neoplastiche tendono a cheratinizzare e viene mantenuto un certo grado di organizzazione architetturale della lamina epiteliale;
- 2) Grado 2 - Tipo moderatamente differenziato; si evidenzia scarsità di cheratina e mantenimento parziale dell'architettura epiteliale;
- 3) Grado 3 - Tipo scarsamente differenziato; l'architettura epiteliale è completamente assente e vi è un notevole pleomorfismo cellulare.
- 4) Grado 4 - Tipo anaplastico; le cellule sono completamente indifferenziate e non è possibile riconoscerne l'origine istologica.

Il grado di differenziazione cellulare, però, attualmente non risulta predittivo a livello prognostico, essendo più importanti il grado di infiltrazione del tumore e i margini di resezione chirurgica liberi da neoplasia, nonché la presenza o meno di metastasi linfonodali[49].

1.5 Diagnosi e stadiazione

La diagnosi viene effettuata con l'ausilio dell'esame clinico e della biopsia[50], eseguita in anestesia locale prelevando aree clinicamente significative, rosse ulcerate o indurite, ed escludendo le aree necrotiche e includendo aree di tessuto sano marginale [51]; la biopsia sarà incisionale [52] o escissionale [53] a seconda delle caratteristiche fenotipiche della lesione. Per individuare le aree neoplastiche possono essere d'ausilio le colorazioni vitali con blu di toluidina[54] e/o liquido di lugol [55], essendo in grado di individuare rispettivamente le aree a maggior replicazione cellulare il primo ed a maggior presenza di glicogeno nel secondo.

Il trattamento del carcinoma orale si basa sulle sue caratteristiche dimensionali, la sua sede anatomica e il suo stadio al momento della diagnosi [56, 57]. Per esempio per lesioni in fase iniziale (stadio T1) potrebbe essere teoricamente sufficiente il trattamento con radioterapia[58-63], mentre per carcinomi di dimensioni maggiori o in sedi anatomiche ad alto rischio di metastatizzazione sono necessarie l'escissione chirurgica e lo svuotamento delle stazioni linfonodali[64, 65].

La prognosi del carcinoma orale è strettamente correlata allo stadio clinico al momento della diagnosi; nello stadio I e II la sopravvivenza a 5 anni è dell'85%, mentre in stadio III e IV è del 25%[66].

1.6 Eziopatogenesi

Il carcinoma orale insorge in seguito al sovrapporsi di un certo numero di variazioni che portano a modificazioni genetiche[67], che si estrinsecano nella trasformazione maligna delle cellule dell'epitelio della mucosa orale[68, 69]. Le modificazioni genetiche avvengono a carico di proteine deputate al controllo del ciclo cellulare, della sopravvivenza, della mobilità cellulare e dell'angiogenesi[70]. Le mutazioni possono conferire un vantaggio selettivo di tipo proliferativo, permettendo un'espansione clonale delle cellule mutate con un aumentato potenziale di malignità[71], mediante un processo chiamato evoluzione clonale[72].

La progressione del carcinoma segue due tappe fondamentali; la prima è la perdita del controllo del ciclo cellulare con aumentata proliferazione cellulare e riduzione dell'apoptosi[73]. La seconda tappa consiste in un aumento della motilità cellulare[74] che comporta invasività e capacità di dare metastasi[75, 76].

Entrambe le tappe sono il risultato dell'attivazione (ipertrascrizione o iperespressione) di oncogeni[77] e della inattivazione o rallentamento dell'attività dei geni oncosoppressori[78].

I tumori epiteliali sono caratterizzati da una eterogeneità cellulare determinata dall'instabilità genetica dovuta all'annullamento dei meccanismi regolatori e ciò porterebbe al fatto che non tutte le cellule cancerose di un tumore solido posseggano la stessa abilità nel guidare la formazione di una neoformazione[79, 80].

Questi presupposti pongono le basi per le teorie riguardanti le cancer stem cell [81, 82] [83]. Questi presupposti pongono le basi per le teorie che recentemente coinvolgono le cancer

stem cell [78, 79] [80], una sottopopolazione di cellule indifferenziate, che andrebbero incontro a differenziamento ed autorinnovamento all'interno della massa tumorale[84-87](4-6). Queste sarebbero responsabili non solo dell'alto tasso di recidive dopo la terapia convenzionale, ma anche all'aumentata resistenza alle modalità chemio e radioterapiche[88-90](7).

2. Cellule staminali e Cancer Stem Cells

2.1 Cellule staminali

Tutte le cellule differenziate dell'organismo umano derivano dalle cellule staminali che in base allo stadio di differenziazione possono essere classificate come cellule toti-, multi- o pluripotenti. Negli individui maturi è possibile trovarle nei cordoni ombelicali, nel feto e nell'embrione in fase di blastocisti. Le caratteristiche delle cellule staminali sono principalmente tre:

-*autorinnovamento* avendo la capacità di autoreplicarsi per tutta la durata della loro vita[91];

-*multipotenza* essendo in grado di generare molteplici cellule figlie;

-*ricostituzione* essendo queste cellule in grado di rigenerare il sistema d'organo nel quale risiedono.

Le cellule staminali non perdono il proprio potenziale replicativo, mantenendo lo stesso stadio differenziativo, perché supportate da una elevata attività telomerasica[92] che è in grado di mantenere costante la lunghezza dei telomeri durante le divisioni cellulari. La cellula staminale mantiene la sua capacità di autorinnovamento grazie alla mitosi asimmetrica in cui

da origine ad una cellula staminale e ad una cellula destinata a differenziarsi, oppure mediante una divisione simmetrica.

La popolazione cellulare rimane costante in ogni caso, poichè vi sarà sempre una popolazione di cellule che simmetricamente andrà a compensare, dividendosi in altrettante staminali, le cellule staminali divise mitoticamente in cellule differenziate.

La multipotenza è la capacità della cellula staminale di dare origine a una o più linee o tipi cellulari tramite il differenziamento. A tale proprietà si affianca quella del transdifferenziamento [93], ovvero la capacità di una cellula staminale in fase di differenziamento di cambiare la tipologia di linea cellulare in cui si sta differenziando, modificando il proprio programma di sviluppo.

2.2 Ciclo Cellulare

Le cellule staminali normalmente si trovano in uno stato di quiescenza (fase G0 del ciclo cellulare [94]), ma in seguito alle esigenze del tessuto di appartenenza possono entrare in una fase di intensa attività replicativa cellulare. Le cellule staminali di un tessuto non esprimono tipicamente le caratteristiche morfologiche strutturali e molecolari del tessuto di appartenenza e, inoltre, hanno una capacità rigenerativa potenzialmente infinita. Come descritto in precedenza, dalla divisione di una cellula staminale possono derivare due cellule figlie che, a seconda dei casi, saranno soggette ad un destino uguale o diverso. Nella divisione simmetrica le due cellule figlie seguono lo stesso destino, ossia o rimangono entrambe cellule staminali, come a loro progenitrice (questa modalità di espansione è definita divisione espansiva, poiché è destinata ad aumentare le dimensioni della popolazione di cellule staminali) oppure le due cellule figlie, possono imboccare entrambe la via del

differenziamento funzionale (in questo caso si parla di divisione differenziativa)[95], trasformandosi in cellule cosiddette ‘committed’(82).

La regolazione di tali processi è molto complessa e raffinata, poiché non si attua a livello delle singole cellule, bensì sull’intera popolazione cellulare costituente il tessuto. Nella divisione asimmetrica, le cellule figlie, che derivano da una cellula staminale, assumono caratteristiche differenti; una cellula figlia conserva intatto il carattere di cellula staminale; l’altra cellula figlia assume tutte le caratteristiche strutturali e funzionali del tessuto di appartenenza, andando incontro al processo di differenziamento.

Questa strategia riproduttiva garantisce la conservazione del numero di cellule staminali che popola il tessuto, poiché ogni cellula che dividendosi cessa di esistere è sostituita da una delle sue cellule figlie, e la produzione di un numero elevato di cellule differenziate. Fisiologicamente è molto importante che venga mantenuto costante il numero di cellule staminali e, fatta eccezione per la fase di espansione, che si ha nell’embriogenesi, e per la fase di riparazione di gravi danni ai tessuti, è proprio la divisione asimmetrica delle cellule staminali a permettere che ciò avvenga. I pathways molecolari delle cellule staminali sono regolati geneticamente ed epigeneticamente e l’equilibrio tra divisione espansiva e proliferativa è influenzato da fattori intrinseci ed estrinseci. Tra i fattori intrinseci vi è senz’altro l’alta attività telomerasica. I fattori estrinseci, invece, dipendono dal microambiente, dalla “nicchia”[96] in cui le staminali si trovano. Tra questi sono di particolare rilievo i fattori della famiglia di Wnt[97], TGF- β [98], Notch[99], Shh[100], BMI-1[101], le integrine e le β -catenine[102], responsabili dei meccanismi di comunicazione tra le cellule.

2.3 Classificazione

Le cellule staminali possono essere classificate in base a diversi criteri; in base alla provenienza avremo: *cellule staminali embrionali*[95] derivate dalla fase embrionale di blastocisti, potenzialmente capaci di differenziarsi in qualsiasi specie cellulare, e che col passare del tempo si differenziano in cellule staminali somatiche-tessuto specifiche; *cellule somatiche adulte* che a loro volta possono essere *fetali* (FSCs)[96] isolabili negli abbozzi degli organi fetali o *neonatali* (NSCs)[97] isolabili dal cordone e dal liquido amniotico.

Il comparto in cui le cellule staminali adulte sono racchiuse prende il nome di *nicchia*; da essa le cellule danno il via ad una divisione mitotica asimmetrica dando origine prima a cellule amplificanti transitorie e poi a cellule terminalmente differenziate.

In base al criterio del potenziale differenziativo avremo: *cellule totipotenti* che potranno dare origine a qualsiasi cellula anche extra embrionale, *cellule pluripotenti* che daranno origine ad un embrione completo, ma non ai tessuti extraembrionali, *cellule multipotenti* che daranno origine ad alcuni dei tipi cellulari di derivazione dal foglietto embrionale da cui originano, e *cellule unipotenti* che potranno generare un solo tipo di cellula e, quindi, un solo tessuto.

