

Expresión de ciclo-oxigenasa 2 en carcinoma de laringe

Cyclooxygenase-2 expression in laryngeal carcinoma

Mariela Torrente A¹, Alejandro Paredes W², Pilar Gajardo O³, Rodrigo Arregui V.

RESUMEN

Introducción: La sobrevida de carcinoma escamoso de laringe no ha aumentado significativamente en los últimos 20 años. Ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) es una molécula que tiene un rol en la progresión tumoral ya que estimula la proliferación y angiogénesis e inhibe apoptosis celular.

Objetivo: Evaluar la expresión de COX-2 en muestras de carcinoma escamoso de laringe.

Material y método: Pacientes atendidos en los hospitales Barros Luco Trudeau y San Juan de Dios entre 2008 y 2011 con diagnóstico de carcinoma escamoso de laringe sin tratamiento previo. Se recolectaron tacos de biopsia los cuales fueron estudiados mediante inmunohistoquímica para la expresión de COX-2. Protocolo aprobado por Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Resultados: Se incluyeron 32 casos. En 17 de ellos se describe sobreexpresión de COX-2, lo que equivale al 53% de la muestra. No hubo correlación con edad, sexo ni hábito tabáquico.

Conclusión: La sobreexpresión de COX-2 es un fenómeno frecuente en carcinoma escamoso de laringe por lo cual es una molécula interesante para considerar como candidata a terapia adyuvante.

Palabras clave: Ciclo-oxigenasa 2, carcinoma, laringe.

ABSTRACT

Introduction: Survival of laryngeal squamous cell carcinoma has not improved significantly in the last 20 years. Cyclooxygenase 2 (COX-2) has a role in carcinogenesis since it induces proliferation and angiogenesis, and inhibits apoptosis.

Aim: To evaluate the expression of COX-2 in samples of laryngeal carcinoma.

Material and methods: Patients attending Hospital San Juan de Dios and Barros Luco-Trudeau with diagnose of laryngeal carcinoma between 2008 and 2011 were included. Formalin fixed paraffin embedded samples were collected and COX-2 expression was assayed with immunohistochemistry. The study was approved by the ethics committee of Facultad de Medicina Universidad de Chile, and all patients consented.

¹ Médico Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

² Médico Servicio de Otorrinolaringología, Hospital San Juan de Dios.

³ Médico Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Barros Luco-Trudeau.

Results: 32 cases were included. COX-2 was overexpressed in 17, that is 53%. No correlation was identified with age, sex, or smoking habit.

Conclusion: COX-2 overexpression is a frequent phenomenon in laryngeal carcinoma.

Key words: Cyclooxygenase-2, carcinoma, larynx.

INTRODUCCION

El conjunto de enfermedades denominadas cáncer escamoso de cabeza y cuello constituyen la sexta causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial¹. Su tratamiento puede incluir cirugía, radioterapia y quimioterapia en distintas combinaciones. A pesar del avance en técnicas de tratamiento la sobrevida en estadios avanzados no se ha modificado significativamente en los últimos 20 años². La comprensión de los fenómenos celulares que determinan la aparición de estos tumores podría ser la oportunidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas.

El fenómeno inflamatorio tiene una estrecha relación con la aparición de tumores, como ya lo describió Virshov (citado en 3). Se estima que hasta el 25% de la patología neoplásica es secundaria a un proceso inflamatorio crónico⁴. La reacción inflamatoria favorece la inestabilidad genética mediante la liberación de radicales libres y otras moléculas, también estimula la angiogénesis y proliferación celular^{3,5,6}. Una de los mediadores inflamatorios es ciclo-oxigenasa 2 (COX2). Esta enzima no se expresa normalmente en los tejidos humanos, pero se induce en respuesta a distintos estímulos derivados de factores de crecimiento y citoquinas⁷. En cáncer de cabeza y cuello se ha demostrado la sobreexpresión de COX-2 en tejido tumoral⁸⁻¹¹.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar la expresión de COX-2 en biopsias de pacientes portadores de carcinoma de laringe.

MATERIAL Y METODO

Pacientes

Se incluyeron las biopsias de pacientes portadores de carcinoma de laringe que consultaron en los Servicios de Otorrinolaringología de los Hospitales Barros

Luco-Trudeau y San Juan de Dios, entre los años 2008 y 2011. El trabajo fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y todos los pacientes consintieron para el estudio. Se excluyeron aquellos pacientes portadores de recidiva tumoral, histología distinta a carcinoma escamoso, primario extralaringeo.

Detección de COX-2

La detección de COX-2 se realizó mediante inmunohistoquímica en cortes de biopsias incluidas en parafina y fijadas en formalina. Estos ensayos se realizaron en el laboratorio *Infection and Cancer, International Agency of Cancer*, Lyon, Francia.

