



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

Expresión Inmunohistoquímica de Ciclooxigenasa-2 (COX-2) y Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) en Carcinoma Oral de Células Escamosas según grado de diferenciación histológica.

Alondra Hormazábal Hevia

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrico Escobar López

TUTORES ASOCIADOS

T.M. Cristián Peñafiel Ekdhal

ASESORES

Dr. Fernán Gómez Valenzuela

**Adscrito a Proyecto: DIFO 17-007
Santiago – Chile
Diciembre 2018.**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL**

Expresión Inmunoquímicas de Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF) en Carcinoma Oral de Células Escamosas según grado de diferenciación histológica.

Alondra Hormazábal Hevia

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrico Escobar López

T.M. TUTORES ASOCIADOS

Cristián Peñafiel Ekdhal

ASESORES

Dr. Fernán Gómez Valenzuela

Adscrito a Proyecto: DIFO 17-007

**Santiago – Chile
Diciembre 2018.**

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Agradecida del Profesor Enrico Escobar, Fernán Gómez y Cristián Peñafiel, por hacer posible todo este proceso. Por la guía, la contención, el apoyo y la entrega de conocimiento necesaria para realizar todo este trabajo.

A mi familia, mis padres y hermana, por el apoyo incondicional en todo momento, por el aguante y la comprensión, por la paciencia y el compromiso, porque sin ustedes nada de esto habría sido posible. Gracias por la dedicación que me han dado como padres, por los valores entregados, y por nunca dejar de creer en mí. A mis tías y tíos, primas y primos que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en lo que necesité.

A mis amigos que fueron unas de las mejores cosas que me ha entregado la universidad, ayudando a amenizar el peso y el estrés de la carrera, porque hicieron de todos estos años los más lindos que he tenido. Por la ayuda en los malos momentos y por ser un pilar fundamental dentro de la universidad. A mis amigos de la vida que siempre creyeron en mí, que me tuvieron paciencia y me apoyaron en todo momento.

A todas las personas que aportaron un granito de arena en mi desarrollo humano y profesional, de una u otra manera.

Muchas Gracias.

“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día tras día”.

Robert Collier.-

ÍNDICE

1.- RESUMEN.....	8
2.- INTRODUCCIÓN.....	10
3.- MARCO TEÓRICO	12
I. Carcinoma oral de células escamosas.	12
a. Factores de riesgo y epidemiología.	12
b. Características clínicas.	13
c. Características histopatológicas.	16
II. Cáncer oral e inflamación crónica.....	18
III. Ciclooxigenasa (COX) y cáncer oral.	22
IV. VEFG y cáncer oral.....	25
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVO GENERAL.....	27
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
7.- MATERIALES Y MÉTODOS	28
I. Tipo de estudio	28
II. Universo y selección de muestras	28
a. Criterios de inclusión y exclusión:.....	28
III. Recolección de muestras e información clínica.	29
IV. Procesamiento y técnica inmunohistoquímica:	30
V. Análisis de la información	34
8.- RESULTADOS	36
I. Caracterización epidemiológica de las muestras.	36
II. Localización de COCE en cavidad oral.....	38
III. Inmunoexpresión de COX-2 en COCE según grado de diferenciación y en mucosa oral normal.....	39
IV. Inmunoexpresión de VEGF en COCE según grado de diferenciación y en mucosa oral normal.....	41
V. Correlación de expresión para COX-2 y VEGF, según grado de diferenciación histológica.....	44
9.- DISCUSIÓN.....	45
10.- CONCLUSIONES	55

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	56
12.- ANEXOS.....	71
I. Anexo 1: Comité de Bioseguridad.....	71
II. Anexo 2: Tabla de clasificación TNM para COCE	72
III. Anexo 3: Tabla de datos. IM para COx-2 y VEGF EN COCE y mucosa oral.	73

1.- RESUMEN

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia epitelial maligna más frecuente en la cavidad oral. Dentro de su génesis y desarrollo la inflamación crónica desempeña un rol fundamental. La neoformación de vasos sanguíneos es indispensable para el crecimiento y progresión tumoral (alteración genómica que otorga ventajas en la sobrevivencia celular). Ciclooxygenasa-2 (COX-2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) son marcadores biológicos relacionados con inflamación crónica y angiogénesis respectivamente. El objetivo de este estudio fue describir la expresión y relación entre COX-2 y VEGF en COCE de distintos grados de diferenciación histológica.

Material y métodos: Se seleccionaron 39 muestras de COCE de distinto grados de diferenciación histológica y 7 de mucosa oral. Se realizó técnica de inmunohistoquímica con antígenos anti-COX-2 y anti-VEGF. La cuantificación de los antígenos se determinó mediante un método semicuantitativo, por cuantificación de la inmunotinción citoplasmática en 5 campos (40X) por muestra, para el número total de células y el número total de células positivas a inmunomarcación para las proteínas COX-2 y VEGF, para obtener índice de marcación (IM) (COX-2 y VEGF) expresado en %. Se realizó estadística analítica y descriptiva de los datos obtenidos.

Resultados: La edad media de los pacientes con COCE fue de 64 años, siendo el mayor porcentaje en hombres (71,3%). La localización anatómica más frecuente fue lengua (30,8%). Se observó diferencia estadísticamente significativa en la inmunoexpresión de la proteína COX-2 en COCE versus mucosa oral ($p < 0,0001$) y en COCE poco diferenciado (PD) versus COCE bien diferenciado (BD) ($p < 0,05$). Para la inmunoexpresión de la proteína VEGF se observó diferencia estadísticamente significativa en la inmunoexpresión en COCE versus mucosa oral ($p < 0,0001$), en COCE PD versus COCE BD ($p < 0,0001$), en COCE PD versus COCE moderadamente diferenciado (MD) ($p < 0,001$) y en COCE MD versus COCE BD ($p < 0,05$). Se encontró una correlación positiva entre COX-2 y VEGF en COCE MD ($p = 0,017$) y COCE PD ($p = 0,003$).

Conclusiones: Este estudio demuestra una alta expresión de las proteínas COX-2 y VEGF en COCE. La expresión de ambas proteínas en COCE podría ser utilizada como marcador biológico en el crecimiento y progresión tumoral. Anticuerpos primarios anti-COX-2 y anti VEGF podrían ser indicados como marcadores pronósticos en el crecimiento, progresión, diseminación y metástasis tumoral. Los resultados de este estudio sugieren que el uso de inhibidores de la proteína COX-2 podrían indicarse como terapia complementaria en el tratamiento no quirúrgico de COCE, por las propiedades antiproliferativas, proapoptóticas y antiangiogénicas de estos inhibidores.

2.- INTRODUCCIÓN

El cáncer corresponde a una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. A nivel de la cavidad oral, su detección temprana constituye un importante reto para el cirujano dentista, sin embargo, la consulta tardía de los pacientes y la carencia en el reconocimiento de desórdenes orales potencialmente malignos por parte del odontólogo, limitan su diagnóstico temprano (Oh y cols., 2016).

Esta patología se describe como un conjunto de condiciones, que se caracterizan por una alta tasa de proliferación descontrolada de células atípicas, producto de la pérdida de regulación en el control del ciclo celular y a la inhibición y/o evasión de la apoptosis, con el consiguiente aumento de la supervivencia celular, generando una masa celular conocida como tumor. Esta masa celular posee un crecimiento desregulado con un potencial de progresión y extensión hacia las regiones anatómicas adyacentes, e incluso puede tener la capacidad de diseminarse a órganos y tejidos lejanos a su origen anatómico primario. Aquel evento de invasión celular es denominado metástasis y está asociado a procesos malignos, en el cual se evidencia un desmejoramiento del pronóstico, al contrastarlo con lesiones de comportamiento menos agresivo y/o localizadas sin diseminación ganglionar o a otros tejidos (Barnes y cols., 2005).

Las células cancerosas difieren notablemente de las células normales, no solamente en su comportamiento, sino que también en su grado de diferenciación celular. En relación con esto, se han desarrollado diferentes clasificaciones para cáncer oral según las células involucradas en su desarrollo (El-Naggar y cols., 2017). Dentro de estas clasificaciones, el carcinoma oral de células escamosas (COCE) es el que presenta mayor prevalencia, con un 90% del total de cáncer oral diagnosticado a nivel mundial (El-Naggar y cols., 2017). GLOBOCAN estima una tasa de incidencia mundial de 4.0 casos por 100.000 habitantes por año y una tasa de mortalidad global de 1.9 muertes por cada 100.000 habitantes por año (Ferlay y cols., 2015).

El COCE es un carcinoma con diferenciación escamosa que surge del epitelio de la mucosa oral (El-Naggar y cols., 2017). Las células que lo componen pueden presentar distintos grados de diferenciación, además de propensión a metástasis a linfonodos de manera temprana, describiéndose una mayor frecuencia entre la quinta y sexta década de vida (Barnes y cols., 2005; El-Naggar y cols., 2017). Corresponde a una secuencia de eventos, en los cuales se generan alteraciones irreversibles en los genes que controlan la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular (García García y cols., 2005). Diversos procesos involucrados en la progresión y crecimiento de la masa tumoral en el COCE se han asociado a procesos inflamatorios crónicos, como inhibición y/o evasión de la apoptosis o muerte celular y estimulación de la angiogénesis.

Recientes estudios han relacionado la presencia de inflamación crónica como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer (Colotta y cols., 2009). En este sentido, se han asociado distintos marcadores proteicos presente en el estado inflamatorio, los cuales pueden relacionarse a las anormalidades a nivel celular evidenciadas en el COCE (Díaz y cols., 2009). Uno de los marcadores relacionados es la enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual presenta roles relevantes en carcinogénesis y progresión tumoral al favorecer la conversión de pro-carcinógenos a carcinógenos, la estimulación de la proliferación celular, la inhibición de la apoptosis mediante la inducción de la proteína BCL-2, el incremento del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) responsable de la angiogénesis tumoral, el aumento de la invasión celular, la metástasis y el favorecimiento de la inmunosupresión (Díaz y cols., 2009; Mendes y cols. , 2009). Sin embargo, son escasos los estudios que describan a la proteína COX-2 como un marcador biológico y al anticuerpo anti-COX-2 como marcadores pronósticos para COCE, en contraste con los diversos y numerosos estudios que existen acerca de la asociación entre la expresión de la proteína COX-2 y la carcinogénesis en el tracto digestivo bajo (Zweifely cols., 2002).

3.- MARCO TEORICO

I. Carcinoma oral de células escamosas.

El COCE se describe como una neoplasia epitelial maligna invasiva, donde las células que lo componen pueden presentar distintos grados de diferenciación morfológica, con tendencia a generar metástasis e invasión a otros tejidos (Barnes y cols., 2005). Corresponde a un proceso multi-secuencial que implica alteraciones irreversibles en los genes que controlan la proliferación, apoptosis y la diferenciación celular (García García y cols., 2005). Diversas etapas de la progresión tumoral en COCE se han asociado a procesos inflamatorios crónicos, entre ellas la inhibición y/o evasión de la apoptosis o muerte celular programada, aumento de la proliferación celular descontrolada y la estimulación de la angiogénesis. Existe evidencia que relaciona la presencia de inflamación crónica como factor de riesgo en el desarrollo de cáncer, teniendo implicancias tanto a nivel de la pérdida de la regulación del ciclo celular, como también en la generación de daño a nivel del material genético por inestabilidad genómica (Colotta y cols., 2009).

a. Factores de riesgo y epidemiología.