2.4 Le cancer stem cells (CSC)

Le cellule staminali tumorali (CSC) rappresentano una sottopopolazione cellulare presente all'interno del tumore e sono caratterizzate da tessuto specificità, capacità di auto-rinnovamento, di promozione della cancerogenesi e della metastatizzazione [103](21). La scoperta delle cellule staminali tumorali risale a circa 150 anni fa, quando Robert Virchow, un patologo tedesco, evidenziò delle somiglianze tra i tessuti tumorali e quelli embrionali [104](11). La prima prova dell'esistenza di questa popolazione cellulare è stata però fornita

solo negli anni '90 da Dick et al., i quali, usando modelli leucemici, riuscirono a dimostrare che trapiantando cellule umane di leucemia mieloide acuta (AML) CD34+CD24- in topi non obesi con diabete severo associato ad immunodeficienza (NOD/SCID), queste erano in grado di indurre leucemia[82, 105] (Lapidot et al.1994 Bonnet e Dick 1997). In seguito sono stati i laboratori Clarke a rivelare per la prima volta la presenza di CSC nei tumori solidi (in particolare nel tumore del seno) usando un fenotipo con lin-marker CD44+CD24- [106](al-Hajj et al 2003) con cui dimostrarono che l'inizio del tumore era dovuto in realtà solo a un ristretto numero di cellule; le CSC sono state poi isolate sia in numerosi tumori maligni, sia ematopoietici che solidi (cervello, prostata, polmone, colon, pancreas, vescica, melanoma, regione testa collo). Esse si differenziano dalle cellule staminali normali (NSC) grazie alla loro capacità di cancerogenesi e di differenziazione in diverse linee cellulari partendo da un limitato numero di cellule. Vari tipi di cellule staminali danno origine a progenitori cellulari i quali hanno la capacità di dividersi ulteriormente in cellule specializzate o differenziate che realizzano le specifiche funzioni corporee. Infatti è ancora controverso se le CSC derivino da cellule staminali, da progenitori cellulari o da cellule differenziate presenti nel tessuto adulto; sull'origine delle CSC, sono state avanzate diverse ipotesi:

1) Cellule tumorali derivate da cellule staminali

In questa ipotesi le cellule staminali utilizzerebbero semplicemente i pathways regolatori delle cellule staminali esistenti per promuovere il loro auto-rinnovamento. L'auto-rinnovamento rende anche probabile che la cellula viva abbastanza a lungo da subire le mutazioni multiple necessarie alla formazione del tumore e alla sua metastatizzazione. (9)[107]

2) Cellule tumorali derivate da cellule progenitrici

Questa ipotesi si basa sulla presenza di abbondanti progenitori cellulari all'interno di un tessuto e sulla loro parziale capacità di auto rinnovamento che conferirebbe loro la capacità di dare vita a CSC.[108, 109] .

3) Cellule tumorali derivate da cellule differenziate

Questa ipotesi deriva da una scuola di pensiero che ipotizza che le cellule tumorali possano originare da cellule mature che vanno incontro a de-differenziazione diventando più simili a cellule staminali. Gli specifici meccanismi alla base di questa de-differenziazione non sono ancora stati spiegati anche se l'induzione di una transizione epitelio mesenchimale (EMT) nelle cellule epiteliali differenziate umane porta all'acquisizione di un fenotipo simile a quello staminale e alla formazione di CSC[110, 111].

Le caratteristiche principali delle CSC sono: capacità di crescita indipendente e di metastatizzazione, possibilità di trasporto attivo di membrana, sopravvivenza a lungo termine, resistenza agli agenti tossici, capacità di autorinnovamento, attività telomerasica e capacità di differenziazione in una progenie matura [112].

2.5 I principali marker di CSC

L'identificazione delle cellule staminali tumorali è basata sull'espressione di determinati marker nel tessuto canceroso e finora le tecniche di identificazione si sono basate sull'espressione di determinati antigeni cellulari superficiali che aumentano nelle cellule con proprietà di CSC:

- Oct 4, Sox2 e Nanog

I Fattori di trascrizione Oct 4, Nanog e Sox2 giocano un ruolo vitale nel mantenimento della pluripotenzialità e della capacità di autorinnovamento delle cellule staminali embrionali,

interagendo con altri fattori di trascrizione come STAT3, HesX1, Zic3 e molecole di segnalazione cellulare quali TCF3, FGF2, LEFTY2. La sovraespressione di Oct-4 e Nanog, riscontrata nella sottopopolazione arricchita di CSC derivava da colonie a formazione sferica di HNSCC, è stata positivamente correlata con lo stato di differenziazione cellulare [113, 114](Tsai et al., 2011; Vaiphei et al.,2014). È stato dimostrato che Oct 4 è in grado di sovraregolare ALDH1+ nelle cellule di HNSCC, mentre in combinazione con TRA1-60 è un indicatore rilevabile di invasività. Inoltre è stato dimostrato che i pazienti che mostravano una tripla espressione positiva di Oct 4, Nanog e CD133 hanno una peggiore prognosi di sopravvivenza in OSCC, indicando la possibilità di utilizzare queste molecole come marker di invasività e predicibilità [115](Siu et al 2012). L'espressione di Sox 2 è anche specificamente aumentata nel carcinoma a cellule squamose del polmone e dell'esofago, ma non negli adenocarcinomi polmonare ed esofageo[116] (Bass et al 2009) e ciò suggerisce la sua importanza come marker specifico di staminalità cellulare per il carcinoma a cellule squamose. Collettivamente questi dati indicano che le cellule che esibiscono caratteristiche simil staminali nel tumore esprimono i fattori trascrizionali Oct4, Sox2 e Nanog.

- Klf4

Il Kruppel like factor 4 (Klf4) è un fattore di trascrizione di tipo zinc finger che si trova a monte di Akt nelle lesioni premaligne. È un regolatore negativo del ciclo cellulare grazie alla capacità di reprimere geni come p53, che promuovono la proliferazione, e di attivare geni come p21[117] (Bonner et al). Klf4 è stato recentemente riconosciuto come un gene di pluripotenzialità coinvolto nella riprogrammazione delle cellule somatiche in uno stato di cellule staminali, mantenendone la capacità di auto rinnovamento cellulare, regolandone la

crescita e la differenziazione[118, 119] (Mao et al 2004 Lu et al 2006). La frequente perdita dell'espressione di Klf4 nei tumori gastrici e colon-rettali ha portato alla sua caratterizzazione come tumor suppressor. Al contrario la sua sovraespressione delinea le caratteristiche oncogeniche del gene che è osservato nel tumore della pelle e del seno e in OSCC.

- Bmi1

È considerato un gene correlato alla staminalità ed è un componente essenziale del complesso 'Polycomb repressive' che è un regolatore epigenetico chiave dell'autorinnovamento cellulare. Regola una varietà di processi biologici inclusa l'inattivazione del cromosoma X, la carcinogenesi, il rinnovamento delle cellule staminali e promuove la proliferazione cellulare modificando la cromatina e la struttura istonica ed influenza i geni oncosoppressori p53 e Rb [120](Chen et al 2011). La sovraespressione di Bmi1 in una sottopopolazione ALDH1+ aumenta la velocità della formazione del tumore, la sua dimensione, la formazione di colonie in soft agar, la migrazione, l'invasività locale, le metastasi a distanza ai polmoni e la radioresistenza. In aggiunta la sua elevata espressione con Snail, ALDH e cellule staminali embrionali è correlata con un basso tasso di sopravvivenza complessivo con un minor grado di differenziazione di HNSCC. Questo suggerisce che la presenza di Bmi1 possa essere usata come marker di trasformazione cancerosa in lesioni orali leucoplasiche.

- Lgr5/GPR49

Lgr5 è una proteina recettore a 7 domini transmembrana ed è stata identificata come marker per le cellule staminali dell'adulto all'interno di intestino, stomaco e follicoli dei capelli. E' stata definita marker di CSC e risulta sottoregolata nel tumore colon-rettale(CRC) e

sovraregolata nell'adenocarcinoma esofageo, nel carcinoma a cellule basali (BCC) del viso e nel tumore dell'ovaio e della vescica [121](Haegebarth and Clevers, 2009).

- CD117 (c-KIT)

CD117 è un proto-oncogene, un recettore citocheratinico, identificato come marker per cellule staminali ematopoietiche e progenitrici, cellule di inizio del tumore ovarico di tumori umani primitivi, di cellule staminali cardiache CD117+ e altre cellule staminali e mesenchimali[122, 123] (Radisky and LaBarge, 2008; Chikamatsu et al., 2011). I dati riguardanti la presenza di CD117 sono contrastanti, infatti vi sono studi che dimostrano la sua espressione nel SCC della base della lingua, mentre altri lo vedono limitato alle cellule spinose stromali in OSCC[124, 125] (Yu et al., 1997; Yu and Stamenkovic, 1999).

- EpCAM/CD326

La molecola di adesione cellulare epiteliale (EpCAM/CD326) è una glicoproteina transmembrana espressa nelle cellule epiteliali di individui sani, a esclusione dell'epitelio squamoso negli epatociti e cheratinociti. Sono state descritte diverse sue funzioni biologiche: è in grado di arrestare l'adesione cellula-cellula mediata da E-caderina, di riarrangiare il citoscheletro della cellula, aumentare la motilità cellulare, la proliferazione e la metastatizzazione. Recentemente le è stato attribuito anche il ruolo di trasduttore del segnale e regolatore intramembranoso della proteolisi, stabilendo il suo ruolo ambiguo come oncogene. È stato riscontrato nel tumore pancreatico, epatocellulare e del seno. In HNSCC l'espressione aumentata di EpCAM è stata osservata in condizioni che variano dalla iperplasia al tumore dando indizi sul suo ruolo nella carcinogenesi orale[126] (Maetzel et al.,

2009). Recenti studi su OSCC riportano una diminuita espressione di EpCAM in associazione ad una maggiore dimensione del tumore e alla presenza di metastasi linfonodali.

2.6 Marker di CSC in OSCC

La scoperta delle CSC nei tumori a cellule squamose della regione testa collo è abbastanza recente; sono state infatti identificate per la prima volta nel 2007 da Prince et al., i quali hanno utilizzato campioni di tumore primario in 1/3 dei loro preparati [127](32); studi aggiuntivi condotti alla University of Michigan hanno identificato vari marker di CSC in HNSCC come ALDH, CD44 e BMI1(93-96). L'utilizzo di altri marker come CD133, Oct-4, Nanog, Sox2, Cd24, Snail, Twist è stato proposto in combinazione con CD44 e ALDH [128][2, 5, 8, 69, 90, 97–102]). Attualmente CD44 e ALDH sono ancora i marker più comunemente usati per l'identificazione di CSC in HNSCC. Per quanto riguarda la correlazione delle CSC con la genesi del carcinoma a cellule squamose una prima teoria suggerisce che possano derivare dalle cellule staminali adulte dello strato basale locale o da progenitori che accumulano alterazioni genetiche nel tempo all'interno del tumore, mentre una seconda ipotizza che l'origine delle CSC possa essere attribuibile, sia a fonti di cellule staminali putative non epiteliali nella mucosa orale (cellule staminali derivate dalle pareti vasali, dal sangue, dai muscoli o dal tessuto adiposo) sia alla fusione tra una cellula staminale ematopoietica e un cheratinocita orale mutato o anche alla dedifferenziazione di una cellula matura [129](48).

