

# Determinación de la cicloxigenasa-2 en carcinoma escamocelular de lengua bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado

*Determination of Cyclooxygenase-2 in Well-Differentiated, Moderately Differentiated and Poorly Differentiated Squamous Cell Carcinoma of the Tongue*

## Mounir Elías Battika Díaz

Odontólogo, Universidad Gran Mariscal de Ayacucho, Puerto La Cruz, Venezuela. Especialista en Cirugía Maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

## Eduardo Alberto Sosa Figueroa

Odontólogo, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. Especialista en Cirugía Maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

## Francisco J. Pérez Álvarez

Odontólogo, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. Especialista en Cirugía Maxilofacial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

## Silvia Barrientos Sánchez

Odontóloga, docente, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Especialista en Estomatología, magistra en Microbiología, docente, directora del Departamento del Sistema Bucal, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

## RESUMEN

**Propósito:** Determinar y comparar la expresión de la cicloxigenasa-2 (COX-2) en el carcinoma escamocelular de lengua (CECL) según el grado de diferenciación, con la finalidad de explorar si este puede ser un marcador molecular útil en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de la cavidad oral. **Métodos:** Se utilizaron 45 especímenes con CECL, 15 de ellos bien diferenciados, 12 moderadamente diferenciados, 18 mal diferenciados, un control positivo de carcinoma de colon y un control negativo de mucosa oral sana. La identificación de la COX-2 se obtuvo por medio de inmunohistoquímica. **Resultados:** La muestra de mucosa lingual sana expresó la COX-2 en bajo nivel; el 60% de las quince muestras de carcinoma escamocelular diferenciado mostraron un bajo nivel de expresión, el 41,3% de 12 muestras de carcinoma moderadamente diferenciado mostraron una alta expresión, y el 74% de 18 muestras de carcinoma no diferenciado mostraron una alta expresión de la enzima. **Conclusión:** La expresión de la COX-2 aumenta si el carcinoma es indiferenciado, lo cual sugiere que esta enzima podría desempeñar un papel importante en el desarrollo histopatológico del CECL, tanto en las etapas iniciales como en las tardías.

## PALABRAS CLAVE

Carcinoma escamocelular, carcinoma lingual, cáncer oral, ciclooxygenasa-2, COX-2.

## ÁREAS TEMÁTICAS

Inmunohistoquímica, oncología, histopatología.

## ABSTRACT

**Aim:** Determine and compare the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in squamous cell carcinoma of the tongue (SCCT) in three degrees of differentiation, in order to verify if this may be a molecular marker useful in the diagnosis and prognosis of oral cavity cancer. **Methods:** The sample consisted of 45 specimens with SCCT (15 well-differentiated, 12 moderately differentiated, 18 poorly differentiated), a positive control (colon carcinoma) and a negative control (healthy oral mucosa). The identification of COX-2 was obtained through immunohistochemistry. **Results:** Samples of healthy lingual mucosa showed a low expression of COX-2, 60% of the 15 samples of well-differentiated squamous cell carcinoma showed a low expression of COX-2, 41.3% of 12 samples of moderately differentiated carcinoma showed high expression, and 74% of the 18 non-differentiated carcinoma samples showed a high expression of the enzyme. **Conclusion:** The expression of COX-2 increases in less differentiated squamous cell carcinoma, which suggests that identification of COX-2 in the histologic development of squamous carcinoma of the tongue might be important in the differentiation of both, the early and late stages.

## KEY WORDS

Squamous cell carcinoma, tongue carcinoma, oral cancer, cyclooxygenase-2, COX-2.

## THEMATIC FIELDS

Immunohistochemistry, oncology, histopathology.

## CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

Battika ME, Sosa EA, Pérez FJ, Barrientos S. Determinación de la cicloxigenasa-2 en carcinoma escamocelular de lengua bien diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado. Univ Odontol. 2012 Jul-Dic; 31(67): 89-93

Recibido para publicación: 14-02-2012  
Recibido con correcciones: 04-09-2012  
Aceptado para publicación: 30-09-2012

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/universitasodontologica>

## INTRODUCCIÓN

El cáncer de la cavidad bucal y la región facial representan el 5% de todas las neoplasias. Aunque el carcinoma escamocelular es responsable de alrededor del 4% de todos los tumores malignos, constituye el 90% del total de carcinomas orales. Se ha encontrado una estrecha relación entre el carcinoma escamocelular, el envejecimiento y el consumo de tabaco y alcohol con altas tasas de mortalidad (1-2). Se localiza frecuentemente en el labio inferior, en los bordes laterales de la lengua y en el piso de la boca (3-4). En el momento del diagnóstico, el 36% de los pacientes tiene enfermedad localizada; el 43%, metástasis regional, y el 9%, metástasis a distancia (5).

El pronóstico de esta patología está determinado por la edad, el estado de los márgenes quirúrgicos, la existencia de metástasis ganglionar, la propagación extracapsular, la invasión perineural y la permeabilidad linfovascular (6). A pesar de esto, algunos estudios sugieren que el factor pronóstico de mayor peso sería la metástasis regional y, si a este se le suma la afectación extracapsular, el pronóstico sería extremadamente reservado (7). La recurrencia alcanza el 50% en el siguiente año después del tratamiento quirúrgico.

El comportamiento del tumor depende en parte de la diferenciación celular en el momento del diagnóstico. De tal forma, tendrían mejor pronóstico aquellos con mayor grado de diferenciación, ya que la célula tiene más semejanza con aquellas de su tejido de origen, al hacer que controle sus ciclos celulares y apoptóticos a un ritmo semejante al normal. No existe todavía un marcador que pueda ayudar a predecir la transformación de lesiones premalignas o la evolución de las malignas (8). La ciclooxigenasa-2 (COX 2), una proteína que se expresa en los tejidos inflamados y neoplasias, se ha reportado un potencial marcador predictivo en carcinoma de células escamosas.

La COX-2 aumenta de manera anormal la síntesis de prostaglandinas, la angiogénesis y la carcinogénesis (7-9). Varios estudios han mostrado la mayor expresión de COX-2 en neoplasias malignas de seno, colon y esófago, y en carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, al igual que otros factores como el factor de crecimiento endotelial y p53 (10-11). La expresión de COX-2 en carcinomas humanos no está solo confinada al componente epitelial del tumor, sino que la neovascularización también muestra una expresión significativa de la enzima (12). La cuantificación de la angiogénesis en un espécimen de biopsia es importante, ya que existe una asociación positiva entre esta y los riesgos de metástasis, recurrencia del tumor o muerte (13-14).

Teniendo en cuenta que la expresión de la COX-2 es un factor importante en el desarrollo de este tipo de neoplasias, esta investigación pretendió determinar si tal molécula se sobreexpresa en células del carcinoma escamocelular de lengua, según su grado de diferenciación, para así considerar su función como marcador de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad y la posibilidad terapéutica de inhibidores de esta enzima como coadyuvantes en el tratamiento de esta patología, al controlar la angiogénesis (15-16).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra

Se obtuvieron 45 especímenes de carcinoma escamocelular de lengua (CECL) del banco de especímenes quirúrgicos del Instituto Nacional de Cancerología de Colombia, entre los cuales se eligieron quince muestras de carcinoma escamocelular bien diferenciado, doce moderadamente diferenciados y dieciocho pobremente diferenciados. Como control positivo se utilizó una placa de carcinoma de colon, y como control negativo, un espécimen quirúrgico de mucosa lingual sana. Se excluyeron muestras dañadas o no clasificadas por su grado de diferenciación, y se tuvo cuidado de cumplir los principios éticos en investigación con respecto al anonimato y custodia de las placas histológicas.