El COCE posee una etiología multifactorial donde tanto factores intrínsecos como extrínsecos pueden estar presentes, pudiendo generar un efecto acumulativo y progresivo a lo largo de la vida de los pacientes (Momares y cols. 2014). Los factores extrínsecos incluyen agentes externos al organismo, tales como: hábitos tabáquicos, ingesta de bebidas alcohólicas, exposición a radiación ultravioleta, infección por virus papiloma humano, dieta baja en fibras, entre otros. Por otro lado, los factores intrínsecos incluyen: edad avanzada, descompensación de patologías sistémicas, desnutrición general, anemias carenciales (Silverman, 2001; Neville y cols., 2009). Del mismo se ha asociado deficiente higiene oral con el desarrollo de cáncer, sin ser un factor de riesgo independiente (El-Naggar y cols., 2017). Además, resulta interesante considerar que la literatura evidencia

que la herencia pareciera no desempeñar un papel preponderante en el desarrollo de COCE (Silverman, 2001; Khalili, 2008; Neville y cols., 2009)

A nivel epidemiológico, en cavidad oral es la neoplasia maligna más común, representado el 80-90% del total de cánceres orales (Johnson y cols., 2011; El-Naggar y cols., 2017). Se describe con mayor frecuencia entre la quinta y sexta década de vida (El-Naggar y cols., 2017), existiendo predilección por el sexo masculino, pero el incremento de fumar tabaco en mujeres ha producido un aumento de su incidencia en el sexo femenino (Meza y cols., 2009), corroborando el importante rol del tabaquismo por su efecto carcinogénico directo sobre el epitelio de la mucosa oral (Riera y Martínez., 2005). Anualmente son reportados más de 500.000 nuevos casos de COCE (Marur y Forastiere, 2016). En 2012 el proyecto GLOBOCAN estimó 300.373 nuevos casos, con una tasa de incidencia mundial estandarizada por edad de 4,0 casos por 100 000 habitantes por año y una tasa de mortalidad global de 1,9 muertes por 100 000 habitantes por año (Ferlay y cols., 2015).

En los países en desarrollo, el COCE sigue siendo una de las diez principales causas de muerte por cáncer en la población adulta masculina (Torre y cols., 2012). Aunque la incidencia de cáncer oral es altamente variable en el mundo, se acepta que la cavidad oral comprende entre el 6° al 9° lugar de frecuencia, dependiendo principalmente del país y del sexo de los pacientes (Johnson y cols., 2011). Asimismo, se ha reportado un aumento general, pero no universal en la incidencia de COCE en lengua en todo el mundo (Ng y cols., 2017).

b. Características clínicas.

Algunos COCEs se desarrollan en mucosa oral aparentemente normal, pero otros son precedidos por lesiones premalignas clínicamente evidentes, como leucoplasias, eritroplasias y leucoeritroplasias (Malik y cols., 2016).

Frente a esto, se aconseja una inspección exhaustiva al examen clínico rutinario y

preventivo de la mucosa oral, en el que cualquier cambio o alteración de coloración o del relieve debe ser excluido y diferenciado de otras lesiones con diversas posibles etiologías tales como: traumáticas, inmunológicas o vasculares, asimismo, detectar patologías sistémicas que se puedan asociar con el desarrollo de COCE: anemias carenciales, enfermedades infecciosas, etc. (Barnes y cols., 2005; Neville y cols., 2009).

Entre las formas clínicas descritas para COCE se presentan:

- Úlcera o lesión endofítica: Es la forma más común de presentación. Clínicamente se observa una úlcera de fondo sucio con áreas de necrosis, límites difusos y solevantados y base indurada, pudiendo existir casos con sintomatología dolorosa, halitosis, hemorragia espontánea o provocada y supuración piógena por sobreinfección. Asimismo, concomitancia con adenopatías de crecimiento progresivo, asintomáticas, de consistencia dura o pétreo y adherida a planos superficiales o profundos (Barnes y cols., 2005).
- Lesión proliferativa o exofítica: Corresponde a un aumento de volumen exofítico de marcado sobrerrelieve, de superficie lobulada o papilomatosa, tamaño frecuentemente mayor a 1 cm., consistencia firme, e induración en su fase avanzada. Presenta escasa capacidad y potencial de invasión y metástasis. A pesar de ser lesiones de crecimiento lento, son muy agresivas y destructivas localmente (Rekha y Angadi, 2010).
- Combinación de ambas.

Características clínicas en relación con su localización anatómica intraoral

Se ha descrito mayor frecuencia del COCE en bordes laterales de lengua, triángulo retromolar y piso de boca. Sin embargo, también es detectado en otras áreas

anatómicas de la cavidad oral: Cara interna de labios, gingiva, paladar duro y dos tercios anteriores de la lengua. (Barnes y cols., 2005).

Las lesiones en lengua se pueden presentar como un aumento de volumen de aspecto verrucoso o una úlcera, estas últimas pueden infiltrar profundamente, reduciendo la movilidad de la lengua, provocando dislalia. Úlceras profundas se pueden asociar a dolor (Barnes y cols., 2005).

En el labio inferior se presenta principalmente en el bermellón y son eventualmente precedidas por una queilitis actínica por exposición crónica a radiación ultravioleta. En el labio superior son escasos, a menudo se originan en la piel y se extienden por proyección local a la mucosa labial. En gingiva suele presentarse frecuentemente como lesiones endofíticas, que provocan progresivamente dificultad, molestias y dolor con el uso de prótesis removibles dentarias. La movilidad dentaria por infiltración tumoral y compromiso osteolítico hacia huesos maxilares en un evento común (Barnes y cols., 2005).

Debido a la ausencia de sintomatología dolorosa en etapas tempranas, alrededor del 60% del cáncer oral es detectado en estadios tardíos (Soares y cols., 2014), en estos, las lesiones se presentan con un tamaño mayor a un 1 cm. y eventualmente molestias o dolor (Momares y cols., 2014). Además, en un alto porcentaje de estos casos se suele presentar metástasis en linfonodos regionales vecinos al momento de la exploración clínica inicial, lo que se traduce en el desmejoramiento del pronóstico clínico y conlleva acciones terapéuticas más complejas (Blatt y cols., 2017).

TNM

El tamaño del tumor, la diseminación a linfonodos y la presencia de metástasis son los indicadores clínicos más efectivos en el pronóstico del paciente. El sistema de estadificación más utilizado es la clasificación Tumor-Linfonodos-

Metástasis (*TNM*). Esta clasificación hace referencia a tres características clínicas presentes:

- T: Tamaño del tumor primario en centímetros.
- N: Compromiso de linfonodos locales.
- M: Metástasis a distancia.

Una vez determinados estos parámetros, sus valores se registran para clasificar el estadio. Cuanto mayor sea la etapa de clasificación peor será el pronóstico (Neville y cols., 2009). (Anexo 1).

c. Características histopatológicas.

Histológicamente la invasión celular es representada por la proliferación e infiltración de células epiteliales que sobrepasan la membrana basal hacia el tejido conectivo subepitelial. Las células epiteliales, tanto individuales como las agrupadas en islas o nidos, se observan como entidades independientes en el espesor del tejido conectivo sin relación con el epitelio vecino. A menudo se presenta una respuesta inflamatoria o inmune celular en torno al epitelio neoplásico infiltrado, con áreas focales de necrosis y formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) a partir de la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) (Neville y cols., 2009).

Las características histopatológicas relevantes incluyen la pérdida de una interfaz epitelio-conectivo histológicamente bien definida, descrita como pérdida de membrana basal, asociada a una arquitectura alterada de las capas basales del epitelio, particularmente el reemplazo de células basales por células irregulares de mayor tamaño (displasia celular) (Barnes y cols., 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica los COCE según el grado de diferenciación que presenten las células que componen la masa tumoral en: “bien”, “moderadamente” y “poco” diferenciado. Un COCE bien diferenciado (COCE BD) se asemeja morfológicamente a su tejido de origen, caracterizado por

la abundante formación de perlas que queratina (Figura 1), asociado a un crecimiento progresivo en el tiempo y con el potencial de metastatizar en una etapa más avanzada de su curso clínico. Por otro lado, el COCE moderadamente diferenciado (MD) contiene mayor pleomorfismo celular y actividad mitótica nuclear aumentada, incluyendo mitosis anormales, atipias celulares y menor grado de queratinización (Figura 2). Finalmente, se describe que, para lesiones poco diferenciadas (PD), predominan células inmaduras con numerosas mitosis típicas y atípicas y un grado de queratinización mínimo o nulo, resultando difícil identificar su tejido de origen (Figura 3) (Barnes y cols., 2005; El-Naggar y cols., 2017).

Figura 1.

COCE bien diferenciado.
Caracterizado por una abundante formación de perlas de queratina (Barnes y cols., 2005).

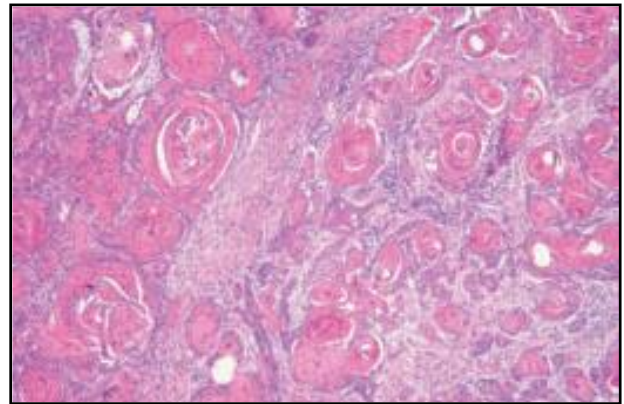


Figura 2.

COCE moderadamente diferenciado.
Las células forman grandes áreas de anastomosis en las que se forman las perlas de queratina. No son muy numerosas y el componente principal consta de células con atipias citonuclear pronunciada (Barnes y cols., 2005).

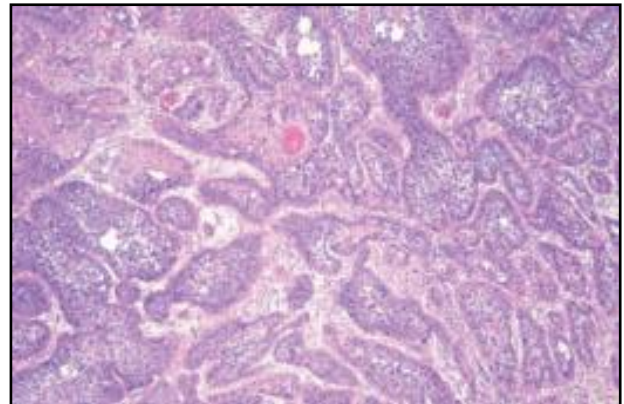
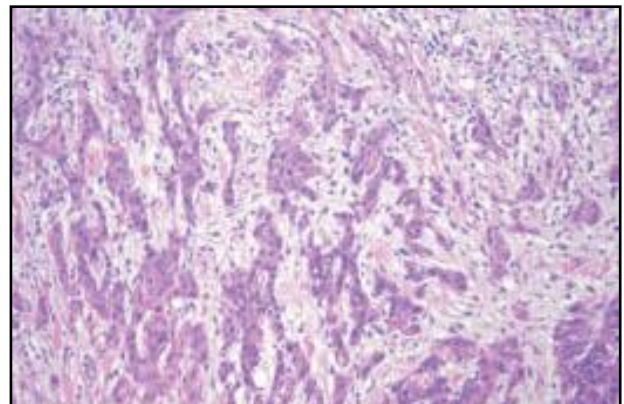


Figura 3.

COCE mal diferenciado.
Células con núcleos atípicos y un pequeño borde de citoplasma eosinofílico forman hebras y pequeños nidos (Barnes y cols., 2005).