Tra i marker di CSC specifici per il carcinoma a cellule squamose, i più noti sono:

- CD44 è il marker più noto di CSC ed è stato precedentemente identificato in varie patologie maligne solide come quelle di seno, CNS, colon, prostata e pancreas[130] (Mishra e Verma 2010). Sia nelle linee cellulari di HNSCC che nei tessuti primari, la

sottopopolazione CD44 ha dimostrato il suo potenziale cancerogenico, la formazione di aggregati tumorali e la chemioresistenza. La popolazione positiva di queste cellule è stata anche trovata a sovraesprimere determinati marker di staminalità come Bmi1 che mantiene la cellula in uno stato indifferenziato[127] (Prince et al.2007). L'espressione di CD44 è correlata negativamente con il basso tasso di sopravvivenza a 5 anni mentre i suoi alti livelli insieme con ALDH e STAT3 fosforilato correlano con un alto grado di HNSCC, il che è coerente con alcune delle precedenti scoperte realizzate nello studio del carcinoma uroteliale[131, 132] (Chen et al;Keymoosi et al.2014).

Dal momento che è egualmente espresso nel carcinoma e nel normale epitelio della regione testa collo, l'uso di CD44 come marker è ancora discutibile. Nonostante questo, non possiamo rigettare che CD44 sia da solo che in combinazione possa essere considerato un marker per cellule staminali tumorali ed un iniziatore tumorale in OSCC ma il suo ruolo e la sua consistenza necessitano ancora di essere validate[131, 133] (Chikamatsu et al 2011, Keymoosi et al 2014).

- CD133 (prominina 1) è un potenziale marker di CSC che è stato caratterizzato nelle cellule epiteliali e nelle cellule staminali somatiche di tessuto neurale, prostatico renale, colon-rettale, vescicale, epiteliale e polmonare[123] (Chikamatsu et al 2011). In HNSCC e OSCC le cellule CD133+ mostravano un aumento nella clonogenicità fenotipo EMT, la formazione di aggregati tumorali, l'auto rinnovamento, la proliferazione, i livelli più alti di geni staminali e la cancerogenicità[134] (Wu e Wu 2009). I livelli più alti di CD133 sono stati associati con l'espressione di CD44 in HNSCC e con la proliferazione indotta di Bmi1 nei carcinomi laringei[135-137] (Zhang et al 2010,Chen et al 2011; Sun et al 2012). Infatti la correlazione positiva di

Oct-4 e Nanog con uno stato di espressione aumentata di CD133 corrispondevano ad una prognosi peggiore per i pazienti con tumore orale. Ulteriori indagini sono necessarie per validare la consistenza mostrando i comportamenti simili inizianti il tumore tra popolazioni CD133+ e CD133-[135, 138] (Shmelkov et al 2008; Zhang et al 2010). CD133 potrebbe essere utile per le CSC in casi di OSCC per identificare pazienti resistenti alla chemioterapia convenzionale con Paclitaxel.

- L'Aldeide deidrogenasi (ALDH) comprende una famiglia di enzimi citosolici intracellulari che sono stati ritrovati principalmente nella vescica. L'espressione di ALDH è stata identificata nelle neoplasie solide come quella del seno, del colon, della vescica e del polmone e solo successivamente è stato identificato il suo ruolo in OSCC. In questo ruolo il suo livello correla con lo staging della patologia, la radioresistenza ed il basso tasso di sopravvivenza. La combinazione di ALDH e CD133+ e CD44+ facilita l'isolamento di una sottopopolazione altamente cancerogena, che presenta perciò le caratteristiche delle CSC in OSCC[139] (Chen et al 2009).

3. Obiettivo dello studio

È stato dimostrato che le CSC (cellule staminali cancerose) possiedono una maggiore capacità di crescita tumorale, un aumento della mobilità e di conseguenza dell'invasività ed un maggiore potenziale metastatico; pertanto possiedono una importante implicazione riguardo il trattamento del tumore. Una eventuale correlazione tra la resistenza alle attuali modalità di trattamento, come la chemio e la radioterapia, e la capacità della sottopopolazione CSC di aumentare il tasso di recidive e facilitare la metastatizzazione, avrebbe significative

implicazioni nella creazione di nuove strategie terapeutiche; le CSC infatti hanno dimostrato una intrinseca resistenza ai farmaci e alle radiazioni il che rende molte delle terapie convenzionali inefficaci. Quindi, mentre l'attuale strategia chemioterapica e radiante si basa sulla citoreduzione indiscriminata e su farmaci inibenti la sintesi del DNA o le cellule in uno stato di replicazione attiva, l'ipotesi delle CSC, che hanno dimostrato possedere un' aumentata capacità di riparazione del DNA, una aumentata velocità di trasporto e di metabolismo dei farmaci, una ridotta immunogenicità e si trovano in uno stato di quiescenza, suggerisce che solo l'eliminazione di questa sottopopolazione possa rendere efficace il trattamento del tumore. Questo obiettivo potrebbe essere perseguito mediante strategie basate su:

- identificazione delle cellule staminali
- introduzione di agenti antiangiogenetici
- induzione della differenziazione e della maturazione delle CSC.

L'identificazione dei pathways di segnalazione coinvolti nella formazione di CSC come Notch, Wnt e Hedgehog ha fornito risultati promettenti nella terapia mirata CSC. Molte case farmaceutiche hanno formulato farmaci per identificare questi specifici pathways implicati nella formazione di CSC. La capacità di questi farmaci di identificare selettivamente le cellule staminali tumorali risparmiando le normali cellule staminali rimane discutibile ed è critica per la futura applicazione della terapia delle cellule staminali tumorali. Inoltre sono stati effettuati studi per rendere le CSC chemiosensibili in HNSCC tramite lo spegnimento di Bmi-1 e CD44. Oltre a questo è stato compreso che l'ipossia gioca un ruolo chiave nella progressione tumorale ed il microambiente ipossico del tumore a sua volta esercita un controllo sulle CSC. Pertanto, quando gli agenti antiangiogenetici vengono somministrati in combinazione con farmaci per le CSC, sono ottenuti risultati più efficaci nella terapia del

tumore, insieme all'inibizione dei fattori inducibili di ipossia (HIF).

I recenti progressi effettuati nelle tecniche molecolari hanno aiutato una migliore comprensione del ruolo delle CSC nella progressione patologica, tuttavia ulteriori ricerche sono necessarie per determinare specifici marker e metodi per identificare specificamente queste cellule.

4. Materiali e metodi

4.1 Coltura cellulare

Le linee cellulari umane di HNSCC (Hep-2, PE/CA_PJ34, PE/CA-PJ46, PE/CA-PJ49, Ca 9-22, HSC-2, HSC-3) sono state acquistate dall'American type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) e sono state coltivate in DMEM/F12(Hep-2, PE/CA-PJ34, PE/CA-PJ46, PE/CA-PJ49, Ca 9-22) o mezzo RPMI 1640 (HSC-2,HSC-3) integrato con 10% di siero bovino fetale, 100U/ml di penicillina,100 µg/ml di streptomina a 37° in incubatrice 5% di CO₂.

4.2 Coltura primaria

I campioni di tessuto umano di carcinomi della regione testa collo sono stati ottenuti durante la procedura chirurgica standard e usati per generare colture cellulari tumorali primarie. Tutti

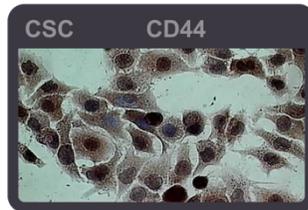
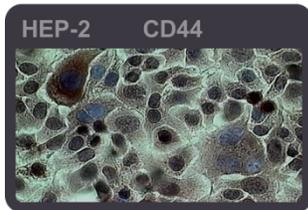
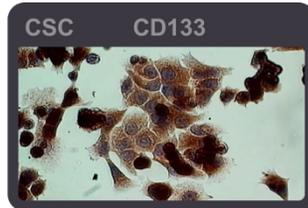
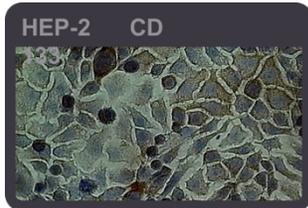
i campioni sono stati raccolti secondo le linee guida del comitato istituzionale. Brevemente, i campioni tissutali sono stati trasportati in soluzione salina sterile e processati immediatamente dopo l'escissione. I campioni di tumore primario sono stati risciacquati in un mezzo DMEM/F12 con gentamicina (50 µg/ml) e amfotericina B (50 µg/ml) per ridurre al minimo il rischio di contaminazione microbica. Dopo il risciacquo, i tessuti sono stati attentamente tritati in piccoli pezzi e distribuiti in beute T25. Per rendere i campioni capaci di aderire alla superficie della beuta, i tessuti sono stati incubati a 37° per 1h prima di aggiungere il mezzo. Dopo 3-4 giorni di incubazione, alcuni dei frammenti e le cellule hanno aderito alla beuta. La crescita cellulare di HNSCC è stata osservata una settimana dopo l'inizio della coltura primaria. I fibroblasti sono stati rimossi con una breve esposizione a 0.25% tripsina EDTA (Invitrogen, Buffalo). Le colture cellulari tumorali primarie sono state ottenute dopo il continuo passaggio riuscito di cellule e l'eliminazione di cellule come i fibroblasti.

4.3 Saggio di formazione delle sfere epiteliali

Per le colture formate sfere, le cellule di HNSCC, dalla linea cellulare Hep-2 o coltura primaria si campioni di HNSCC, sono state rivestite a densità di 1×10^5 cellule/pozzo in 6 pozzi piastre di fissaggio ultra basse in mezzo DMEM/F12 privo di siero integrato con fattore di crescita epidermico umano ricombinante (EGF;10 ng/ml) e fattore di crescita dei fibroblasti basico (bFGF;20 ng/ml). Le nuove aliquote di EGF e bFGF sono state aggiunte ogni 2 giorni, e il mezzo privo di siero è stato cambiato un giorno sì ed uno no fino alla formazione di sfere.

4.4 Saggio di vitalità cellulare

Per valutare la vitalità cellulare è stato realizzato un test di esclusione Trypan blue. Le linee



cellulari sono state coltivate in 24 pozzetti a densità di 2×10^4 cellule /pozzo. Dopo la tripsinizzazione, le cellule sono state contate con un emocitometro in una diluizione delle cellule 1:1 in una soluzione 0.4% trypan blue (Euroclone) sotto il

microscopio.

La vitalità cellulare è stata quantificata contando le cellule vitali (non colorate) e le cellule morte (colorate) in vari momenti temporali (0,24,48 e 72 h). L'esperimento è stato ripetuto 3 volte. Il valore medio del test è stato presentato come risultato finale.