### Método de inmunohistoquímica

Una vez obtenidos los cortes, las secciones se desparafinaron en xilol, se rehidrataron en alcoholes descendentes y se procesaron con el método de estreptoavidina biotina, utilizando un anticuerpo monoclonal COX-2 de ratón (Novocastra Laboratorios Ltda.) con albúmina sérica bovina, lavado e incubación con el anticuerpo secundario (Biotinylated Secondary Anti Rb Gt, MO DAKO®) diluida 1:50 en Tris-HCl durante treinta minutos. Las muestras se incubaron treinta minutos en rábano peróxido-conjugado, estreptoavidina (DAKO®) diluida en 1:50 en Tris-HCl. Se hizo un lavado de las muestras con Tris-HCl dos veces por diez minutos y se incubaron durante tres minutos con 0,01% diaminobencidina tetrahidrocloruro (Sigma, St. Louis, MO, USA) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03% en 20 mmol L-1 Tris-HCl *buffer* con un pH de 7,4. Se efectuó un enjuague con H<sub>2</sub>O destilada durante diez minutos y contratinción con AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (DAKO®).

### Evaluación de la inmunohistoquímica

Todas las muestras las analizó un solo experto patólogo con microscopía de luz (Olympus) bajo un objetivo de 40X. Ello se llevó a cabo contando 200 células en un campo panorámico para determinar la expresión de

COX-2 con la siguiente escala: negativo, menor al 5% de células positivas; baja expresión, 5-29% de células positivas; moderada expresión, 30-60% de células positivas, y alta expresión, >60% de células positivas.

## RESULTADOS

Inicialmente se evaluaron, por un lado, un espécimen de mucosa lingual sana, que expresó COX-2 en menos de un 9,6% de las células, es decir, baja expresión, y, por el otro, uno de carcinoma de colon, que se categorizó como de alta expresión con un 74% de células positivas. De los quince especímenes de CECL diferenciados, el 60% estuvieron en nivel bajo; el 20%, en moderada expresión, y el 20%, en alta expresión. A su vez, del total de los doce especímenes con CECL moderadamente diferenciados, el 42% mostró alta expresión, y el 58%, moderada. Por último, de 18 especímenes clasificados como indiferenciados, el 74% presentaron alta expresión, y el 26%, moderada (figuras 1 a 4).

FIGURA 1

CARCINOMA ESCAMOCELULAR BIEN DIFERENCIADO DONDE SE OBSERVA UN NÚMERO BAJO DE CÉLULAS POSITIVAS EN LA EXPRESIÓN DE COX-2

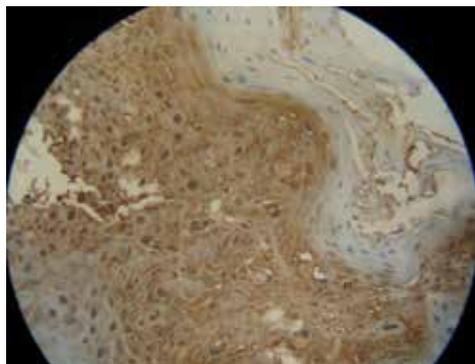


FIGURA 2

CARCINOMA ESCAMOCELULAR MODERADAMENTE DIFERENCIADO DONDE SE OBSERVA UNA MAYOR COLORACIÓN DE CÉLULAS POSITIVAS EN LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y SE CLASIFICA COMO EXPRESIÓN MODERADA

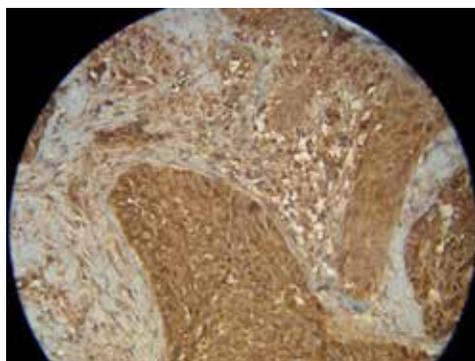


FIGURA 3

CARCINOMA ESCAMOCELULAR MAL DIFERENCIADO DONDE SE OBSERVA UNA COLORACIÓN PREDOMINANTEMENTE OSCURA DE CÉLULAS POSITIVAS EN LA EXPRESIÓN DE COX-2 Y CLASIFICACIÓN COMO DE ALTA EXPRESIÓN