II. Cáncer oral e inflamación crónica

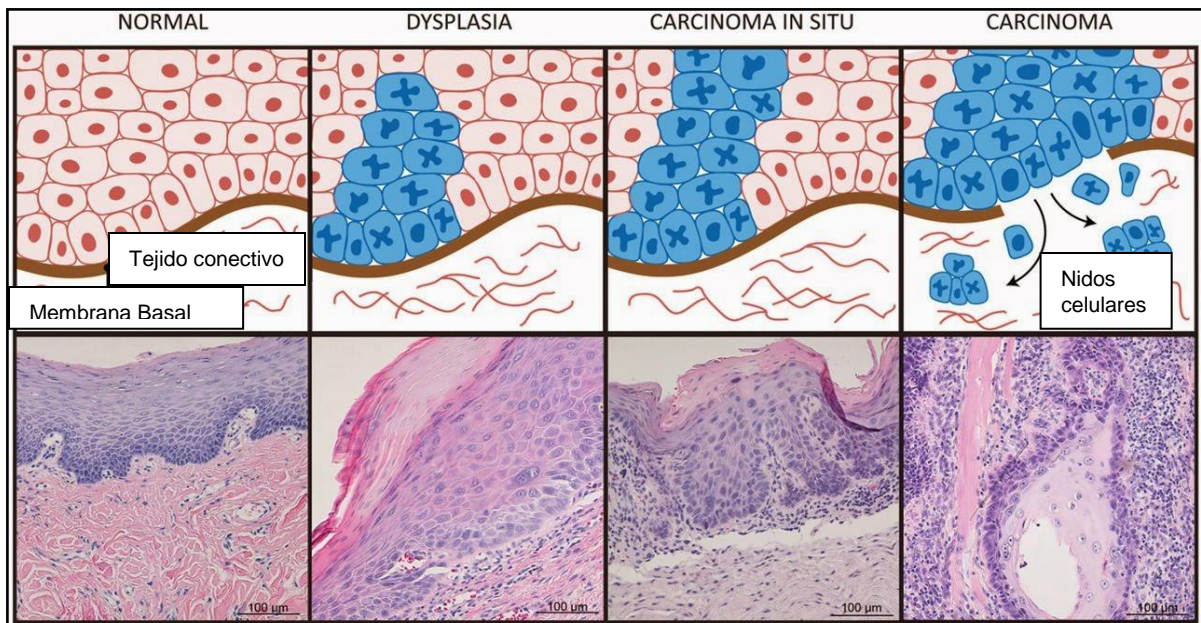
La carcinogénesis y el desarrollo tumoral son el resultado de la presencia de numerosas alteraciones moleculares producidas en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Los protooncogenes son secuencias génicas que codifican las proteínas, cuya función es controlar el crecimiento y diferenciación celular. El resultado de la alteración de la secuencia génica del protooncogén, por mutación, amplificación o reordenamiento cromosómico, se conoce con el nombre de oncogén (Rosell y cols., 2000). Un amplio grupo de oncogenes pueden presentar variaciones en la secuencia de nucleótidos, desencadenando una alteración estructural o funcional de la célula a la cual pertenece, junto con el desarrollo de la capacidad de generar tumores. Fenotípicamente se expresa como una proliferación celular descontrolada, junto a una variación morfológica celular con respecto a su linaje celular de origen (Delgadillo y cols., 2014).

La activación del tumor empieza con daño al ADN debido a la exposición a factores carcinogénicos, como agentes químicos (como consumo de alcohol), físicos (como el humo del tabaco), bacterianos (como *treponema pallidum*, víricos (como virus papiloma) y micóticos (candida) (Colota y cols., 2009). Si este daño no repara, pueden producirse mutaciones. Como resultado de la expresión alterada de los genes comienza una expansión clonal selectiva de las células involucradas. Los productos de dichas células se asocian a una hiperproliferación, inflamación y remodelación tisular (Jané y cols., 2003).

Este proceso de carcinogénesis se puede iniciar siguiendo dos caminos: "De novo", desarrollándose directamente a partir de mucosa sana, o como estado precanceroso (displasia epitelial) (García y cols., 2005). Histológicamente este proceso consiste en la transición, a lo largo del tiempo, desde epitelio normal, hiperplasia, displasia epitelial hasta desarrollarse el COCE (Figura 4) (Díaz y cols., 2009). Frente a las modificaciones a nivel celular, la angiogénesis tumoral juega un papel esencial en el crecimiento, invasión y diseminación metastásica, facilitando el suministro de oxígeno, nutrientes y factores de crecimiento para las

células tumorales (Macedo y cols., 2017). Además de formar abundantes redes microvasculares, las células endoteliales también pueden afectar el crecimiento del tumor mediante la liberación de citoquinas y proteasas, que actúan exacerbando el comportamiento proliferativo e invasivo de las células tumorales adyacentes. Uno de los factores reguladores más relevantes de la angiogénesis es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF). Es un potente agente angiogénico en tejidos neoplásicos, asimismo, se ha evidenciado que mediante la generación de VEGF y su secreción en el tejido vecino, las células tumorales se podrían nutrir de los nuevos vasos sanguíneos (Rajabi y cols., 2017).

Figura 4.



Transición desde epitelio normal a carcinoma. Se observa la invasión de células atípicas hacia el tejido conectivo (Scanlon y cols., 2013)

Al existir una infección o lesión tisular, el sistema inmune elabora una respuesta coordinada de tipo inflamatoria. Las células inmunes innatas como, por ejemplo: macrófagos, mastocitos, células dendríticas (DC) y Natural Killers (NK) son la primera línea de defensa ante cualquier alteración de la homeostasis de los tejidos (Moore y cols., 2010). Éstas pueden iniciar la respuesta inflamatoria liberando citoquinas, quimiocinas, proteasas de remodelación de la matriz y

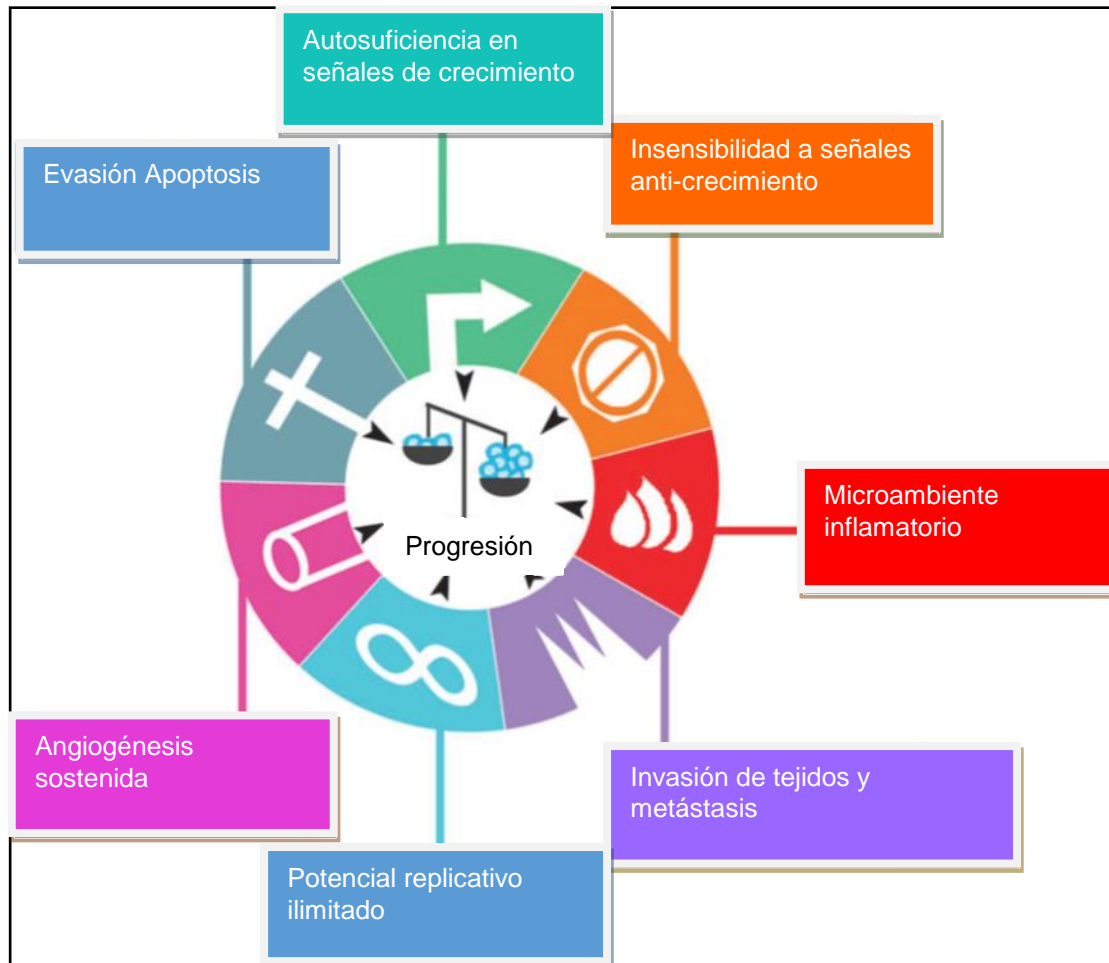
especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, llevando a cabo la eliminación de patógenos y la posterior reparación del daño tisular. Asimismo, las células DC y NK pueden activar la respuesta inmune que requiere especificidad antigénica. No obstante, cualquier alteración en el control de los componentes inmunes puede conducir a una inflamación crónica, generando el ambiente adecuado para el inicio y progresión de cáncer (Hussain y Harris, 2007).

Se han identificado dos vías moleculares y celulares que relacionan cáncer e inflamación: la vía intrínseca, donde los eventos genéticos que causan la carcinogénesis inician la expresión de señales relacionadas con inflamación, que conllevan a un microambiente inflamatorio. Los distintos oncogenes comparten la capacidad de coordinar circuitos proinflamatorios (como reclutamiento de monocitos, activación de factores de crecimiento, etc), en tanto, en la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias existentes facilitan el desarrollo del cáncer (Calota y cols., 2009).