4.5 Immunocitochimica

L'analisi immunocitochimica è stata realizzata verso le proteine CD133 e CD44. Le cellule sono state seminate in 24 pozzetti (1×10^5 cellule/pozzo) contenenti un vetrino in ogni pozzo. Dopo 24h le cellule attaccate al vetrino sono state lavate con PBS e fissate con paraformaldeide 4% in soluzione PBS per 10 min. Le cellule sono state poi permeabilizzate con 0.1% Triton X-100 in PBS per 10 min a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state immerse in una soluzione bloccante per 1h a temperatura ambiente.

Le cellule allora sono state incubate a 4°C per tutta la notte con anticorpo di topo (IgG1) per umano CD133/1 (1:50, Myltenyi) ed anticorpo di coniglio (IgG) per umano CD44 (1:60, Abcam). Dopo il risciacquo in PBS le cellule sono state incubate in anticorpi secondari biotinilati (Calbiochem) per 1h a temperatura ambiente, seguite da trattamento con un complesso avidina-biotina (Vectastain ABC, Vector Laboratories) secondo le istruzioni del produttore. L'attività della perossidasi è stata quindi visualizzata tramite 5 min di incubazione con diaminobenzidina (DAB) (Vector Laboratories) e poi i vetrini sono stati controcolorati con ematossilina e montati. Le cellule sono state osservate sotto microscopio ottico.

4.6 Estrazione di RNA

Le cellule (1×10^6) o i campioni tissutali (30-40 mg) sono stati omogeneizzati in tampone di lisi e l'RNA totale è stato estratto mediante l'SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA) secondo il protocollo del produttore. La quantità e la qualità dell'RNA sono state valutate spettroforeticamente a 260 nm e 280 nm e confermate da elettroforesi su gel di agarosio denaturato 1%. L'RNA totale ($2 \mu\text{g}$) è stato trascritto inversamente in un volume totale di $25 \mu\text{l}$ per 60 minuti a 42°C con M-MLV trascrittasi inversa (Promega, Madison, WI, USA).

4.7 Real Time PCR quantitativa

Per esaminare i marker cellulari staminali putativi o l'espressione quantitativa di NNMT mRNA, un saggio di Real Time PCR è stato realizzato usando una CFX96 Real time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Il cDNA, preparato come

sopra descritto, è stato usato come template. Per evitare risultati falsi positivi dovuti all'amplificazione di DNA genomico contaminato nella preparazione del cDNA, tutti i primer sono stati selezionati per affiancare un introne e l'efficienza della PCR è stata testata per entrambe le paia di primers e trovata essere vicino a 1. Le sequenze degli specifici primers usati sono state come segue:

CD133 primer forward 5'-TGCTGCTTGTGGAATAGACAGAATG-3', reverse 5'-AGGAAGGACTCGTTGCTGGTGAA-3'; CD44 primers: forward 5'-CGGACACCATGGACAAGTTT-3', reverse 5'-GAAAGCCTTGCAGAGGTCAG-3'; Nestin primers: forward 5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3', reverse 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'; Oct4 primers: forward 5'-CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA-3', reverse 5'-CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA-3'; Nanog primers: forward 5'-GATTTGTGGGCCTGAAGAAA-3', reverse 5'-AAGTGGGTTGTTTGCCTTTG-3'; Sox2 primers: forward 5'-ACTTTTGTCTGGAGACGGAGA-3', reverse 5'-CATGAGCGTCTTGTTTTCC-3'; NNMT primers: forward 5'-GAATCAGGCTTCACCTCCAA-3', reverse 5'-TCACACCGTCTAGGCAGAAT-3'; β -actin: forward 5'-TCCTTCCCTGGGCATGGAGT-3', reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'.

I geni sono stati corsi in duplicato per 40 cicli a 94° C per 30 secondi e 58°C per 30 secondi, usando SsoFast, EvaGreen Supermix (Bio-Rad). Tutti i campioni sono stati testati in triplice copia con il gene di riferimento β -actina per la normalizzazione dei dati per correggere le variazioni della quantità e qualità dell'RNA. La rilevazione diretta dei prodotti della PCR è stata monitorata misurando la fluorescenza prodotta dal colorante EvaGreen legando il Dna

a doppio filamento dopo ogni ciclo. Queste misurazioni sono state poi tracciate verso il numero di cicli. Il parametro di ciclo soglia (Ct) è stato definito come il numero di cicli al quale il primo aumento rilevabile sulla soglia nella fluorescenza è stata osservata. I marker cellulari staminali (CD133, CD44, Oct4, Sox2, Nanog e Nestin) e l'espressione differenziale di NNMT è stata calcolata usando il ΔcT , dove $\Delta cT = Ct(\text{gene di interesse}) - Ct(\beta\text{-actina})$. Le variazioni nell'espressione del relativo gene sono state calcolate con $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ dove $\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct(\text{popolazioni arricchite di CSC}) - \Delta Ct(\text{cellule parentali})$.

4.8 Attività enzimatica NNMT

Un saggio catalitico basato su HPLC è stato realizzato per analizzare l'attività NNMT nelle popolazioni arricchite in CSC e nelle cellule parentali. Un agglomerato cellulare congelato (5×10^6 cellule) è stato sospeso in $200 \mu\text{l}$ di tampone di lisi freddo (50 mM tris-HCl, pH 8.6, $2 \mu\text{g/ml}$ aprotinina, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 1 mM ditiotreitolo, 1% Nonidet P40) e 1/2 vol di sfere di vetro. La sospensione è stata agitata a velocità massima per 2 minuti e poi raffreddata su ghiaccio per 2 minuti. L'omogeneizzato è stato centrifugato a $16000 \times g$ per 10 minuti a 4°C . Il sovrantante è stato mantenuto a 4°C fino all'esecuzione del saggio. La miscela standard per il saggio conteneva 50 mM tris HCl, pH 8.6, 1 mM ditiotreitolo, 5 mM nicotinamide, 0.5 S-adenosil-L-metionina e l'appropriata quantità di campione enzimatico per raggiungere il volume finale di $350 \mu\text{l}$. La reazione è stata iniziata aggiungendo il substrato S-adenosil-L-metionina. Le incubazioni sono state realizzate a 37°C per 30 e 60 minuti. La reazione è stata fermata aggiungendo $100 \mu\text{l}$ di miscela test a $50 \mu\text{l}$ ghiacciati 1.2 M HClO_4 . Dopo 10 minuti a 0°C le proteine sono state rimosse con una

centrifugazione di 1 minuto in una microcentrifuga e 130 μ l di sovrantante acido perclorico sono stati poi neutralizzati aggiungendo 35 μ l 0.8 M K₂CO₃. Il KClO₄ così formato è stato poi rimosso mediante centrifugazione. 100 μ l del sovrantante neutralizzato sono stati iniettati in un sistema a cromatografia liquida ad alta performance 10 Dvp-uv-vis fotodiodi array detector (Shimadzu, Duisburg, Germany) usandoli a 250 x4.6 mm di diametro interno Supelcosil® LC-18 5 μ m di colonna a fase inversa. Le condizioni di eluizione erano quelle descritte precedentemente (32). Le attività sono state testate misurando la quantità di N1-metilnicotinamide prodotta, come determinata dalle aree di picco del composto separato con attività 1U rappresentante la formazione di 1nmol N1-metilnicotinamide per ora di incubazione a 37°C.

4.9 Animali

Topi nudi BALB/c (nu/nu) di 6-8 settimane maschi e femmine (peso medio 30 g) sono stati selezionati per questo studio. I topi (Harlan Laboratories, Udine, Italy) sono stati alloggiati in gabbie di plastica e nutriti con agglomerati di cibo e acqua *ad libitum*. Gli animali sono stati mantenuti a temperatura (20 \pm 1°C) e umidità (50 \pm 5%) costanti in un ciclo di 12h di luce/12h di buio. La procedura e le attrezzature si attenevano agli standard etici e seguivano le richieste della commissione direttiva 86/609/EEC riguardanti la protezione di animali usati per esperimenti ed altri scopi scientifici. La legislazione italiana è definita nel D.L.No.116 del 27 gennaio 1992, i protocolli sperimentali sono stati anche approvati dal Comitato Istituzionale di Cura degli animali del Ministero della Salute, Italia. Tutti gli esperimenti sono stati realizzati secondo i Principi della Cura degli animali da laboratorio. Tutti gli sforzi sono

stati fatti per minimizzare la sofferenza dell'animale e per ridurre il numero di animali usati.

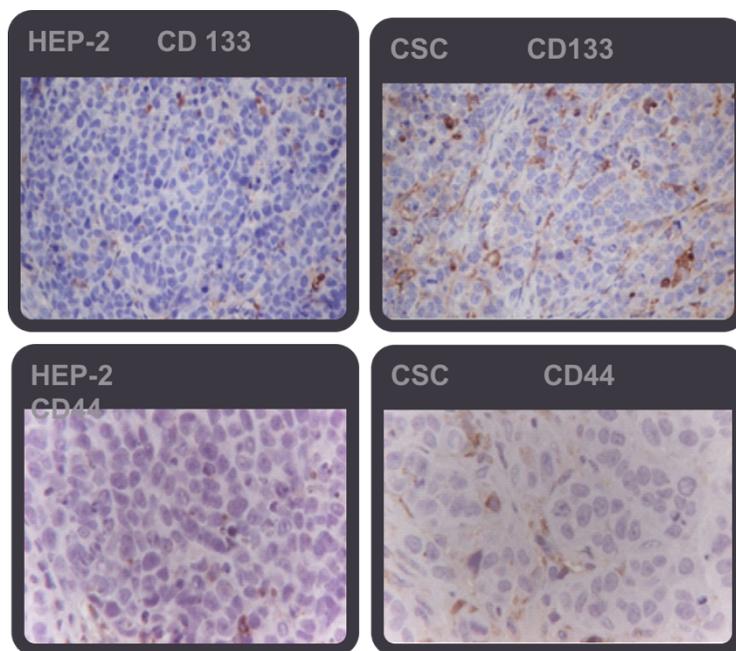
4.10 Saggio di cancerogenicità

La capacità cancerogena delle 7 linee cellulari di HNSCC è stata valutata tramite iniezioni sottocutanee di cellule in topi nudi BALB/c, che erano stati mantenuti in condizioni prive di patologia. I topi sono stati divisi in 7 gruppi sperimentali (5 animali per ogni gruppo). Ogni linea cellulare (2×10^6 cellule/topo) è stata risospesa in 200 microlitri di miscela PBS 1X/Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) con un rapporto di 1:1 per supportare la crescita iniziale del tumore e le cellule sono state inoculate sottocute nella spalla destra e sinistra del topo. La dimensione del tumore è stata misurata settimanalmente con un calibro ed il volume del tumore è stato calcolato usando la formula $\text{volume} = \text{lunghezza} \times \text{ampiezza} \times \text{altezza}$. Dopo 8 settimane, tutti i topi sono stati sottoposti ad eutanasia con CO₂ in eccesso, ed è stata valutata la formazione del tumore. Le masse sono state dissezionate e i campioni sono stati raccolti per l'esame istologico. Per l'istologia, i tumori sono stati fissati con paraformaldeide al 4% in soluzione PBS e le sezioni rivestite in paraffina sono state preparate seguendo le procedure di routine. Successivamente, è stato anche valutato il potenziale cancerogenico delle popolazioni di arricchite-CSC dalla linea cellulare Hep-2. I topi sono stati divisi in due gruppi sperimentali (10 animali per ogni gruppo) e le cellule Hep-2 e le popolazioni arricchite di CSC (2.5×10^5 cellule/topo) sono state inoculate sottocute sulle spalle destra e sinistra di ogni topo. La dimensione del tumore è stata misurata settimanalmente con un calibro e, dopo 8 settimane, tutti i topi sono stati sottoposti ad eutanasia con CO₂ in eccesso. I campioni di tessuto tumorale raccolti sono stati entrambi

congelati immediatamente in azoto liquido e avvolti in paraffina. I campioni congelati sono stati analizzati per l'espressione dei marker delle cellule tumorali staminali con Real Time PCR, come precedentemente descritto per le cellule. In aggiunta, una analisi Array è stata realizzata per profilare l'espressione dei geni coinvolti nel pathway specifico Wnt. Analisi istologiche e immunohistochimiche sono state realizzate sui campioni in paraffina.