Las muestras tenían un número variable de células que fluctuó entre 20% y 80% de la muestra. Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en alcohol. La recuperación de antígenos se realizó con solución Vector H-3300 por 15 minutos, y luego se dejó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se incubó con anticuerpo primario de conejo anti-humano (Abcam) en dilución de 1:400, durante 1 hora. Como anticuerpo secundario se utilizó cabra anti-conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Luego se procedió a la tinción con hematoxilina y montaje definitivo de los cortes. La inmunorreactividad se evaluó en microscopio óptico. Como control positivo se consideró la expresión de COX-2 en el tejido inflamatorio no tumoral de la muestra, y como control negativo se incluyó muestras sin añadir anticuerpo primario.

La expresión de COX-2 se midió mediante la expresión citoplasmática usando una escala semicuantitativa: 0= sin tinción, 1= leve tinción citoplasmática, 2= tinción granular moderada a intensa en 10%-50% de las células tumorales, 3= tinción intensa en más del 50% de las células tumorales. Un puntaje mayor o igual a 2 se consideró como sobreexpresión¹². Todas las muestras fueron analizadas por el mismo patólogo.

Análisis estadístico

Se utilizó test de Wilcoxon para comparación de medianas y test de Fischer para tablas de contingencia, se consideró nivel de significancia <0,05.

RESULTADOS

Se recolectaron 43 casos. Once de ellos se excluyeron por primario extralaringeo (8 casos), biopsia sin tumor (1 caso) y recurrencia tumoral (2 casos). Por lo tanto, se incluyeron 32 pacientes

en el análisis definitivo. De ellos, 30 eran de sexo masculino y 88% tenían hábito tabáquico. La media de edad fue de 65 años, con un rango de 38 a 83 años.

Sobreexpresión de COX-2 se identificó en 17 casos (Figura 1), lo que equivale a 53%. No hubo relación significativa con sexo, consumo de tabaco o edad del paciente (Tabla 1).

DISCUSION

La sobrevida de los tumores de cabeza y cuello avanzados no ha aumentado en forma significativa

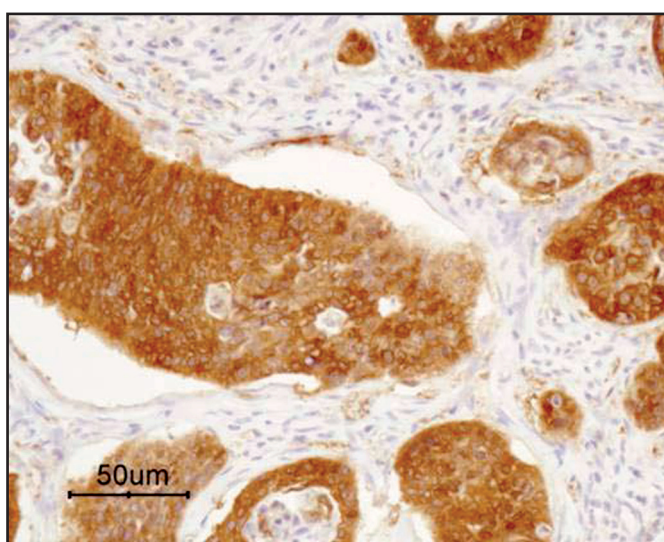


Figura 1. Biopsia de carcinoma de laringe donde se muestra intensa expresión de COX-2 que se manifiesta por coloración café en citoplasma de células tumorales, esto corresponde a expresión tipo 3.

Tabla 1. Descripción de casos en relación a expresión de COX-2*

	n	COX-2 positivo	COX-2 negativo	p
Edad media (años)	32	65	64	0.92**
Sexo				0.73†
Femenino	2	1	1	
Masculino	30	16	14	
Consumo de tabaco				0.65†
Positivo	28	15	13	
Negativo	4	2	2	

*: ciclo-oxigenasa 2

** : test de Wilcoxon

† : test de Fischer

en los últimos 30 años a pesar de los avances en terapias complementarias como quimioterapia y radioterapia². El estudio de los mecanismos celulares que finalmente se traducen en la emergencia de un clon tumoral podría permitir diferenciar distintos subtipos tumorales y optimizar el tratamiento.

El humo del cigarrillo contiene diversas sustancias que tienen un rol inflamatorio en la vía aérea superior, generando de esta forma un ambiente de inflamación crónica. Uno de los mediadores inflamatorios es la enzima COX-2, que tiene un rol en el proceso carcinogénico ya que estimula angiogénesis y proliferación celular. Su sobreexpresión ha sido descrita en tumores de cabeza y cuello en cifras que fluctúan entre 45% y 88%⁸⁻¹¹. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si en biopsias de pacientes chilenos esto también se observaba ya que puede haber variaciones geográficas previamente no identificadas. Nuestros resultados confirman que esta enzima se encuentra sobreexpresada en una proporción importante de casos de carcinoma de laringe.