La confluencia de estas dos vías se ha descrito para citoquinas, quimiocinas y factores de transcripción específicos que, una vez activados, presentan la capacidad de aumentar la expresión de los genes que son comunes tanto para regulación y la producción de mediadores de la inflamación, como también para los relacionados a la regulación de la supervivencia y la proliferación de las células cancerosas (Figura 5) (Calota y cols., 2009; Feller y cols., 2013). Las distintas vías celulares activadas por la inflamación crónica provocada por infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes y/o autoinflamatorias o por reparación de heridas en los sitios de lesión, constituyen factores de riesgo para la inducción celular inicial y para la progresión y crecimiento del tumor maligno. En estos últimos, las células cancerosas inducen desarrollo de un estado inflamatorio exagerado en el estroma, que a su vez promueve el crecimiento de las células malignas tumorales, invasión a linfonodos y metástasis. Las células inflamatorias (especialmente las de origen mielóide) en el estroma asociado al tumor pueden ser responsables de la supresión de la respuesta inmune contra las células

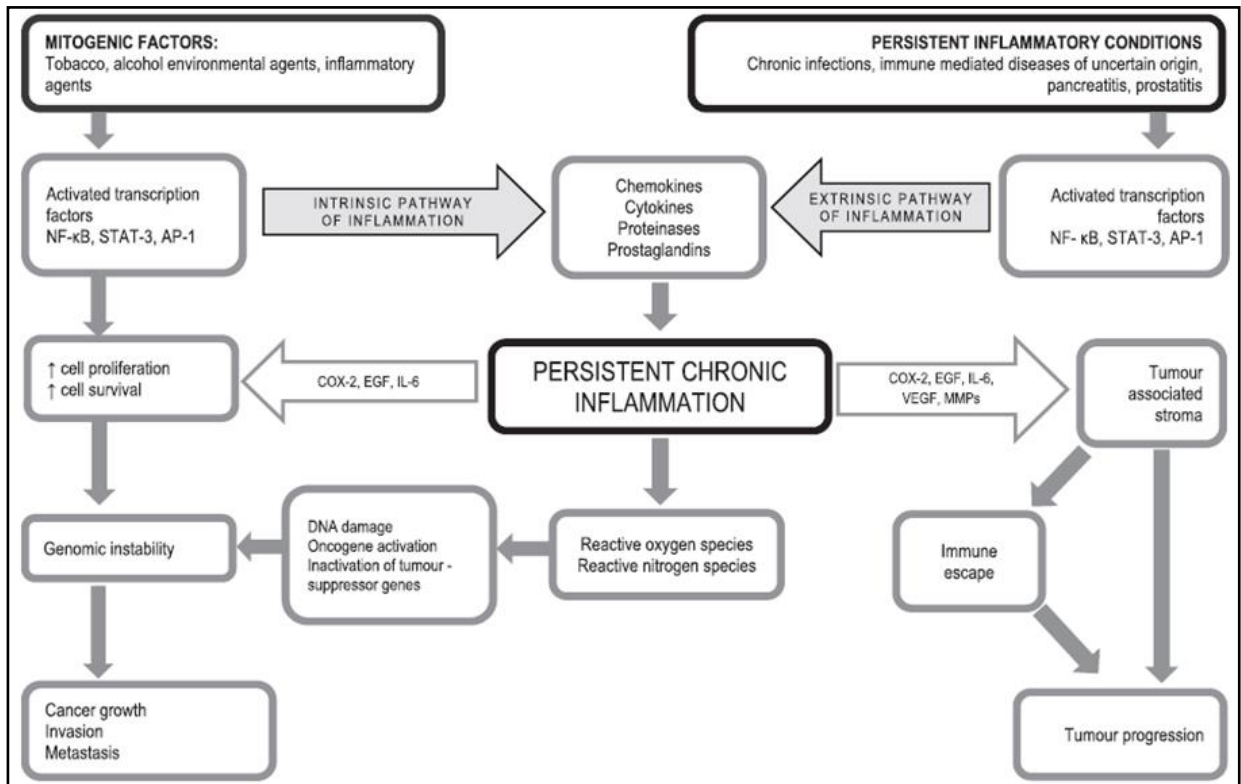
tumorales malignas, lo que favorece el crecimiento y progresión de la masa tumoral (Figura 6) (Feller y cols., 2013).

Figura 5.



Inflamación como característica del cáncer. Una integración a las seis características del cáncer [modificado de Hanahan y Weinberg, 2011 y Colota y cols., 2009].

Figura 6.



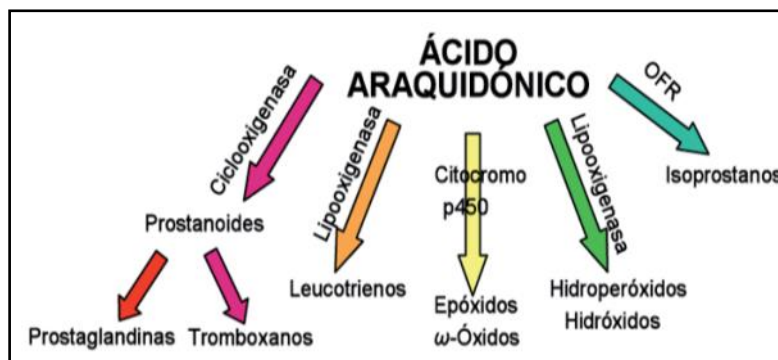
Inflamación crónica persistente y su relación con el progreso del proceso carcinogénico. (Feller y cols., 2013)

III. Ciclooxygenasa (COX) y cáncer oral.

COX es una enzima que transforma el ácido araquidónico (a partir de fosfolípidos de la membrana basal) en productos intermedios inestables: prostaglandinas y tromboxanos (Figura 7). Las prostaglandinas tienen un rol determinante en el control homeostático, como la mantención de la integridad de la mucosa gástrica, función plaquetaria y el flujo plasmático renal, entre otras (Mendes y cols., 2009). Su producción está regulada por dos isoformas de COX, llamadas COX-1 y COX-2. La primera es una isoforma constitutiva que se ha descrito en la mayoría de los tejidos, pero es particularmente importante en los vasos sanguíneos, plaquetas,

estómago, intestino, páncreas y riñón. La segunda, es una enzima inducible, estimulada por citotoxinas, endotoxinas, factores de crecimiento y mitógenos. Es esta isoforma la que se encuentra sobre-expresada en la inflamación y se considera uno de los principales mediadores en este proceso (Díaz y cols., 2009; Mendes y cols., 2009). A pesar de esto, se ha evidenciado que COX-2 tiene presencia constitutiva en algunos órganos, tales como sistema nervioso central y vesículas seminales (Byatnal y cols., 2015). En las últimas décadas, se han descrito elevados niveles de COX-2 en diversos tumores de cabeza y cuello (Chan y cols., 1999; Mendes y cols., 2009). Este incremento en la expresión resulta en un aumento en la síntesis de prostaglandinas asociadas con la inflamación y carcinogénesis, existiendo evidencias tangibles de que COX-2 está sobreexpresada en células estromales tanto extra como intratumorales y así como en células neoplásicas propias del tumor (Díaz y cols., 2009). El rol de COX-2 en la tumorigénesis fue demostrado inicialmente en modelos animales para la Poliposis Familiar Adenomatosa, una enfermedad genética conducente al desarrollo de adenocarcinomas gastro-intestinales (Zweifel y cols., 2002). Sin embargo, el impacto en el aumento de la expresión de la proteína COX-2 en la carcinogénesis del COCE no ha sido dilucidado por completo (Blatt y cols., 2017).

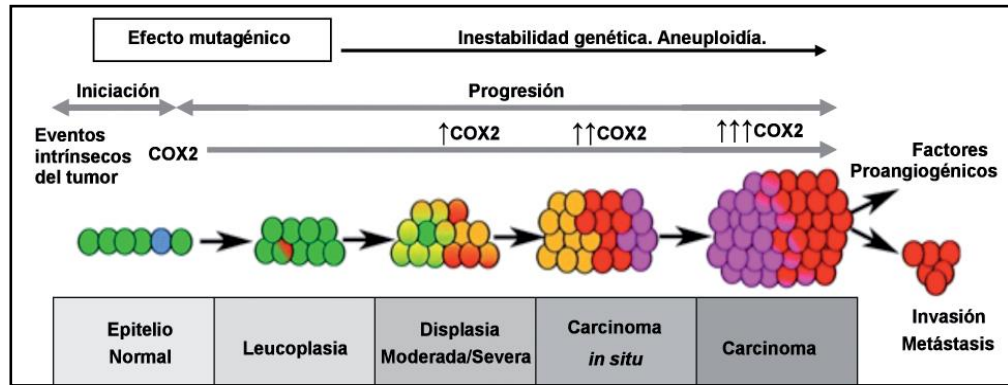
Figura 7.



Mecanismos celulares de oxidación del ácido araquidónico (AA). El AA puede ser oxidado en las células por diferentes rutas dando lugar a diferentes grupos de compuestos. De estos, los prostanoides originados producto de la acción de COX (prostaglandinas y tromboxanos) están asociados a una alta actividad biológica, junto con leucotrienos (productos de la acción de la enzima lipooxigenasa). (Díaz y cols., 2009)

Liu y cols describen la importancia de la COX-2 en tumorigénesis, demostrando que el aumento de la expresión de la proteína COX-2 en glándula mamaria de ratones transgénicos induciría carcinogénesis (Liu y cols., 2001). Por otro lado, se ha descrito que los inhibidores selectivos de la COX-2 afectan la proliferación de las células epiteliales tumorales (Shibata y cols., 2005). La alta expresión de COX-2 ha sido descrita en diversos tumores malignos en humanos, que incluyen carcinomas en colon (Eberhart y cols., 1994), estomago (Leung y cols., 2001), esófago (Kase y cols., 2003), mama (Davies y cols., 2003), próstata (Kirschenbaum y cols., 2000) y cabeza y cuello (Chan y cols., 1999; Galo y cols., 2001; Itoh y cols., 2003). Estudios in vitro han demostrado que las células con alta inmunoexpresión proteica de COX-2 presentan cambios fenotípicos, que podrían incrementar su potencial capacidad tumorigénica, como la mayor adhesión a las proteínas de la matriz extracelular y evasión a la apoptosis (Byatnal y cols., 2015). Así mismo, se ha descrito que la alta expresión de COX-2 contribuye a la carcinogénesis y al desarrollo del fenotipo maligno a través de mecanismos tales como: conversión de pro-carcinógenos a carcinógenos como consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico, la estimulación de la proliferación celular, la inhibición de apoptosis, el incremento de la angiogénesis mediante la sobreexpresión de VEGF, el aumento de la invasión tumoral y la metástasis mediante la inducción de las metaloproteinasas de matriz y el incremento de la inmunosupresión (Méndez y cols., 2009; Díaz y cols., 2009). Además, la expresión de COX-2 ha sido significativamente relacionada con la metástasis de linfonodos en los carcinomas de próstata (Yoshimuray cols., 2000), carcinomas cervicales uterinos (Bandyopadhyay y cols., 2011) y cánceres gástricos (Byatnal y cols., 2015). En COCE se ha descrito la presencia de COX-2 asociada a lesiones preneoplásicas, con un aumento durante los cambios fenotípicos desde epitelio normal, hasta el desarrollo de carcinoma (Figura 8) (Díaz y cols., 2009).

Figura 8



En el desarrollo de lesiones preneoplásicas orales a COCE, se observa un incremento constante de COX- 2 a lo largo de este proceso. (Modificado de Díaz y cols., 2009)

IV. VEGF y cáncer oral.

La causa primaria de mortalidad por cáncer es la formación de metástasis a distancia, donde las células involucradas poseen la capacidad de invadir otros tejidos incluso a órganos o tejidos muy distantes al tumor inicial primario. De la misma manera, la masa tumoral avascular se vuelve dependiente de angiogénesis para su mantenimiento y progresión. COX-2 induce la producción de factores como VEGF, fundamental en la producción de nuevos vasos sanguíneos (Byatnal y cols., 2015).

VEGF es producido por muchos tipos de células, incluyendo las células tumorales, macrófagos, plaquetas, queratinocitos y células renales. La evidencia destaca que la actividad de VEGF no se limita al sistema vascular, sino que también desempeña un papel relevante en funciones fisiológicas normales, tales como la osteogénesis, hematopoyesis y proceso de cicatrización (Duffy y cols., 2004). Además, induce el estroma vascular no sólo como un mitógeno directo de las células endoteliales, sino como un potente mediador de la permeabilidad microvascular. También se ha descrito su alta expresión en una variedad de tumores benignos y malignos humanos (Basnaker y cols., 2014). En tejidos

benignos, como los ovarios (células lúteas), tubas uterinas, endometrio y tráquea, la expresión de VEGF podría indicar que este factor desempeña un papel importante en la secreción luminal, aumentando la permeabilidad vascular local (Rosales y cols., 2011).

VEGF es el único péptido de la angiogénesis que actúa específicamente en las células endoteliales, por lo tanto, se considera uno de los factores más relevantes en la promoción de este proceso (Sappayatosok y cols., 2009).