4.11 Immunohistochimica

L'analisi immunohistochimica è stata realizzata verso le proteine CD133 e CD44. Le sezioni istologiche di spessore 4 μ m sono state montate su vetrini di vetro, deparaffinate in xilene, reidratate in etanolo e riscaldate al microonde in tampone sodio citrato (10 mM, pH 6) per il recupero antigenico.



La perossidasi endogena, poi, è stata bloccata tramite una incubazione con perossido di idrogeno al 3% per 7 minuti. Le sezioni sono state lavate per 5 minuti con PBS e incubate con anticorpi primari per 1 h a 37°C. Gli anticorpi primari usati erano anticorpi di topo (IgG1) per umano CD133/1 (1:50, Miltenyi) e anticorpi di coniglio IgG per umano CD44 (1:60, Abcam). Dopo lavaggio con PBS le sezioni sono state incubate con EnVision HRP sistema di rilevamento per 30 min a temperatura ambiente. Dopo essere state lavate con acqua il

segnale è stato rilevato usando 3,3'diaminobenzidina (DAB). Il contrasto è stato realizzato usando Ematossilina e poi le sezioni sono state disidratate in etanolo, chiarificate e montate. Tutti i vetrini sono stati osservati con microscopio ottico.

4.12 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPAD Prism software versione 6.00 per Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). I valori sono stati espressi come media \pm s.d. Le differenze tra i gruppi sono state determinate con misurazioni ripetute ANOVA. Un valore $p < 0.05$ è stato accettato come statisticamente significativo.

5. Risultati

5.1 Caratterizzazione delle linee cellulari di HNSCC in vitro e in vivo

La caratterizzazione fenotipica delle 7 linee cellulari HNSCC è stata realizzata valutando il tasso di replicazione e il potenziale cancerogenico, in vitro e in vivo, rispettivamente. Il tasso di replicazione è stato monitorato piastrando le cellule in 24 pozzetti e contandole con saggio di esclusione trypan blue in vari momenti (0,24,48 e 72 h). La linea cellulare Hep-2 ha presentato una maggiore attività proliferativa segnata confrontata alle altre cellule. Inoltre, le cellule Hep-2 possedevano una maggiore attività cancerogena in vivo. L'analisi immunohistochimica ha rivelato che circa l'1.0-2.0% delle cellule CD133+ e CD44+ esisteva in tutte le linee cellulari testate di HNSCC. In particolare Hep-2 conteneva 5% di cellule CD133+ e il 3% di cellule CD44+.

5.2 Formazione di sfere da linee cellulari Hep-2 e colture primari HNSCC

Una sottopopolazione di CSC da linea cellulare Hep-2 e da coltura primaria di HNSCC è stata arricchita tramite la formazione di sfere. Le cellule sono state coltivate in un mezzo DMEM/F12 privo di siero con bFGF e EGF. Dopo essere state in coltura per 3 settimane, le cellule tumorali gradualmente hanno cominciato a distaccarsi dalle piastre di coltura, ad aggregarsi e a formare corpi simil sferici. L'aumento del volume dei corpi simili a sfera è stato osservato con le colture più lunghe (6 settimane). La formazione a sfera delle colture di HNSCC primario è stata più veloce di quella delle sfere ottenute dalle cellule Hep-2. Infatti, le colture cellulari primarie isolate dai campioni di tumore HNSCC hanno formato corpi simil

sferici in 2-3 settimane di coltura.

5.3 Espressione dei marker delle cellule staminali nelle sottopopolazioni arricchite di CSC

È stato valutato il profilo di espressione dei geni specifici delle cellule staminali e delle proteine collegate, nelle cellule parentali e nelle popolazioni arricchite in CSC derivati da cellule Hep-2 o coltura di HNSCC primario. L'analisi REAL TIME PCR ha rivelato che i livelli di espressione di mRNA di un numero di markers di cellule staminali inclusi CD133, CD44, Oct4, Sox2, Nanog e Nestin erano significativamente più elevati nelle sottopopolazioni arricchite in CSC confrontati con quelli della controparte parentale. L'analisi immunocitochimica ha confermato l'espressione aumentata di Cd133 e Cd44 nelle popolazioni arricchite in CSC confrontate con le cellule parentali.

5.4 Analisi di espressione di NNMT e il saggio di attività enzimatica nella linea cellulare Hep-2

Per esaminare quantitativamente l'espressione di NNMT, i campioni cellulari sono stati analizzati con Real Time PCR. L'espressione di NNMT è risultata 1.8 volte più alta nelle popolazioni arricchite di CSC confrontate alla controparte parentale. Per confermare i risultati sopra riportati, un saggio catalitico basato su HPLC è stato realizzato per analizzare l'attività NNMT nelle popolazioni arricchite di CSC. Nel confronto con i risultati della Real Time PCR, il livello di attività NNMT era più alto nelle popolazioni arricchite di CSC (6.12U/mg) confrontate con i valori misurati nelle cellule parentali (2.79 U/mg).

5.5 Tumorigenicità in vivo delle popolazioni arricchite di CSC

La potenziale formazione di tumore nelle sottopopolazioni arricchite di CSC è stata indagata in vivo. Le cellule Hep-2 e le popolazioni arricchite di CSC sono state iniettate sottocute (2.5×10^5 cellule/topo) nelle spalle destra e sinistra di topi atimici BALB/c nu/nu (10 topi/gruppo) e la crescita del tumore è stata controllata settimanalmente. Dopo 8 settimane, la dimensione media dei tumori sviluppati nei topi iniettati con popolazioni arricchite di CSC (6900 ± 400 mm³) era significativamente diversa ($p < 0.05$) se confrontata con quello nei topi iniettati con cellule parentali (980 ± 72 mm³). In particolare, le popolazioni arricchite di CSC hanno prodotto tumori di dimensione molto maggiore quando confrontati con quelle dei tumori generati dalle cellule parentali, suggerendo che le popolazioni arricchite di CSC avessero una capacità più forte di formare tumori in vivo confrontate con le linee cellulari parentali. A 8 settimane dopo l'inoculazione tutti i topi sono stati poi sacrificati e i campioni di tessuto tumorale raccolti sono stati sia congelati immediatamente in azoto liquido e rivestiti in paraffina. I campioni congelati sono stati analizzati con la Real Time PCR, mentre analisi istologiche ed immunohistochimiche sono state realizzate su campioni fissati in formalina e rivestiti in paraffina.

Interessante, l'analisi Real Time PCR ha mostrato una sovraespressione di marker di cellule staminali nel tumore formato da popolazioni arricchite di CSC in confronto al tumore osservato dopo l'iniezione di cellule parentali. In confronto con i risultati della Real Time PCR, l'analisi immunohistochimica ha mostrato segnali positivi significativamente aumentati di CD133 (25% vs 5%) e CD44 (15% vs 1-2%) in tumori derivati dall'iniezione di sottopopolazioni arricchite di CSC se confrontate con tumori formati dopo l'iniezione di cellule parentali (dati non mostrati). Inoltre, un esame istologico ha confermato l'istogenesi

epiteliale del tumore in accordo con la linea cellulare inoculata, escludendo la formazione del tumore primitivo. Questi risultati hanno suggerito il coinvolgimento di popolazioni arricchite di CSC nello sviluppo del tumore.

6. Discussione

Il carcinoma a cellule squamose è uno dei tumori più comuni al mondo, con 640.000 nuovi casi stimati all'anno. L'invasività locale e le metastasi ai linfonodi regionali, insieme con la relativa resistenza alla radioterapia ed alla chemioterapia convenzionale, portano ad una prognosi sfavorevole. Nonostante l'aumentata esperienza nelle tecniche chirurgiche e le terapie adiuvanti, la prognosi complessiva dei HNSCC rimane stabile da molto tempo, esitando in un urgente necessità per nuove strategie di trattamento. Una migliore comprensione delle genetiche molecolari dell'HNSCC potrebbe rivelare i meccanismi di iniziazione e progressione di questa malignità e aiutare a trovare una nuova via di sviluppo di strategie terapeutiche. Negli ultimi anni, diversi studi hanno condotto alla scoperta che molti tumori appaiono essere supportati da cellule con proprietà simili a quelle delle cellule staminali. Secondo la teoria delle cellule staminali tumorali, lo sviluppo del tumore sarebbe garantito da una distinta sottopopolazione di cellule tumorali, definite cellule staminali tumorali(CSC), che hanno la capacità di autorinnovarsi e di resistere agli agenti chemioterapici, prevenendo l'eliminazione del tumore.

Queste cellule sembrano giocare un ruolo principale nella alta percentuale di recidive di questo tumore e nella diffusione metastatica, che a loro volta sono responsabili dell'alta morbilità e del basso tasso di sopravvivenza dei pazienti con HNSCC. Perciò l'identificazione e l'eliminazione mirata di queste CSC è considerata fondamentale per il trattamento del tumore.

Recenti studi hanno dimostrato che molti tumori contengono una sottopopolazione di CSC. Le cellule staminali tumorali sono state identificate la prima volta nei tumori maligni ematopoietici, dove è stato dimostrato che solo una sottopopolazione specifica CD34+CD38-

possedeva un'attività clonogenica nei topi immunocompromessi.

Ricerche simili condotte nei tumori al seno hanno mostrato che le CSC possono essere isolate in base alla loro espressione di marker sulla superficie cellulare, e che solo quelle CD44+CD24- hanno la capacità di generare tumori in vivo.