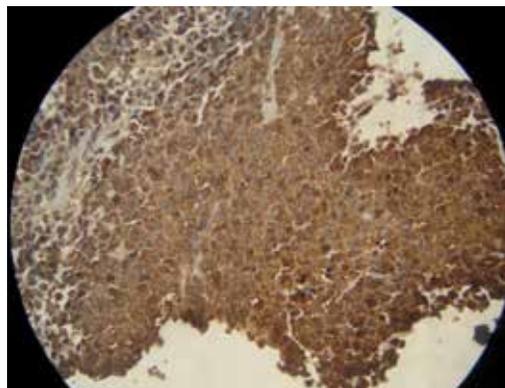
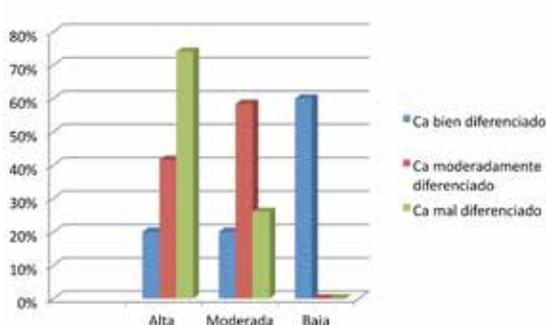


FIGURA 4

DIFERENCIAS ENTRE LOS DISTINTOS TIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA DE LENGUA Y EL GRADO DE EXPRESIÓN DE LA ENZIMA COX-2



Al realizar pruebas estadísticas de chi cuadrado ( $\chi^2$ ) ( $p < 0,05$ ) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de COX-2 en el CECL diferenciado y el indiferenciado, y entre el moderadamente diferenciado y el diferenciado, lo que permite inferir que la mayor expresión de COX-2 en la mucosa de lengua con carcinoma escamocelular está relacionada con el grado de diferenciación celular, variable que es determinante en el pronóstico de la enfermedad.

## DISCUSIÓN

La diferenciación es un proceso mediante el cual una célula expresa diferentes tipos de proteínas, que le permiten tener una morfología y fisiología específicas, y que le dan la capacidad de cumplir con las funciones para las cuales está programada. Si se pierde la diferenciación, hay una proliferación descontrolada de

células atípicas, con mayor probabilidad de metástasis. Diversos estudios han corroborado la relación entre la sobreexpresión de la COX-2 y la angiogénesis, que a su vez es fundamental en la carcinogénesis en varios tipos de tumores (7,14,17). También se ha observado variabilidad en los resultados obtenidos en distintas investigaciones acerca de la relación entre el grado de diferenciación histopatológica del tumor y los diferentes grados de expresión de la COX-2 (18).

En el presente estudio se determinó la expresión de la COX-2 en muestras de CECL según su grado de diferenciación celular mediante técnicas de inmunohistoquímica. Los tres tipos de CECL expresaron algún grado la presencia de la proteína COX-2, es decir, que la sola presencia no es un marcador diagnóstico o pronóstico único. Sin embargo, parece ser que esta proteína cumple un papel importante en el proceso de diferenciación celular, lo que permite plantear su papel regulador en este fenómeno y que a futuro el control de su expresión con inhibidores preferenciales o específicos podría mejorar el pronóstico de la enfermedad, teniendo en cuenta que estos son mecanismos complejos y determinados por múltiples moléculas.

Kyzas y colaboradores (18) sugieren que la COX-2 está relacionada con la angiogénesis linfática tumoral, a través de una sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular; asimismo, este mecanismo es desconocido en la patogenia del carcinoma escamocelular de cabeza y cuello con respecto a la expresión inmunohistoquímica de COX-2 y la correlación con la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C). Encontraron que la expresión de la COX-2 y el VEGF-C aumentaron en el 44% y 38% de las muestras, respectivamente. Los autores sugieren la importancia de estas dos proteínas como marcadores inmunohistoquímicos predictivos tanto en la aparición de metástasis linfática regional como en la incidencia de mortalidad de estos pacientes.