Considerando la evidencia presentada que indica que el aumento de la expresión de las proteínas COX-2 y VEGF desempeñaría un rol relevante en la carcinogénesis y en la progresión tumoral, la inhibición selectiva de la proteína COX-2 podría ser un objetivo terapéutico potencial para aumentar la supervivencia de pacientes diagnosticados con COCE (Itoh y cols., 2003). Sin embargo, la mayoría de los protocolos para estadificación de cáncer de cuello y cabeza no relacionan estos hallazgos inmunohistoquímicos entre sí, ni con los parámetros clínicos. Asimismo, en la actualidad, el desarrollo y uso de marcadores moleculares que orienten el pronóstico para COCE no es una situación rutinaria. Por lo tanto, los anticuerpos anti-COX-2 y anti- VEGF podrían ser considerados marcadores pronósticos relevantes en el estudio de COCE, y la cuantificación de estas proteínas (COX-2 y VEGF) como marcadores biológicos, tendrían un rol fundamental en la patogénesis y crecimiento del COCE (Díaz y cols., 2009).

El presente trabajo permitirá determinar y analizar la inmunoexpresión de COX-2 y VEGF en COCE, con el fin de aportar evidencia en la relación entre inflamación crónica y angiogénesis en el contexto del proceso carcinogénico en COCE, así como poner en evidencia la utilidad de esta proteína (COX-2) como marcador biológico en COCE, para futuras proyecciones terapéuticas en el ámbito médico y odontológico.

4. HIPÓTESIS.

Existe una mayor expresión de las proteínas COX-2 y VEGF en COCE, respecto a la expresión de estas proteínas en mucosa oral.

5. OBJETIVO GENERAL.

Determinar la expresión inmunohistoquímica de las proteínas COX-2 y VEGF de muestras de COCE y mucosa oral del Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Cuantificar y analizar la expresión de las proteínas COX-2 y VEGF, mediante inmunohistoquímica en células epiteliales presentes en COCE y en mucosa oral.
2. Cuantificar y analizar la expresión de las proteínas COX-2 y VEGF mediante inmunohistoquímica en las células epiteliales presentes en COCE, clasificados según grado de diferenciación.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS

I. Tipo de estudio

Estudio observacional descriptivo transversal.

II. Universo y selección de muestras

Se seleccionaron 39 muestras con diagnóstico de COCE, fijadas con formalina 10% e incluidas en parafina, obtenidas del registro del Servicio de anatomía patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se clasificaron según su grado de diferenciación (14 COCE BD, 13 COCE MD, 12 COCE pobremente diferenciados) y se incluyeron 7 muestras de mucosa oral. Dichas muestras se seleccionaron según criterios de inclusión y exclusión del estudio.

Estas muestras corresponden a los envíos de biopsias para solicitud de informe anatomopatológico con fines diagnósticos, principalmente de hospitales públicos y servicios de cirugía máxilofacial universitarios de la Región Metropolitana de Santiago de Chile entre los años 1984 y 2011.

a. Criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- i. Muestras que correspondan a diagnósticos de COCE por grado de diferenciación según tipificación histológica OMS 2005.
- ii. Muestras de mucosa oral normal correspondiente a mucosa masticatoria y de revestimiento.

Criterios de exclusión

- a. Las muestras que dispongan información clínica incompleta en relación con edad, sexo y localización anatómica.
- b. Las muestras de COCE obtenidas posterior al tratamiento quirúrgico que incluyan quimioterapia o radioterapia.
- c. Las muestras de COCE que correspondan a recurrencias y/o recidivas post-tratamiento quirúrgico.
- d. Muestras de mucosa oral que presenten un infiltrado inflamatorio moderado a severo (Clark et al., 2006) en el conectivo adyacente al epitelio.

III. Recolección de muestras e información clínica.

Recopilación de muestras: Se obtuvieron los bloques de parafina de las muestras registradas en la base de datos digital del Servicio de Anatomía Patológica de la Universidad de Chile, registrados entre los años 1984-2011 para lesiones que presenten el diagnóstico histopatológico de COCE. Se realizaron los procedimientos de laboratorio correspondientes a la obtención de nuevas laminillas para tinción corriente hematoxilina-eosina. Posteriormente, se reevaluaron las laminillas histopatológicas según los criterios histopatológicos acordados (Barnes y cols., 2005) para tinción hematoxilina-eosina (HE) a microscopia óptica a distintos aumentos (objetivos: 4X, 10x, 40x) (Figura 9). Estas observaciones microscópicas se realizaron en forma ciega, en un microscopio Olympus® BX41.

Recopilación de datos clínicos: La información clínica se obtuvo a partir de las fichas clínicas de los pacientes registrados en la base de datos digital del Servicio de Anatomía Patológica (Microsoft®Access2003). Dicha información se recopiló en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft® Excel 2010.

IV. Procesamiento y técnica inmunohistoquímica:

Las muestras fueron fijadas en formalina buffer al 10% y procesadas para técnica histológica convencional. Se obtuvieron secciones de 4 μm de espesor, para obtener 2 cortes de cada muestra, una para cada uno de los anticuerpos utilizados, para luego posicionarlos en portaobjetos silanizados (Colourcoat + Adhesion, CellPath Ltd., Reino Unido).

La inmunotinción se realizó usando Biotin-Streptavidin-Horseradish Peroxidase Detection System (BSB 0003, Bio SB, Santa Barbara CA, EE. UU.) y anticuerpos primarios de ratón o de conejo. Las muestras se desparafinaron en xilol durante 20 minutos y luego se hidrataron en etanol graduado (etanol absoluto y posteriormente, solución de etanol al 95%) durante 10 minutos cada una y luego se embebieron en agua destilada durante 10 minutos. Los portaobjetos desparafinados se sumergieron en PBS (pH = 7,4 \pm 0,2) durante 10 minutos. Los portaobjetos se sumergieron en solución tampón de citrato 10 mM (pH 6,0) para la recuperación antigénica y se transfirieron a un vaporizador de alimentos Oster®, hasta que el PBS alcanzó el punto de ebullición. Las muestras se mantuvieron en este proceso durante 20 minutos y se dejaron enfriar hasta 21°C. La actividad de peroxidasa interna se bloqueó usando peróxido de hidrógeno en metanol al 3% y Mouse/Rabbit Immunodetector Peroxidase Blocker Solution (BSB 0003, Bio SB, Santa Bárbara CA, EE. UU.) durante 20 minutos cada uno a temperatura ambiente. Los siguientes anticuerpos monoclonales primarios se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y más tarde, a 4°C durante la noche: anticuerpo primario anti COX-2 (BSB 5362, Bio SB, Santa Bárbara CA, EE. UU., Dilución 1: 100) y anticuerpo primario anti VEGF (BSB 6054, Bio SB, Santa Bárbara CA, EE. UU., Dilución 1:50). Posteriormente las muestras depositadas en los portaobjetos se incubaron secuencialmente con Mouse / Rabbit Immuno-Detector Biotin-Link (BSB 0003, Bio SB, Santa Bárbara CA, EE. UU.) Y Mouse / Rabbit Immuno-Detector HRP Label (BSB 0003, Bio SB, Santa Bárbara CA, EE. UU.) durante 20 minutos cada uno a temperatura ambiente. Se usó PBS como tampón de

lavado durante 30 minutos según requerimiento entre cada etapa. La reacción de peroxidasa se realizó con reactivo cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (Immunodetector DAB Chromogen, BSB 0003, Bio SB, Santa Barbara CA, EE. UU.). Después de lavar con agua destilada durante 30 minutos, las muestras se contra-tiñeron ligeramente con solución de hematoxilina durante 1 minuto y luego se rehidrataron en etanol graduado (solución de etanol al 95% y etanol absoluto) durante 10 minutos cada una, limpiadas en xilol durante 20 minutos.

Figura 9.

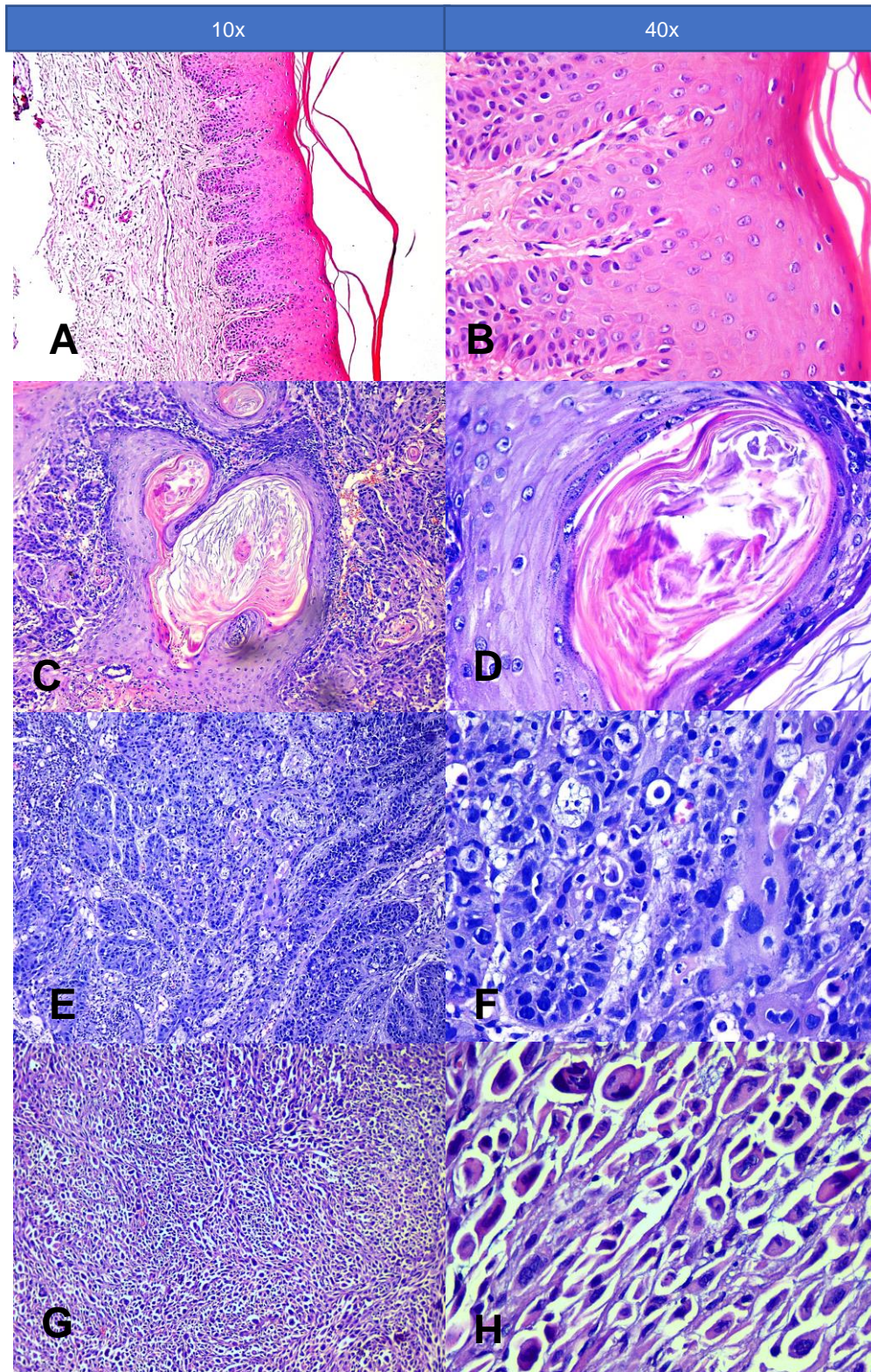


Figura 9. Microfotografías con tinción H/E. Muestras de mucosa oral (A y B), COCE BD (C y D), MD (E y F), y PD (G y H) a aumentos 10x y 40x.