Da allora le CSC sono state isolate da molti altri tumori come quello cerebrale, polmonare, prostatico, colon-rettale, pancreatico ed epatico. Queste CSC sono state identificate grazie all'espressione di specifici marker sulla superficie cellulare. Molti studi hanno identificato CSC attraverso una varietà di tumori solidi, ma relativamente pochi di questi marker sono stati studiati nell'HNSCC e le putative CSC da HNSCC non sono state ancora ben caratterizzate.

CD133 è stato identificato come potenziale marker di CSC laringeo sia in vitro che in vivo. Alcuni studi hanno dimostrato che CD44 possa rappresentare un marker selettivo di CSC da HNSCC. Recentemente, una sottopopolazione di cellule CD44+ con proprietà di CSC sono state identificate in HNSCC, e la loro capacità cancerogena è stata dimostrata in un modello di topo immunodeficiente. Le CSC giocano un ruolo importante nell'iniziazione del tumore, nella progressione e nella metastatizzazione, e sono responsabili dell'elevata resistenza alla chemioterapia e radioterapia convenzionali. Perciò l'identificazione e la caratterizzazione delle CSC dal tumore sono cruciali per facilitare il monitoraggio, il trattamento, e la prevenzione delle neoplasie maligne. Al momento, l'identificazione delle CSC in HNSCC è ostacolata dalla mancanza di marker ben validati caratterizzanti questa linea cellulare, e l'isolamento delle CSC attraverso marker putativi di cellule staminali (come CD133, CD44) deve essere realizzato attraverso tecnologie precise e innovative. Studi concorrenti hanno suggerito che le CSC possano essere arricchite in sfere dove queste cellule vengono coltivate

in mezzi privi di siero integrate con specifici fattori di crescita.

Nel presente studio, abbiamo usato un sistema di coltura modificato per identificare ed arricchire le CSC da colture primarie di HNSCC e linee cellulari tumorali con sphere formation e abbiamo ulteriormente indagato le loro proprietà usando caratterizzazione fenotipica e molecolare. Sette linee cellulari commerciali di HNSCC sono state analizzate allo scopo di identificare ed isolare i sottoclone di CSC. Abbiamo valutato il tasso di replicazione tramite la conta del numero di cellule e il potenziale cancerogenico tramite analisi in vivo e abbiamo analizzato queste linee cellulari al fine di valutare la presenza di CSC tramite analisi immunocitochimica, usando anticorpi contro marker putativi di cellule staminali tumorali (come CD133,CD44). La linea cellulare Hep-2 ha mostrato un'attività proliferativa maggiormente marcata e capacità cancerogena superiore rispetto alle linee cellulari testate. Inoltre l'analisi immunocitochimica ha mostrato una immunoreazione positiva per CD133 e CD44 in tutte le linee cellulari HNSCC testate, specialmente nella linea cellulare Hep-2, che è stata a sua volta selezionata per ulteriori analisi.

Successivamente, i campioni tumorali di carcinomi della regione testa collo, raccolti durante le procedure chirurgiche, sono stati immediatamente congelati in azoto liquido, e le colture primarie, ottenute da questi campioni chirurgici, sono state analizzate al fine di identificare le CSC. Le cellule staminali tumorali sono state arricchite attraverso formazione sferica, coltivando le cellule di HNSCC dalla linea cellulare Hep-2 o colture primarie di pazienti HNSCC in determinati DMEM/F12 senza siero con specifici fattori di crescita. Interessante notare che dopo essere state in coltura per 3 settimane, le cellule staminali gradualmente hanno cominciato a staccarsi dalle piastre di coltura, e si sono aggregate a formare corpi simil sferici. La sphere formation da colture primarie di HNSCC è stata più veloce di quelle delle

sfere da cellule Hep-2. Per indagare se queste popolazioni arricchite di CSC possedessero caratteristiche di cellule staminali, abbiamo analizzato l'espressione di varie molecole collegate alle cellule staminali. In confronto alle cellule parentali, le popolazioni arricchite di CSC hanno mostrato una espressione marcatamente aumentata di marker di cellule staminali, inclusi CD133, CD44, Oct4, Sox2, Nanog e Nestin. Coerentemente con i risultati della Real Time PCR l'analisi immunohistochimica ha confermato l'espressione più alta di CD133 e CD44 in popolazioni arricchite di CSC in confronto alle cellule parentali. Per caratterizzare ulteriormente le popolazioni arricchite di CSC nell'HNSCC, abbiamo studiato il loro potenziale di formazione tumorale in vivo. Sia le popolazioni arricchite di CSC che le cellule Hep-2 sono state iniettate sottocute nelle spalle destra e sinistra di topi immunocompromessi, e la crescita del tumore è stata controllata con la misurazione della massa tumorale. Da sottolineare che i topi atimici inoculati con popolazioni arricchite di CSC hanno mostrato un significativo aumento della crescita tumorale in confronto con i topi inoculati con cellule parentali, un risultato indicativo dell'ipotesi che le popolazioni arricchite di CSC possano contribuire alla malignità di HNSCC. I topi sono stati sacrificati e le masse tumorali sono state analizzate con Real Time PCR, e analisi istologica immunohistochimica. I nostri risultati hanno mostrato una significativa sovraregolazione dei marker putativi delle cellule staminali in tumori formati da popolazioni arricchite di CSC in confronto con tumori osservati dopo l'iniezione di cellule parentali, sia nei livelli di RNA che proteici. Questi risultati hanno evidenziato che le popolazioni arricchite di CSC hanno esibito una capacità aumentata di formare tumori in vivo in confronto alla linea cellulare parentale.

Ulteriori studi su altri pathways sono necessari per capire meglio i meccanismi molecolari caratterizzanti l'auto rinnovamento delle CSC e per identificare i target molecolari per le

terapie basate su CSC.

In questo lavoro, ci siamo anche focalizzati sull'espressione dell'enzima Nicotinamide N-Metiltransferasi il quale catalizza la N-metilazione della nicotinamide, delle piridine e di altre strutture analoghe, giocando un ruolo fondamentale nella biotrasformazione di molti xenobioti. Una espressione aumentata di NNMT è stata riportata in un certo numero di tumori, come glioblastoma, adenocarcinoma gastrico, tumore papillare della tiroide, renale e carcinoma a cellule squamose orale, tumore colon-rettale, tumori vescicale, polmonare e pancreatico. In lavori precedenti avevamo esplorato l'espressione del NNMT nel carcinoma a cellule renali (ccRCC), nel carcinoma a cellule squamose orale (OSCC), nel carcinoma uroteliale (UC) della vescica e nel tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Tali dati hanno rivelato una sovraregolazione di NNMT in ccRCC, OSCC, UC vescicale e nei campioni NSCLC in confronto con gli adiacenti tessuti non cancerosi, suggerendo che NNMT possa avere un potenziale come biomarker per questo tipo di tumori. In particolare, nel ccRCC i livelli di espressione di NNMT correlano inversamente con la dimensione del tumore, indicando un possibile ruolo dell'enzima nella crescita del tumore. Nell'OSCC la sovraregolazione di NNMT è inversamente correlata con pT, metastasi linfonodali e staging patologico. Inoltre, l'analisi immunohistochimica ha mostrato che la sovraespressione di NNMT è collegata alla differenziazione tumorale, supportando l'ipotesi che l'enzima possa giocare un ruolo nell'espansione del tumore e possa avere un potenziale come marker prognostico di OSCC.

Abbiamo anche dimostrato che i livelli proteici di NNMT erano significativamente più alti nei campioni di urina e saliva di pazienti con tumore vescicale e OSCC, rispettivamente, in confronto ai controlli. I nostri dati sembrano indicare che la determinazione dei livelli di

espressione di NNMT urinari e salivari possa essere usato per la diagnosi precoce e non invasiva di questo tipo di malignità. Sebbene diversi tumori siano stati associati con l'espressione anormale di NNMT, il suo ruolo nel metabolismo delle cellule tumorali rimane largamente sconosciuto. Abbiamo precedentemente dimostrato che la sottoregolazione dell'espressione di NNMT nelle cellule del carcinoma umano inibivano significativamente la crescita tumorale in vitro e la cancerogenicità in vivo, suggerendo che l'NNMT possa giocare un ruolo critico nella capacità proliferativa e cancerogena delle cellule tumorali, e la possibilità di NNMT come target terapeutico per il trattamento del tumore.

In questo lavoro, dal momento che le CSC sembrano essere responsabili per l'iniziazione e la progressione del tumore (per l'inizio del tumore, auto-rinnovamento/mantenimento, e metastasi) abbiamo deciso di analizzare l'espressione di mRNA e l'attività catalitica di NNMT nelle popolazioni arricchite di CSC. La nostra analisi ha rivelato una sovraespressione di NNMT nelle popolazioni arricchite di CSC in confronto alla controparte parentale. In confronto con i risultati della Real Time PCR, i livelli di attività di NNMT erano particolarmente più elevati nelle popolazioni arricchite di CSC che nelle cellule parentali. Considerando il ruolo fondamentale di CSC nella carcinogenesi e nell'inizio delle metastasi, i nostri risultati possono suggerire un interessante ruolo di NNMT nel metabolismo cellulare tumorale, e la possibilità di sfruttare la sua inibizione come approccio molecolare nel trattamento del tumore.

Il miglioramento delle conoscenze riguardo al ruolo delle cellule staminali tumorali nella carcinogenesi della regione testa e collo può fornire una prova per trattamenti più efficaci. Infatti, nell'ultima decade il ruolo di CSC è stato indagato per diversi tumori maligni, ma rimane ancora non chiara la loro funzione specifica nella carcinogenesi della regione della

testa e del collo e la loro esatta identificazione in HNSCC. Nell'attuale studio, un sistema di coltura modificato è stato in grado di identificare ed arricchire CSC da HNSCC attraverso sphere formation. Una analisi dettagliata dell'espressione genetica e il saggio di cancerogenicità in vivo ha portato alla caratterizzazione delle proprietà molecolari e del potenziale cancerogenico di CSC, migliorando la loro comprensione delle questioni fondamentali sottostanti alla biologia cellulare staminale tumorale in HNSCC. A riguardo di ciò, le attuali conoscenze sono poche, specialmente per quanto riguarda gli aspetti collegati alla identificazione di CSC in HNSCC e l'efficacia di specifiche terapie antitumorali mirate verso CSC. In questa luce, il nostro lavoro può aiutare a indagare il ruolo eziopatogenetico di CSC in HNSCC, valutando le loro caratteristiche fenotipiche e molecolari. La caratterizzazione molecolare di CSC potrebbe permettere di identificare i geni collegati a CSC e/o proteine (oncogeni, geni oncosoppressori, fattori di trascrizione, proteine collegate alle metastasi, markers di differenziazione) coinvolti nella cancerogenesi di HNSCC, che possono contribuire alla comprensione della patogenesi molecolare di HNSCC mediato da CSC ed aiutare ad identificare nuovi e più efficaci marker per la diagnosi precoce di HNSCC così come nuovi target terapeutici. Infatti, la diagnosi di HNSCC è principalmente basata su indagini istologiche ed immunohistochimiche, e marker molecolari specifici e sensibili sono ancora mancanti. Perciò la disponibilità di biomarker affidabili per la diagnosi precoce di HNSCC potrebbe contribuire a cambiare alla morbilità e la mortalità di pazienti affetti da questa neoplasia. I risultati ottenuti con analisi in vivo e in vitro, accoppiate a dati clinici potrebbero avere il potenziale di portare allo sviluppo di nuove strategie per il trattamento del tumore della regione testa collo. L'isolamento e la caratterizzazione dei CSC potrebbero aiutare a ottenere più informazioni sul loro fenotipo (proliferazione cellulare, capacità di