Al analizar la correlación entre la expresión de COX-2 y la recurrencia local en carcinoma escamocelular laríngeo tratado con radioterapia primaria, se concluyó que hay mayor riesgo de recidiva local en los pacientes diagnosticados como positivos en la expresión de la COX-2 (7-19). En carcinoma de esófago, la asociación de varios parámetros clinicopatológicos con la expresión inmunohistoquímica de COX-2 (17) permite suponer que la enzima está implicada en la patogénesis, pero su significado clínico no es todavía claro.

Por otra parte, algunos autores han evidenciado la sobreexpresión de la COX-2 durante la progresión del

tumor del epitelio de Barrett hacia adenocarcinoma, y han llegado a la conclusión de que la sobreexpresión de COX-2 es un acontecimiento temprano e importante en la secuencia metaplasia-displasia-carcinoma (20-22). De hecho, la exposición de fibroblastos a radiación ultravioleta, conocido agente carcinogénico, induce la expresión de COX-2 y muestra que es vital en el desarrollo patológico (23).

Cabe resaltar que ninguna muestra tuvo una expresión nula de la enzima, lo que podría explicarse porque se trata de un epitelio de constante recambio, dadas sus funciones masticatorias, y requiere la enzima en situaciones fisiológicas normales para mantener su homeostasis.

El presente estudio corrobora los resultados de Li y Wo, quienes comprobaron que a mayor indiferenciación celular, se observan mayores concentraciones de COX-2. Dichos resultados son similares a los obtenidos por Sung y colaboradores (24), quienes observaron que la COX-2 se expresa tanto en la fase inicial como en la tardía en un modelo de carcinogénesis hepatocelular. Se confirma que, en carcinomas de lengua, hay una correlación entre la expresión de la COX-2 con el grado de diferenciación y, como otros investigadores, deja abierta la posibilidad de que los inhibidores de COX-2 podrían desempeñar un papel importante como el celecoxib, que regula negativamente la expresión de COX-2 a través de la modulación de metaloproteinasas (25-27), especialmente en casos de menor diferenciación.

## REFERENCIAS

1. Sandner Montilla O. Tratado de cirugía oral y maxilofacial: introducción básica a la enseñanza. 4a ed. Caracas: Amolca; 2007.
2. Denison M, Soto L, Reyes Ortiz CA. The association between population aging and oral and pharynx cancer in the American continent. Colombia Médica. 2011 Abr-Jun; 42(2): 191-8.
3. Sapp JP, Eversole GR, Wysocki LW. Patología oral y maxilofacial contemporánea. 3a ed. Madrid: Elsevier; 2005.
4. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. J Biol Chem. 2010 Sep 24; 285(39): 29808-16.
5. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006 Jul; 102(1): 67-76.
6. Fan KH, Lin CY, Kang CJ, Huang SF, Wang HM, Chen EY, Chen IH, Liao CT, Cheng AJ, Chang JT. Combined-modality treatment for advanced oral tongue squamous cell carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2007 Feb 1; 67(2): 453-61.
7. Cho EI, Kowalski DP, Sasaki CT, Haffty BG. Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of COX-2 expression for local relapse in T1-2N0 larynx cancer treated with primary radiation therapy. Laryngoscope. 2004 Nov; 114(11): 2001-8.