A. Controles positivos y negativos

Se emplearon las siguientes muestras para los controles positivos externos:

- COX-2: Adenocarcinoma colon (Figura 10 A, B).
- VEGF: Hemangioma (Figura 10 E, F).

Para controles positivos internos:

- COX-2: Linfocitos
- VEGF: Células endoteliales.

Para los controles negativos se omitió el anticuerpo primario y secundario en las muestras empleadas como controles positivos y fue reemplazado por solución PBS pH 7,4. (Figura 10 C, D, G y H)

B. Cuantificación de los antígenos en estudio

La presencia y cuantificación de células marcadas a la técnica de inmunohistoquímica se determinó mediante un método semicuantitativo, contabilizando visualmente el número de células con tinción citoplasmática color marrón, por campo de (objetivo) 40x para microscopía óptica convencional (Olympus BX41) en 5 campos por muestra estudiada. El área por campo de 40x fue de 0,13 mm². Se tomó una microfotografía por cada campo estudiado, que fue procesada con el software Micrometrics SE Premium y guardada en formato JPGE. Se calculó el conteo de células endoteliales y células epiteliales neoplásicas a través del programa de dominio público ImageJ (v1.51k, National Institutes of Health, USA). El índice de marcación (IM) para COX-2 (IM_{COX-2}) y VEGF (IM_{VEGF}) fue obtenido entre el cociente de células marcadas (positivas) para inmunotinción citoplasmática y el número total de células (marcadas y no marcadas) por cada campo. Este recuento se realizó en forma ciega por dos observadores. Para cuantificar el grado de concordancia de los examinadores se utilizó el test estadístico de Kappa. El promedio del IM de cada muestra tanto para COX-2 y VEGF se obtuvo de 5 campos estudiados y se expresó en

términos de porcentaje (%), para ser analizados en el programa estadístico correspondiente. La información obtenida fue recopilada en una planilla del programa Microsoft Office: Microsoft Excel.

V. Análisis de la información

Se realizó un análisis exploratorio mediante estadística descriptiva para caracterizar las variables demográficas de la muestra. La estadística analítica se realizó usando los programas GraphPad Prisma v6.2 e IBM® SPSS® Statics v23. Se llevó a cabo la estadística descriptiva con el fin de reconocer las medidas de tendencia central, posición y dispersión. Se determinó el tipo de distribución de los datos a través de la prueba de D'Agostino-Pearson. Para comparar las medias entre estos grupos, se usó test paramétrico ANOVA y test no paramétrico Mann Whitney. Posteriormente, se utilizó la prueba de chi-cuadrado de Pearson y Spearman (en casos de distribución no Normal) para determinar la asociación entre las distintas variables categóricas (sobreexpresión de proteína a través del IM y según grado de diferenciación). Finalmente, se utilizó la prueba post-hoc de Tukey y corrección de Bonferroni como test de comparaciones múltiples. Un valor $p < 0,05$ fue considerado como límite de significancia, con un intervalo de confianza del 95%.

Figura 10.

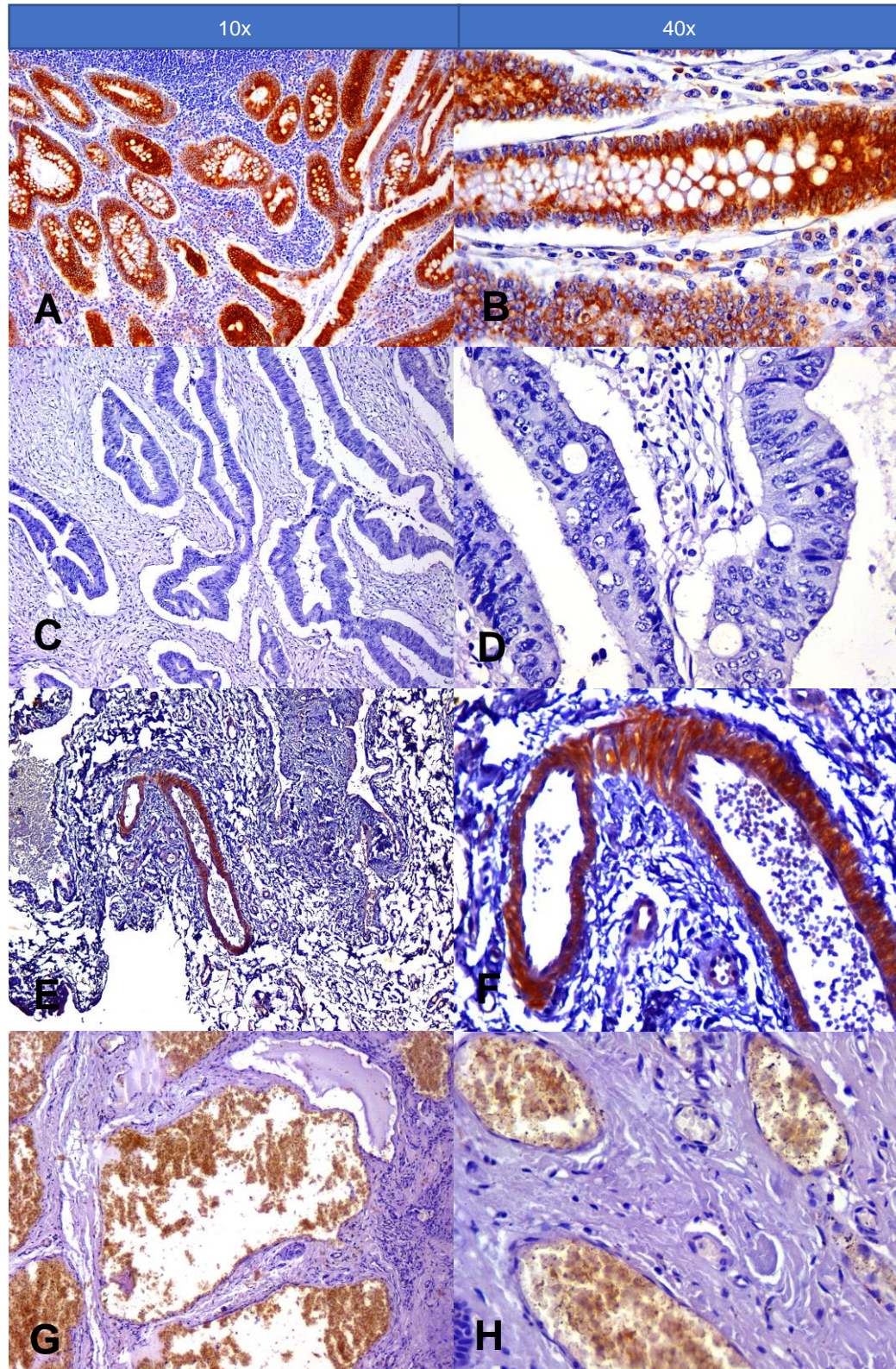


Figura 10. Microfotografías de controles positivos (A, B, E y F) y negativos (C, D, G y H). Técnica de inmunohistoquímica para COX-2: Adenocarcinoma de colón (A, B, C y D) Técnica de inmunohistoquímica para VEGF: Hemangioma (E, F, G y H), a aumentos 10x y 40x.

8.- RESULTADOS

I. Caracterización epidemiológica de las muestras.

De un total de 36 muestras con diagnóstico de COCE, 14 (35.9%) correspondieron a COCE BD, 13 (33.3%) a COCE MD y 12 (30,8%) a COCE PD siendo la edad promedio para los grados de diferenciación histológica 66 ($\pm 11,27$ SD), 66 ($\pm 13,67$ SD) y 60 ($17,82 \pm$ SD) años, respectivamente (Tabla 1).

Según el análisis de la prevalencia de lesiones por sexo, se obtuvo 11 de pacientes hombres (78,6%) y 3 mujeres (21,4%); 10 de pacientes hombres (76,9%) y 3 de mujeres (23,1%); 7 de hombres (58,3%) y 5 mujeres (47,1%); para los grados de diferenciación COCE BD, MD y PD respectivamente (Tabla 1).

En el análisis específico por década y sexo, el mayor porcentaje de las muestras de COCE se concentró en hombres pertenecientes a la 7ma década ($n=9$; 23,1%). Al analizar el período más afectado, sin considerar el sexo del paciente, la mayor frecuencia fue en la 8va década ($n=11$; 28,2%; $M=8$, $F=3$) (Tabla 2).

Tabla 1.

Muestras	n (%)	Promedio (años)	edad	SEXO	
				M n (%)	F n (%)
COCE BD	14 (35,9)	66		11 (78,6)	3 (21,4)
COCE MD	13 (33,3)	66		10 (76,9)	3 (23,1)
COCE PD	12 (30,8)	60		7 (58,3)	5 (41,7)
TOTAL	39 (100)	64		28 (71,3)	11 (28,7)

Tabla 1. Número y porcentaje de muestras de COCE BD, COCE MD y COCE PD con promedio de edad y distribución por sexo.

Tabla 2.

Década	31-40		41-50		51-60		61-70		71-80		81-90	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
COCE BD	0	0	0	1	3	0	3	0	5	2	0	0
COCE MD	1	0	0	0	3	0	3	0	3	0	0	3
COCE PD	2	1	0	1	1	1	3	0	0	1	1	1
TOTAL	3	1	0	2	7	1	9	0	8	3	1	4
%	10,3		5,10		20,5		23,1		28,2		12,8	

Tabla 2. Distribución de COCE según década y sexo.

II. Localización de COCE en cavidad oral

Las localizaciones con mayor frecuencia en las muestras de carcinoma oral fueron lengua con 12 casos (30,77%), siendo el borde lateral lingual el sitio más afectado con 7 casos (17,95%); encía, con 6 (15,39%); y piso de boca con 6 también (15,38%). (Tabla 3).

Tabla 3.

LOCALIZACIÓN		COCE BD	COCE MD	COCE PD	TOTAL, n (%)
Paladar	Blando	-	-	2	2 (5,13)
	Duro	1	-	-	1 (2,56)
Encia	Maxilar	1	-	1	2 (5,13)
	Mandibular	1	-	3	4 (10,26)
Lengua	Cara dorsal	1	3	-	4 (10,26)
	Borde lateral	5	2	-	7 (17,95)
	Base	-	-	1	1 (2,56)
Labio	Superior	1	-	1	2 (5,13)
	Inferior	1	1	-	2 (5,13)
Mucosa yugal		1	2	1	4 (10,26)
Reborde alveolar		1	1	1	3 (7,69)
Trigono retromolar		1	-	-	1 (2,56)
Piso de boca		-	4	2	6 (15,38)
n (%)		14 (35,9)	13 (33,3)	12 (30,8)	39 (100)

<p>Tabla 3. Número y porcentaje de muestras de COCE BD, COCE MD y COCE PD según localización anatómica.</p>

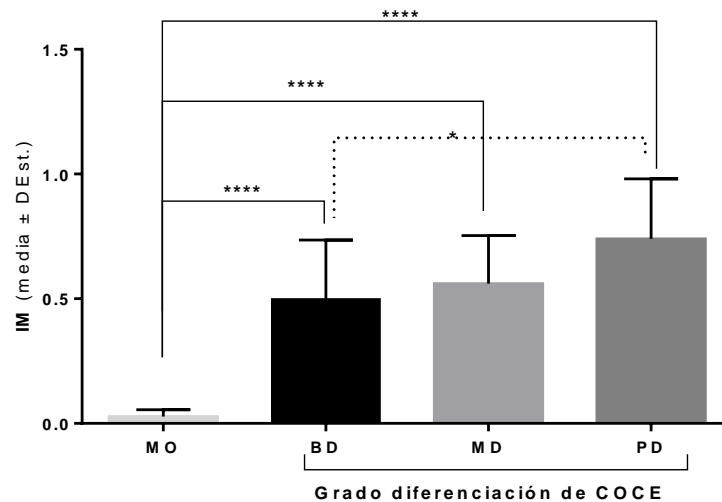
III. Inmunoexpresión de COX-2 en COCE según grado de diferenciación y en mucosa oral normal

Los porcentajes de medias de IM citoplasmática para COX-2 según grado de diferenciación fueron en COCE BD 49,98% ($\pm 0,24$ SD), en COCE MD 58,25% ($\pm 0,19$ SD) y en COCE PD 76,14% ($\pm 0,23$ SD). En mucosa oral se encontró una media de IM citoplasmática de 2,80% ($\pm 0,05$ SD) (Figura 11) (Anexo 2).