Al estar COX-2 presente en un porcentaje importante de biopsias, constituye un blanco para terapia dirigida, como ocurre con los anticuerpos específicos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico. Se ha reportado un ensayo clínico utilizando drogas que bloquean ciclo-oxigenasa 2¹³. En este protocolo se reclutaron 14 pacientes portadores de cáncer de cabeza y cuello previamente irradiados que no eran candidatos para radio quimioterapia concomitante. Se les administró erlotinib (anticuerpo antifactor de crecimiento epidérmico) en conjunto con celecoxib, asociado a radioterapia de intensidad modulada con 70 Gy al lecho. El control locorregional y sobrevida global a un año fue de 60% y 55% respectivamente. No hay disponible en la literatura reportes del uso de celecoxib como coadyuvante único.

Los pacientes incluidos en este estudio cuyas biopsias sobreexpresaron COX-2 no tenían características clínicas particulares, la mayoría eran fumadores y hombres. Cabe destacar que de los 4 pacientes que negaron el consumo de tabaco, dos tenían sobreexpresión de COX-2. En estos casos habría que buscar un mecanismo alternativo de inducción de COX-2 como podría ser la presencia de virus papiloma humano a través de oncoproteínas virales E6 y E7¹⁴.

CONCLUSIONES

Ciclo-oxigenasa 2 se encuentra sobreexpresada en un número importante de biopsias de carcinoma de laringe, constituyendo una molécula a considerar como blanco de terapia dirigida.

Agradecimientos

A Tarik Gheit PhD Infections and Cancer Biology Group, Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC, Francia, por la colaboración en la preparación de las muestras. A Dra. Behnoush Abedi-Ardekani Genetic Epidemiology Group, Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC, Francia, por la evaluación de los resultados de la inmunohistoquímica.

Trabajo financiado por Concurso de Investigación de la Sociedad Chilena de Otorrinolaringología.

BIBLIOGRAFÍA

1. COOPER JS, PORTER K, MALLIN K, HOFFMAN HT, WEBER RS, ANG KK, ET ALS. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009; 31: 748-58.
2. HANNA GJ, HADDAD RI, LORCH JH. Induction chemotherapy for locoregionally advanced head and neck cancer: Past, present, future? *The Oncologist* 2013; 18: 288-93.
3. SCHETTER AJ, HEEGAARD NHH, HARRIS CC. Inflammation and cancer: Interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31: 37-49.
4. HUSSAIN SP, HARRIS CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-80.
5. FEDERICO A, MORGILLO F, TUCCILLO C, CIARDIELLO F, LOGUERCIO C. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. *Int J Cancer* 2007; 121: 2381-6.
6. REUTER S, GUPTA SC, CHATURVEDI MM, AGGARWAL BB. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1603-16.
7. GREENHOUGH A, SMARTT HJ, MOORE AE, ROBERTS HR, WILLIAMS AC, PARASKEVA C, ET ALS. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer

- and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-86.
8. CELENK F, BAYRAMOGLU I, YILMAZ A, MENEVSE A, BAYAZIT Y. Expression of cyclooxygenase-2, 12-lipoxygenase, and inducible nitric oxide synthase in head and neck squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2013; 24: 1114-7
 9. KAWATA R, HYO S, ARAKI M, TAKENAKA H. Expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37: 482-7.
 10. SACKETT MK, BAIRATI I, MEYER F, JOBIN E, LUSSIER S, FORTIN A, GÉLINAS M, NABID A, BROCHET F, TÊTU B. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 overexpression in glottic cancer. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 67-73.
 11. ATULA T, HEDSTRÖM J, RISTIMÄKI A, FINNE P, LEIVO I, MARKKANEN-LEPPÄNEN M, HAGLUND C. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: association to p53 and clinical outcome. *Oncol Rep* 2006; 16: 485-90.
 12. MILNE A, CARVALHO R, MORSINK F, MUSLER A, DE LENG W, RISTIMÄKI A, ET ALS. Early-onset gastric cancer have a different molecular expression profile than conventional gastric cancers. *Modern Pathol* 2006; 19: 564-72.
 13. KAO J, GENDEN EM, CHEN CT, RIVERA M, TONG CCL, MISIUKIEWICZ K, ET ALS. Phase 1 trial of concurrent erlotinib, celecoxib, and reirradiation for recurrent head and neck cancer. *Cancer* 2011; 117: 3173-81.
 14. SUBBARAMAIAH K, DANNENBERG J. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins: Evidence of a corepressor/coactivator exchange. *Cancer Res* 2007; 67: 3976-85.