autorinnovamento e differenziazione). Inoltre, la possibilità di ottenere una espansione illimitata di cellule staminali tumorali ha importanti implicazioni terapeutiche per la valutazione in vitro e in vivo della efficacia farmaceutica. La scoperta di meccanismi portanti all' autorinnovamento di CSC è cruciale per identificare target molecolari per le terapie che sono selettivamente efficaci contro CSC. La possibilità di correlare le genesi staminale dei tumori con i fattori prognostici tradizionali potrebbe portare a verificare il possibile ruolo dell'origine cellulare staminale come un fattore indipendente per la valutazione del comportamento clinico di questi tumori. Allo stesso tempo, la possibilità di identificare ed caratterizzare la suscettibilità specifiche cellule staminali tumorali di HNSCC da approfondimenti riguardo futuri potenziali nuovi modelli di terapia genica attraverso la tecnica di silenziamento genico identificando CSC. Queste potrebbero avere implicazioni dirette nel miglioramento dell'efficacia di trattamento dei pazienti con HNSCC.

1. Arbes, S.J., Jr., et al., *Factors contributing to the poorer survival of black Americans diagnosed with oral cancer (United States)*. *Cancer Causes Control*, 1999. **10**(6): p. 513-23.

2. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
3. Canto, M.T., T.F. Drury, and A.M. Horowitz, *Oral cancer examinations among U.S. Hispanics in 1998*. J Cancer Educ, 2003. **18**(1): p. 48-52.
4. Horowitz, A.M., et al., *Maryland adults' knowledge of oral cancer and having oral cancer examinations*. J Public Health Dent, 1998. **58**(4): p. 281-7.
5. *[Biphosphonate. Osteoporosis-related fractures can be avoided]*. Internist (Berl), 1998. **39**(7 Suppl Osteoporos): p. 1-4.
6. Scott, R.B., et al., *Global attentional-executive sequelae following surgical lesions to globus pallidus interna*. Brain, 2002. **125**(Pt 3): p. 562-74.
7. Morse, D.E., et al., *Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia*. Cancer Causes Control, 2007. **18**(9): p. 919-29.
8. Lingen, M., E.M. Sturgis, and M.S. Kies, *Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(3): p. 176-82.
9. Petersen, P.E., *Strengthening the prevention of oral cancer: the WHO perspective*. Community Dent Oral Epidemiol, 2005. **33**(6): p. 397-9.
10. Liao, C.T., et al., *Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(3): p. 915-22.
11. Yen, T.T., et al., *The association of smoking, alcoholic consumption, betel quid chewing and oral cavity cancer: a cohort study*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2008. **265**(11): p. 1403-7.
12. Annertz, K., et al., *Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults*. Int J Cancer, 2002. **101**(1): p. 95-9.
13. Tumino, R. and G. Vicario, *Head and neck cancers: oral cavity, pharynx, and larynx*. Epidemiol Prev, 2004. **28**(2 Suppl): p. 28-33.
14. Castellsague, X., et al., *The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis*. Int J Cancer, 2004. **108**(5): p. 741-9.
15. Silverman, S., Jr., M. Gorsky, and D. Greenspan, *Tobacco usage in patients with head and neck carcinomas: a follow-up study on habit changes and second primary oral/oropharyngeal cancers*. J Am Dent Assoc, 1983. **106**(1): p. 33-5.
16. Wynder, E.L., M.H. Mushinski, and J.C. Spivak, *Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers*. Cancer, 1977. **40**(4 Suppl): p. 1872-8.
17. Gillison, M.L., *Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers*. Head Neck, 2007. **29**(8): p. 779-92.
18. Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully, *Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence*. Oral Oncol, 2005. **41**(3): p. 244-60.
19. Blot, W.J., et al., *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*. Cancer Res, 1988. **48**(11): p. 3282-7.
20. Neville, B.W. and T.A. Day, *Oral cancer and precancerous lesions*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(4): p. 195-215.

21. Kreimer, A.R., et al., *Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(2): p. 467-75.
22. Campisi, G., et al., *Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review)*. *Int J Oncol*, 2007. **30**(4): p. 813-23.
23. Campisi, G., et al., *Comment on "Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions" [Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 126 (2006) 104-106]*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2007. **130**(1): p. 142-3; author reply 143.
24. Zhou, J., et al., *Correlation of human papilloma virus with oral squamous cell carcinoma in Chinese population*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(10): p. 18172-8.
25. Maden, C., et al., *Human papillomaviruses, herpes simplex viruses, and the risk of oral cancer in men*. *Am J Epidemiol*, 1992. **135**(10): p. 1093-102.
26. Carrega, G., et al., *Herpes simplex virus and oral mucositis in children with cancer*. *Support Care Cancer*, 1994. **2**(4): p. 266-9.
27. Rindum, J.L., A. Stenderup, and P. Holmstrup, *Identification of Candida albicans types related to healthy and pathological oral mucosa*. *J Oral Pathol Med*, 1994. **23**(9): p. 406-12.
28. Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel, *Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*, 1999. **12**(1): p. 80-96.
29. De Stefani, E., et al., *Dietary patterns and risk of cancer of the oral cavity and pharynx in Uruguay*. *Nutr Cancer*, 2005. **51**(2): p. 132-9.
30. Talamini, R., et al., *Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(9): p. 1238-42.
31. Zheng, T.Z., et al., *Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China*. *Cancer Causes Control*, 1990. **1**(3): p. 235-41.
32. Cam, K., A. Santoro, and J.B. Lee, *Oral frictional hyperkeratosis (morsicatio buccarum): an entity to be considered in the differential diagnosis of white oral mucosal lesions*. *Skinmed*, 2012. **10**(2): p. 114-5.
33. Adams, S., et al., *Ultraviolet Radiation Exposure and the Incidence of Oral, Pharyngeal and Cervical Cancer and Melanoma: An Analysis of the SEER Data*. *Anticancer Res*, 2016. **36**(1): p. 233-7.
34. Rossi, V., et al., *Clinical aspect and survival rates in subject with oral cancer: a retrospective cohort study*. *Minerva Stomatol*, 2007. **56**(11-12): p. 591-601.
35. *Lip and Oral Cavity Cancer Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version*, in *PDQ Cancer Information Summaries*. 2002: Bethesda (MD).
36. Betka, J., *Distant metastases from lip and oral cavity cancer*. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 2001. **63**(4): p. 217-21.

37. Prince, S. and B.M. Bailey, *Squamous carcinoma of the tongue: review*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999. **37**(3): p. 164-74.
38. Popov, S.P. and P.G. Bitiutskii, [*The choice of the method for surgical intervention in the combined treatment of cancer of the oral mucosa in the retromolar space*]. Stomatologiya (Mosk), 1995. **74**(2): p. 53-4.
39. Raichev, R. and V. Andreev, [*Gingival cancer and its therapy*]. Stomatologiya (Sofia), 1954. **4**: p. 225-32.
40. Srivastava, S.P. and S.C. Sharma, *Gingival cancer*. Indian J Cancer, 1968. **5**(1): p. 89-97.
41. Camilon, P.R., et al., *Does buccal cancer have worse prognosis than other oral cavity cancers?* Laryngoscope, 2014. **124**(6): p. 1386-91.
42. Connelly, S.T. and B.L. Schmidt, *Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma*. J Pain, 2004. **5**(9): p. 505-10.
43. Ferlito, A., et al., *Is it time to eliminate confusion regarding cervical lymph node levels according to the scheme originated at the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center?* Acta Otolaryngol, 2002. **122**(8): p. 805-7.
44. Woolgar, J.A., *Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/oropharyngeal squamous cell carcinomas*. Br J Oral Maxillofac Surg, 1999. **37**(3): p. 175-80.
45. de Bree, R., et al., *Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer*. Laryngoscope, 2000. **110**(3 Pt 1): p. 397-401.
46. Hoffman, G.R. and J.P. Hayter, *Widespread subcutaneous distant metastases from a head and neck squamous cell carcinoma*. J Oral Maxillofac Surg, 2002. **60**(8): p. 954-8.
47. Sano, H., et al., *Clinical review of autopsy cases that succumbed to head and neck malignancies*. Acta Otolaryngol Suppl, 2002(547): p. 64-6.
48. Goyanna, R., E.T. Torres, and A.C. Broders, [*Histological grading of malignant tumors; Broder's method*]. Hospital (Rio J), 1951. **39**(6): p. 791-818.
49. Okada, Y., et al., *An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2003. **32**(3): p. 284-8.
50. Bramley, P.A. and C.J. Smith, *Oral cancer and precancer: establishing a diagnosis*. Br Dent J, 1990. **168**(3): p. 103-7.
51. Ficarra, G., B. McClintock, and L.S. Hansen, *Artefacts created during oral biopsy procedures*. J Craniomaxillofac Surg, 1987. **15**(1): p. 34-7.
52. Pentenero, M., et al., *Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy*. Oral Dis, 2003. **9**(2): p. 68-72.
53. Gandolfo, S., et al., [*Biopsy technics in oral oncology: excisional or incisional biopsy? A critical review of the literature and the authors' personal contribution*]. Minerva Stomatol, 1993. **42**(3): p. 69-75.
54. Gandolfo, S., et al., *Toluidine blue uptake in potentially malignant oral lesions in vivo: clinical and histological assessment*. Oral Oncol, 2006. **42**(1): p. 89-95.