El análisis de distribución de datos arrojó distribución normal para los grupos COCE BD, COCE MD y Mucosa oral (MO) y distribución no normal para el grupo COCE PD (Tabla 4). Al analizar la expresión de la proteína entre mucosa normal y los 3 grupos de carcinoma, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre MO y COCE BD ($p < 0,0001$), MO y COCE MD ($p < 0,0001$), y entre MO y COCE PD ($p < 0,0001$). Así mismo dentro de los 3 grupos de COCE, solo existió diferencia significativa entre BD y PD ($p < 0,05$). (Gráfico 1).

Gráfico 1.

Expresión de COX-2 en COCE según grado de diferenciación



Media de Índice de Marcación (IM) para COX-2 en COCE según grado de diferenciación bien diferenciado (BD), medianamente diferenciado (MD) y pobremente diferenciado (PD) y mucosa oral normal (MO) \pm desviación estándar (DEst.). (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

Figura 11.

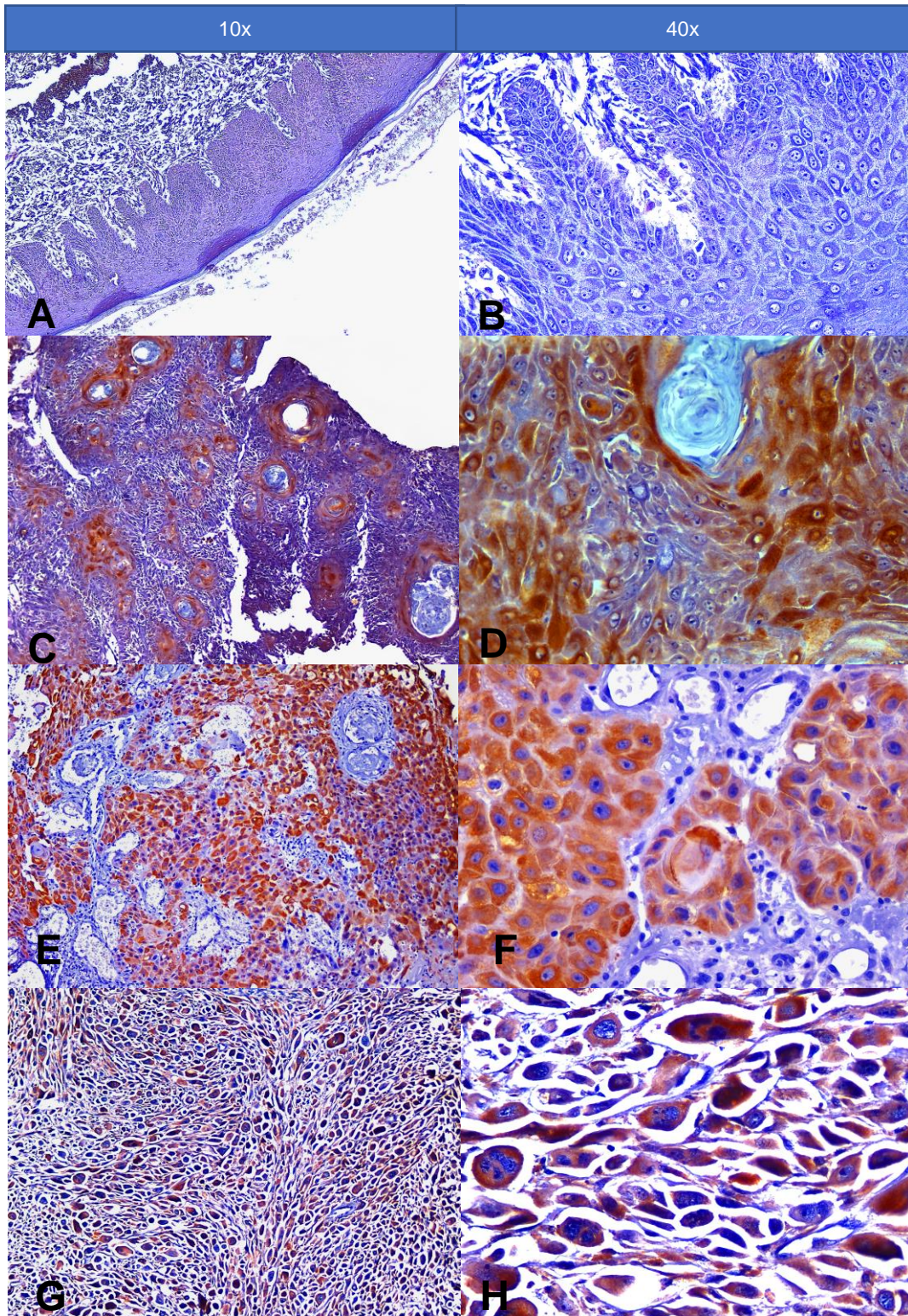


Figura 11. Microfotografías de mucosa bucal normal (A, B) y tejidos orales con diagnóstico de COCE (C-H) y con técnica inmunohistoquímica para COX-2 a un aumento de 10x y 40x.

COCE BD (C y D), COCE MD (E y F) y COCE PD (G y H).

Tabla 4.

Estudio de distribución de datos. Prueba de D'Agostino-Pearson								
Tipo de Distribución	COX-2				VEGF			
	BD	MD	PD	MO	BD	MD	PD	MO
Normal	X	X		X	X	X	X	
No normal				X				X

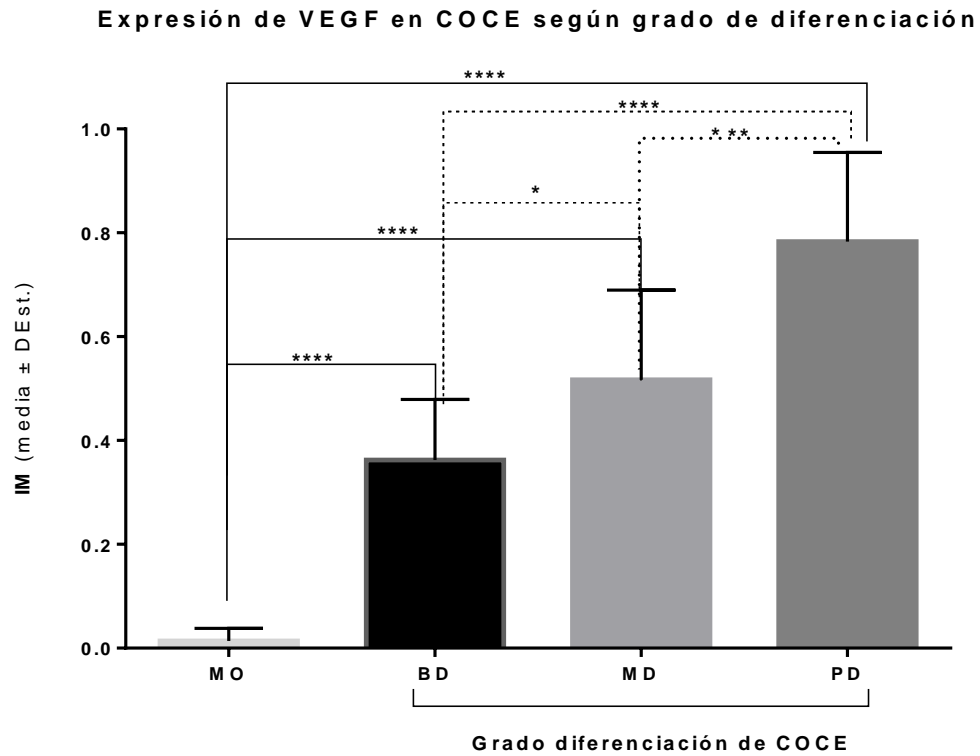
Tabla 4. Prueba de D'Agostino-Pearson. Distribución de datos en muestras de COCE y Mucosa oral para COX-2 y VEGF.

IV. Inmunoexpresión de VEGF en COCE según grado de diferenciación y en mucosa oral normal

Los porcentajes de medias de IM citoplasmática para VEGF según grado de diferenciación fueron en COCE BD 36,26% ($\pm 0,12SD$), en COCE MD 51,71% ($\pm 0,17SD$) y en COCE PD 78,29% ($\pm 0,17SD$). En mucosa oral normal se encontró una media de IM citoplasmática de 1,37% ($\pm 0,02SD$) (Figura. 12). (Anexo 2).

El análisis de distribución de datos arrojó distribución normal para los grupos COCE BD, COCE MD y COCE PD y distribución no normal para el grupo MO. Al analizar la expresión de la proteína entre mucosa normal y los 3 grupos de carcinoma oral, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre MO y COCE BD ($p < 0,0001$), MO y COCE MD ($p < 0,0001$) y entre MO y COCE PD ($p < 0,0001$). Asimismo, dentro de los 3 grupos de COCE, existe diferencia significativa entre BD y MD ($p < 0,05$) entre BD y PD ($p < 0,0001$) y entre MD y PD ($p < 0,001$). (Gráfico 2).

Gráfico 2.



Media de Índice de Marcación (IM) para VEGF en COCE según grado de diferenciación bien diferenciado (BD), medianamente diferenciado (MD) y pobremamente diferenciado (PD) y mucosa oral normal (MO) ± desviación estándar (DEst.). (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Figura 12.