8. Van Der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol.* 2010 Jun; 46(6): 423-5.
9. Hoshikawa H, Goto R, Mori T, Mitani T, Mori N. Expression of prostaglandin E2 receptors in oral squamous cell carcinomas and growth inhibitory effects of an EP3 selective antagonist, ONO-AE3-240. *Int J Oncol.* 2009 Mar; 34(3): 847-52.
10. Jaeckel E, Raja S, Tan J, Das S, Girod D, Tsue T, Sanford T. Correlation of expression of cyclooxygenase 2 vascular endothelial Growth factor and peroxisome proliferator activated receptor with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head and Neck Surg.* 2001 Oct; 127: 1253-9.
11. Abrahao AC, Castilho RM, Squarize CH, Molinolo AA, dos Santos-Pinto D Jr, Gutkind JS. A role for COX2-derived PGE2 and PGE2-receptor subtypes in head and neck squamous carcinoma cell proliferation. *Oral Oncol.* 2010 Dec; 46(12): 880-7.
12. Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993 Jan 21; 328(3): 184-94.
13. Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995 Dec 28; 333(26): 1757-63.
14. Davies G, Salter J, Hills M, Martin L, Sacks N, Dowst M. Correlation between cyclooxygenase 2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul; 9(7): 2651-6.
15. Kim YY, Lee EJ, Kim YK, Kim SM, Park JY, Myoung H, Kim MJ. Anti-cancer effects of celecoxib in head and neck carcinoma. *Mol Cells.* 2010 Feb 28; 29(2): 185-94.
16. McCormick DL, Phillips JM, Horn TL, Johnson WD, Steele VE, Lubet RA. Overexpression of cyclooxygenase-2 in rat oral cancers and prevention of oral carcinogenesis in rats by selective and nonselective COX inhibitors. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 Jan; 3(1): 73-81.
17. Heeren P, Plukker J, van Dullemen H, Nap R, Hollema H. Prognostic role of cyclooxygenase-2 expression in esophageal carcinoma. *Cancer Lett.* 2005 Jul 28; 225(2): 283-9.
18. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2005 Jan; 18(1): 153-60.
19. Yang SF, Chen MK, Hsieh YS, Chung TT, Hsieh YH, Lin CW, Su JL, Tsai MH, Tang CH. Prostaglandin E2/EP1 signaling pathway enhances intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and cell motility in oral cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 Jan; 3(1): 73-81.
20. Li Y, Wo JM, Ray MB, Jones W, Su RR, Ellis S, Martin RC. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett's esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2006 Feb 14; 12(6): 928-34.
21. Díaz Prado A, Gallego Guadalupe JL, López-Cedrún J, Ferreras Granada L, Aparicio A. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and epidermal growth factor (EGF) in oral premalignant epithelial lesions. *Rev Esp Cir Oral Maxillofac.* 2009 May-Jun; 31(3): 170-81.
22. Galiano de Sánchez MT. Cáncer colorrectal (CCR). *Rev Col Gastroenterol.* 2005 Mar; 20(1): 43-53.
23. Boza Y, Yefi R, Rudolph MI, Smith PC, Oberyszyn TM, Tober KL, Rojas IG. Single exposure of human oral mucosa fibroblasts to ultraviolet b radiation reduces proliferation and induces cox-2 expression and activation. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral.* 2010; 3(3): 123-7.
24. Sung YK, Hwang SY, Kim JO, Bae HI, Kim JC, Kim MK. The correlation between cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinogenesis. *Mol Cells.* 2004 Feb 29; 17(1): 35-8.
25. Kaur Saini M, Kaur J, Sharma P, Nath Sanyal S. Chemopreventive response of diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug in experimental carcinogenesis. *Nutr Hosp.* 2009 Nov-Dec; 24(6): 717-23.
26. Li WZ, Huo QJ, Wang XY. Effect of cyclooxygenase-2 inhibitor on expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2010 Dec; 28(6): 591-4.
27. Kaur Saini M, Nath Sanyal S. Evaluación de la respuesta quimiopreventiva de dos inhibidores de la ciclooxigenasa 2, etoricoxib y diclofenaco en el cáncer de colon murino empleando las técnicas espectroscópicas FTIR Y NMR. *Nutr Hosp.* 2010 Jul-Ago; 25(4): 577-85.

## CORRESPONDENCIA

Mounir Elías Battika Díaz  
mounirbattika@hotmail.com

Eduardo Alberto Sosa Figueroa  
eduardoalbertososa@hotmail.com

Francisco J. Pérez Álvarez  
barrien@javeriana.edu.co

Silvia Barrientos Sánchez  
barrien@javeriana.edu.co