55. Inoue, H., J.F. Rey, and C. Lightdale, *Lugol chromoendoscopy for esophageal squamous cell cancer*. *Endoscopy*, 2001. **33**(1): p. 75-9.
56. Godeny, M., *Prognostic factors in advanced pharyngeal and oral cavity cancer; significance of multimodality imaging in terms of 7th edition of TNM*. *Cancer Imaging*, 2014. **14**: p. 15.
57. Kitamura, T., [*TNM classification--oral and laryngeal cancer*]. *Gan No Rinsho*, 1967. **13**(5): p. 309-15.
58. Wood, C.A. and J.W. Boag, *Researches on the radiotherapy of oral cancer*. *Spec Rep Ser Med Res Counc (G B)*, 1950. **267**: p. 7-148.
59. Wookey, H., et al., *The treatment of oral cancer by a combination of radiotherapy and surgery*. *Ann Surg*, 1951. **134**(4): p. 529-40.
60. Volterrani, F., et al., [*Radiotherapy of oral cancer. Late results (author's transl)*]. *Radiol Med*, 1978. **64**(2): p. 119-28.
61. Volterrani, F., et al., *Failures (cause and time) of radiotherapy in oral cancer*. *Tumori*, 1978. **64**(2): p. 193-203.
62. Vermund, H., I. Rappaport, and W.J. Nethery, *Role of radiotherapy in the treatment of oral cancer*. *J Oral Surg*, 1974. **32**(9): p. 690-5.
63. Verrone, J.R., et al., *Impact of intraoral stent on the side effects of radiotherapy for oral cancer*. *Head Neck*, 2013. **35**(7): p. E213-7.
64. Shudo, A. and H. Kishimoto, [*Oral management during cancer chemotherapy--imperative role of dentistry and oral surgery*]. *Nihon Rinsho*, 2015. **73 Suppl 2**: p. 673-7.
65. McMullen, C.P., *Book Review: Oral Cancer Surgery: A Visual Guide*. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2015.
66. Hubert Low, T.H., et al., *Tumor classification for early oral cancer: re-evaluate the current TNM classification*. *Head Neck*, 2015. **37**(2): p. 223-8.
67. Mellerup, E., et al., *Combinations of genetic data in a study of oral cancer*. *Genes Cancer*, 2015. **6**(9-10): p. 422-7.
68. Osterkamp, R.W. and J.B. Whitten, *The etiology and pathogenesis of oral cancer*. *CA Cancer J Clin*, 1973. **23**(1): p. 28-32.
69. Perez-Sayans, M., et al., *Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review)*. *Oncol Rep*, 2009. **22**(6): p. 1277-82.
70. Jiang, L., et al., *Oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1): a regulator for the cell growth and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma*. *Int J Cancer*, 2008. **123**(8): p. 1779-86.
71. Le Pennec, S., et al., *Intratumor heterogeneity and clonal evolution in an aggressive papillary thyroid cancer and matched metastases*. *Endocr Relat Cancer*, 2015. **22**(2): p. 205-16.
72. Apostoli, A.J. and L. Ailles, *Clonal evolution and tumor-initiating cells: New dimensions in cancer patient treatment*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015: p. 1-12.
73. Polverini, P.J. and J.E. Nor, *Apoptosis and predisposition to oral cancer*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1999. **10**(2): p. 139-52.

74. Ko, S.Y., et al., *Cell migration is regulated by AGE-RAGE interaction in human oral cancer cells in vitro*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e110542.
75. Chinn, S.B., et al., *Cancer stem cells: mediators of tumorigenesis and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma*. Head Neck, 2015. **37**(3): p. 317-26.
76. Bandhavkar, S., *Cancer stem cells: a metastasizing menace!* Cancer Med, 2016.
77. Murugan, A.K., A.K. Munirajan, and A.S. Alzahrani, *MicroRNAs: Modulators of the Ras Oncogenes in Oral Cancer*. J Cell Physiol, 2015.
78. Scully, C., *Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer*. Br Dent J, 1992. **173**(2): p. 53-9.
79. Aubele, M. and M. Werner, *Heterogeneity in breast cancer and the problem of relevance of findings*. Anal Cell Pathol, 1999. **19**(2): p. 53-8.
80. Golub, T.R., *Genome-wide views of cancer*. N Engl J Med, 2001. **344**(8): p. 601-2.
81. Jordan, C.T., M.L. Guzman, and M. Noble, *Cancer stem cells*. N Engl J Med, 2006. **355**(12): p. 1253-61.
82. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
83. Simple, M., et al., *Cancer stem cells and field cancerization of oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2015. **51**(7): p. 643-51.
84. Wei, X., et al., *[Investigation of self-renewal mechanism about CD133+ cancer stem cells in human laryngeal carcinoma Hep-2 cell line]*. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 2014. **28**(21): p. 1636-41.
85. Krishnamurthy, S. and J.E. Nor, *Head and neck cancer stem cells*. J Dent Res, 2012. **91**(4): p. 334-40.
86. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
87. Dalerba, P., R.W. Cho, and M.F. Clarke, *Cancer stem cells: models and concepts*. Annu Rev Med, 2007. **58**: p. 267-84.
88. Dalerba, P. and M.F. Clarke, *Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 241-2.
89. Diehn, M. and M.F. Clarke, *Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(24): p. 1755-7.
90. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
91. Lu, W., et al., *QKI impairs self-renewal and tumorigenicity of oral cancer cells via repression of SOX2*. Cancer Biol Ther, 2014. **15**(9): p. 1174-84.
92. Greenwood, M.J. and P.M. Lansdorp, *Telomeres, telomerase, and hematopoietic stem cell biology*. Arch Med Res, 2003. **34**(6): p. 489-95.
93. Ullah, M., et al., *Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes*. Differentiation, 2013. **85**(3): p. 78-90.

94. Hadnagy, A., et al., *SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations*. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(19): p. 3701-10.
95. Morrison, S.J. and J. Kimble, *Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer*. *Nature*, 2006. **441**(7097): p. 1068-74.
96. Kramer, K., J. Wu, and D.L. Crowe, *Tumor suppressor control of the cancer stem cell niche*. *Oncogene*, 2015.
97. Rognoni, E., et al., *Kindlin-1 controls Wnt and TGF-beta availability to regulate cutaneous stem cell proliferation*. *Nat Med*, 2014. **20**(4): p. 350-9.
98. Yang, G., et al., *Mesenchymal TGF-beta signaling orchestrates dental epithelial stem cell homeostasis through Wnt signaling*. *Stem Cells*, 2014. **32**(11): p. 2939-48.
99. Lee, S.H., et al., *TNFalpha enhances cancer stem cell-like phenotype via Notch-Hes1 activation in oral squamous cell carcinoma cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **424**(1): p. 58-64.
100. Li, J., et al., *BMP-SHH signaling network controls epithelial stem cell fate via regulation of its niche in the developing tooth*. *Dev Cell*, 2015. **33**(2): p. 125-35.
101. Liu, W., et al., *Two stem cell markers, ATP-binding cassette, G2 subfamily (ABCG2) and BMI-1, predict the transformation of oral leukoplakia to cancer: a long-term follow-up study*. *Cancer*, 2012. **118**(6): p. 1693-700.
102. Miki, T., S.Y. Yasuda, and M. Kahn, *Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming*. *Stem Cell Rev*, 2011. **7**(4): p. 836-46.
103. Cabanillas, R. and J.L. Llorente, *The Stem Cell Network model: clinical implications in cancer*. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2009. **266**(2): p. 161-70.
104. Huntly, B.J. and D.G. Gilliland, *Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(4): p. 311-21.
105. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. *Nature*, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
106. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
107. Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers, *Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease*. *Cell*, 2008. **132**(4): p. 612-30.
108. Li, F., et al., *Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis*. *Cell Res*, 2007. **17**(1): p. 3-14.
109. Kucia, M. and M.Z. Ratajczak, *Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation*. *J Physiol Pharmacol*, 2006. **57 Suppl 7**: p. 5-16.
110. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. *Cell*, 2008. **133**(4): p. 704-15.
111. Bidde, A. and I.C. Mackenzie, *Cancer stem cells and EMT in carcinoma*. *Cancer Metastasis Rev*, 2012.
112. Figueiredo, A.L., et al., *Molecular and morphologic analyses of expression of ESX1L in different stages of human placental development*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 545-50.

113. Tsai, L.L., et al., *Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2011. **40**(8): p. 621-8.
114. Vaiphei, K., S.K. Sinha, and R. Kochhar, *Comparative analysis of Oct4 in different histological subtypes of esophageal squamous cell carcinomas in different clinical conditions*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(8): p. 3519-24.
115. Siu, A., et al., *Stem cell markers as predictors of oral cancer invasion*. Anticancer Res, 2012. **32**(4): p. 1163-6.
116. Bass, A.J., et al., *SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas*. Nat Genet, 2009. **41**(11): p. 1238-42.
117. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 567-78.
118. Mao, L., W.K. Hong, and V.A. Papadimitrakopoulou, *Focus on head and neck cancer*. Cancer Cell, 2004. **5**(4): p. 311-6.
119. Lu, S.L., H. Herrington, and X.J. Wang, *Mouse models for human head and neck squamous cell carcinomas*. Head Neck, 2006. **28**(10): p. 945-54.
120. Yu, C.C., et al., *Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells*. J Oncol, 2011. **2011**.
121. Haegebarth, A. and H. Clevers, *Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin*. Am J Pathol, 2009. **174**(3): p. 715-21.
122. Radisky, D.C. and M.A. LaBarge, *Epithelial-mesenchymal transition and the stem cell phenotype*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(6): p. 511-2.
123. Chikamatsu, K., et al., *Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells*. Head Neck, 2012. **34**(3): p. 336-43.
124. Yu, Q., B.P. Toole, and I. Stamenkovic, *Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD44 function*. J Exp Med, 1997. **186**(12): p. 1985-96.
125. Yu, Q. and I. Stamenkovic, *Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 35-48.
126. Maetzel, D., et al., *Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 162-71.
127. Prince, M.E., et al., *Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 973-8.
128. Trivaii, I., et al., *CD133 marks a stem cell population that drives human primary myelofibrosis*. Haematologica, 2015. **100**(6): p. 768-79.
129. Zhou, Z.T. and W.W. Jiang, *Cancer stem cell model in oral squamous cell carcinoma*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(1): p. 17-20.
130. Mishra, A. and M. Verma, *Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?* Cancers (Basel), 2010. **2**(1): p. 190-208.

131. Keymoosi, H., et al., *ALDH1 in combination with CD44 as putative cancer stem cell markers are correlated with poor prognosis in urothelial carcinoma of the urinary bladder*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(5): p. 2013-20.
132. Chen, Y.W., et al., *Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(11): p. 2879-92.
133. Chikamatsu, K., et al., *Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck*. Head Neck, 2011. **33**(2): p. 208-15.
134. Wu, Y. and P.Y. Wu, *CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns*. Stem Cells Dev, 2009. **18**(8): p. 1127-34.
135. Zhang, Q., et al., *A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy*. Cancer Lett, 2010. **289**(2): p. 151-60.
136. Chen, H., et al., *BMI1'S maintenance of the proliferative capacity of laryngeal cancer stem cells*. Head Neck, 2011. **33**(8): p. 1115-25.
137. Sun, Y., et al., *Biological characteristics of a cell subpopulation in tongue squamous cell carcinoma*. Oral Dis, 2012. **18**(2): p. 169-77.
138. Shmelkov, S.V., et al., *CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors*. J Clin Invest, 2008. **118**(6): p. 2111-20.
139. Chen, Y.C., et al., *Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **385**(3): p. 307-13.