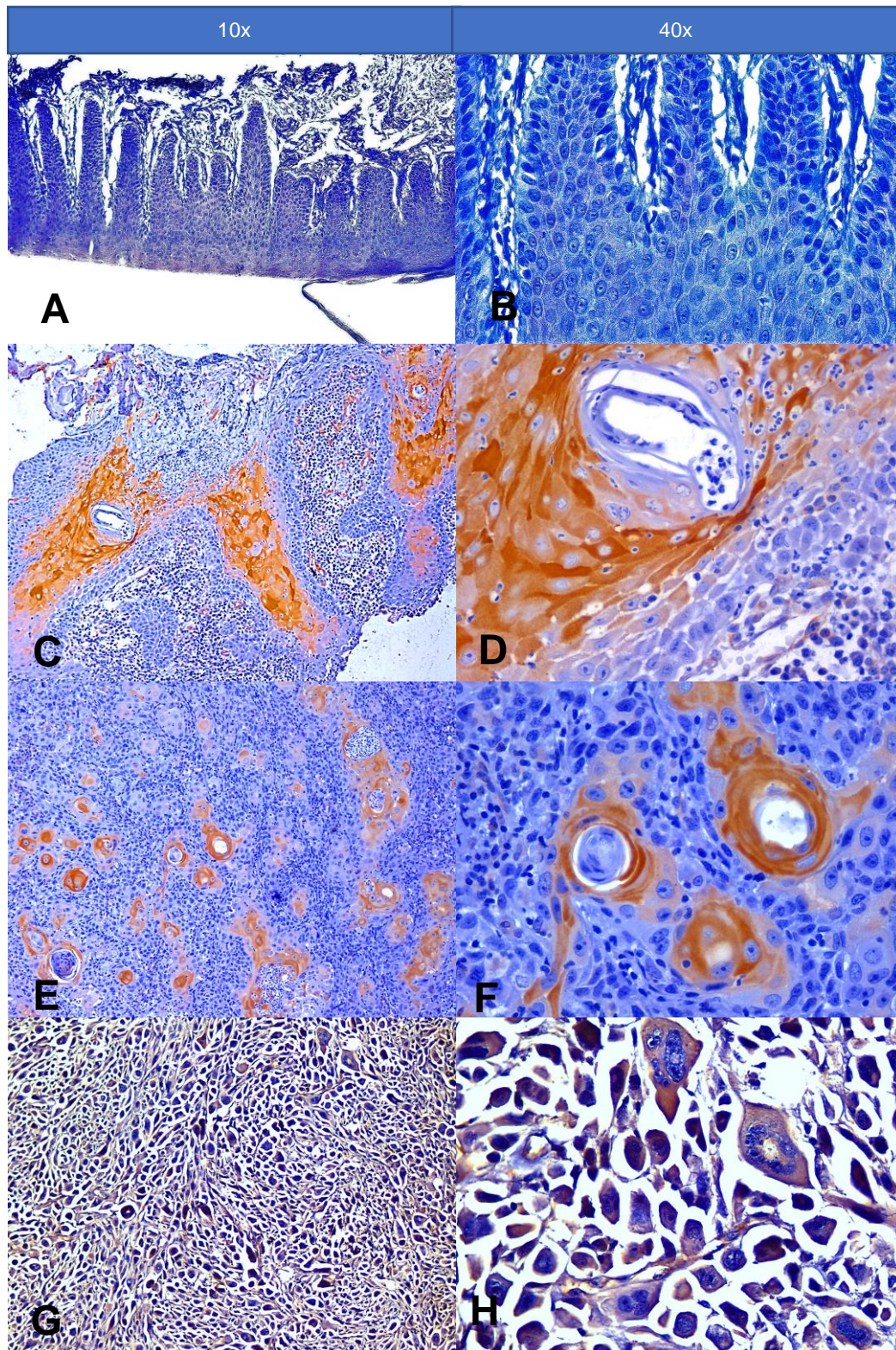


Figura 12. Microfotografías de mucosa bucal normal (A, B) y tejidos orales con diagnóstico de COCE (C-H) y con técnica inmunohistoquímica para VEGF a un aumento de 10x y 40x.

COCE BD (C y D), COCE MD (E y F) y COCE PD (G y H).

V. Correlación de expresión para COX-2 y VEGF, según grado de diferenciación histológica

En COCE BD no se encontró correlación en la expresión de ambas proteínas ($p=0.776$).

En COCE MD y PD se encontró correlación positiva en la expresión de ambas proteínas con un coeficiente de correlación de 0,65 ($p=0.017$) y coeficiente de correlación= 0,804 ($p=0,003$), respectivamente (Gráfico 3 y 4).

Gráfico 3

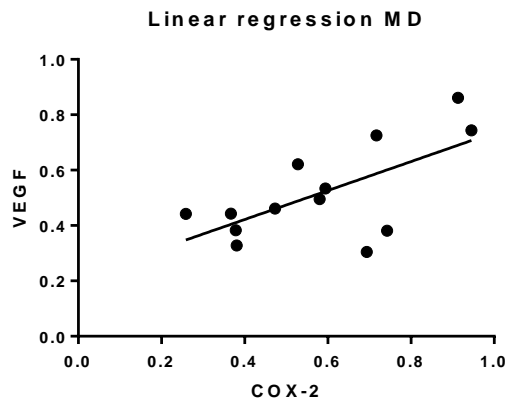


Gráfico 4

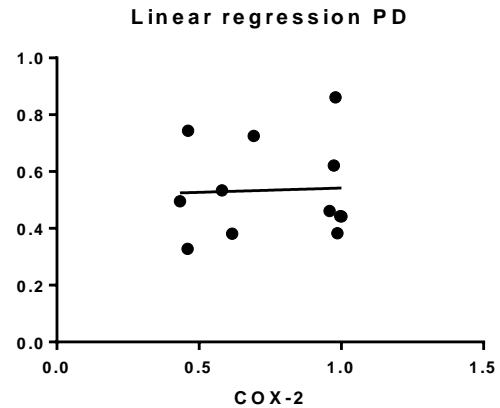


Gráfico 3 y 4. Regresión lineal de medias para expresión de proteínas COX-2 y VEGF en COCE MD y PD respectivamente.

9.- DISCUSIÓN

El COCE es la neoplasia maligna más frecuente en la cavidad oral, siendo el sexto tipo de cáncer más prevalente en el mundo (Jemal y cols., 2010), representando entre el 80% al 90% de las neoplasias malignas orales (Pires y cols., 2013). En relación con los datos demográficos, diversos estudios han descrito una mayor prevalencia de COCE en hombres, entre un 55% al 65% (Dirven y cols., 2017; Mascitti y cols., 2018; Taziki y cols., 2018; Pollaers y cols., 2018), con un promedio de edad entre 63 a 66 años (Rivera y cols., 2008; Dirven y cols., 2017; Pollaers y cols., 2018; Mascitti y cols., 2018). Estos datos son similares a los obtenidos en este estudio, en el cual la mayor frecuencia de los pacientes con COCE fueron hombres (71,3%), con un promedio de edad de 64 años. La localización anatómica más frecuente descrita en la literatura es lengua (20% - 50 % del total de casos) (Seki y cols., 2011; Dirven y cols., 2017; Moeckelmann y cols., 2018; Pollaers y cols., 2018), localización similar a la observada en este estudio, con un 30,8% del total de las muestras. Sin embargo, estos datos pueden variar entre distintos países y áreas geográficas, debido a diferencias en la exposición a factores externos de riesgo, tales como: hábitos tabáquicos, consumo de bebidas alcohólicas, nuez de areca, palma del betel, etc (Effiom y cols., 2008; De la fuente y cols., 2016; Moeckelmann y cols., 2018).

La identificación y el desarrollo de marcadores biológicos en COCE en las últimas décadas ha sido exponencial, junto con la tipificación de factores pronósticos con el objetivo de predecir el comportamiento y evolución clínica para estas lesiones. Ciertamente, el conocimiento de los distintos mecanismos biológicos que participan en la carcinogénesis, como proliferación y crecimiento celular y capacidad de invasión del tumor pueden aportar como métodos diagnósticos complementarios y de base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Un marcador biológico se define como una molécula, una sustancia o un proceso que se altera cualitativa o cuantitativamente como resultado de una condición precancerosa o un cáncer (Campuzano, 2010). Los marcadores biológicos pueden ser utilizados como objetivos terapéuticos para prevenir el crecimiento y

propagación del cáncer (Byatnal y cols., 2015). Dentro de los marcadores biológicos descritos en COCE asociados a carcinogénesis (iniciación y promoción) y a diferenciación de células tumorales se describen: reguladores del ciclo celular como ciclina D1, KI67, p21 (Tsubochi y cols., 2006); moléculas implicadas en la apoptosis como la familia Bcl-2 (Monteiro y cols., 2018), TNF α , p53; factores de crecimiento como EGF, TGF α , β (Tsubochi y cols., 2006) y mediadores inflamatorios como COX-2 (Byatnal y cols., 2015), entre otros. Por otro lado, también se describen marcadores biológicos para progresión y crecimiento tumoral como proteínas de degradación de la matriz extracelular, moléculas de adhesión como E-cadherina, factores angiogénicos como VEGF y citoquinas osteolíticas (Kumamoto, 2010).

Dentro de los procesos que modulan la iniciación, promoción y crecimiento tumoral, se describe a la inflamación crónica como un factor relevante en el desarrollo de carcinomas epiteliales (Moazeni-Roodi y cols., 2016). Diversos estudios han demostrado el rol de la proteína COX-2 como un marcador biológico en carcinogénesis de COCE (Byatnal y cols., 2015). Su regulación se asociaría a inflamación crónica, daño tisular y tumorigénesis, roles demostrados inicialmente en modelos animales con poliposis familiar adenomatosa (Zweifel y cols., 2002). Así mismo, también se ha descrito su presencia en diversas neoplasias malignas epiteliales (Eberhart y cols., 1994; Ristimaki y cols., 1997; Wolff y cols., 1998; Kirschenbaum y cols., 2000; Kömhoff y cols., 2000; Leung y cols., 2001; Davies y cols., 2003; Kase y cols., 2003).

El papel crucial de la proteína VEGF en la angiogénesis tumoral ha sido especialmente estudiado en las últimas décadas. VEGF se expresa en la mayoría de las neoplasias malignas y el aumento de su expresión se correlaciona con la progresión del tumor (Fukumura y cols., 1998). Asimismo, se ha descrito su rol asociado a neoangiogenesis y linfangiogenesis, dos procesos indispensables para la diseminación, invasión y metástasis (Costashe y cols., 2015). Entre los usos descritos a este marcador biológico se ha indicado para monitorear la propagación de células tumorales a la médula ósea (Wimberger y cols., 2013).

Los resultados de este estudio demostraron diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de COX-2 en COCE BD, COCE MD y COCE PD respecto con su expresión en mucosa oral (MO v/s COCE BD: $p < 0,001$; MO v/s COCE MD: $p < 0,0001$; MO v/s COCE PD: $p < 0,0001$). Estos resultados son semejantes a los descritos por Segawa y cols., y Mauro y cols., los cuales reportan una inmunexpresión ausente expresión para COX-2 (0 %) en muestras de mucosa oral, corroborando el rol de esta proteína en procesos patológicos como mitógeno (Segawa y cols, 2008; Mauro y cols., 2010). Del mismo modo, Seyedmajidi y cols. Y Moazeni-Roodi y cols. demostraron una alta expresión de la proteína COX-2 en COCE respecto a mucosa oral ($p < 0,001$ y $p < 0.0001$ respectivamente). Por lo tanto, el aumento en la expresión de COX-2 en COCEs estaría precedido por la exposición de los tejidos a inflamación crónica relacionadas a la expresión inducible de COX-2 en queratinocitos del epitelio de la mucosa oral (Morita y cols., 2014; Seyedmajidi y cols., 2014; Moazeni-Roodi y cols., 2016).

El grado de diferenciación celular se ha considerado como un factor pronóstico para COCE, relacionado con la agresividad y potencial de generar metástasis (Padma y cols., 2017), a pesar de que, la capacidad pronóstica y las características clínico-patológicas de los diferentes grados aún no están completamente dilucidadas (Xu y cols., 2018). En el estudio de Xu y cols (2018), en el cual se evaluó el valor pronostico del grado histológico del tumor en pacientes con COCE, se concluyó que en etapas tempranas de COCE, el grado histológico es un factor de riesgo independiente para el pronóstico. Tumores bien diferenciados presentaron un mejor pronostico que moderada o poco diferenciado. Sin embargo, en etapas posteriores, el pronóstico depende principalmente de factores biológicos intrínsecos del tumor, como el grado de invasión (profundidad) y la presencia de diseminación extracapsular y perineural (Xu y cols., 2018).

A pesar de varios avances en el diagnóstico y tratamiento para COCE, la tasa de supervivencia de los pacientes no ha mejorado en las últimas 3 décadas y solamente entre un 40 y 50% de los pacientes sobreviven a los 5 años (Jemal y

cols., 2010). Estos resultados se han asociado a distintos parámetros histológicos como grado de diferenciación celular, queratinización, patrón de invasión, permeabilidad vascular y/o perineural (Taghavi y cols., 2015; Monteiro y cols., 2018), sin embargo, su pronóstico en la actualidad está asociado principalmente a las características clínicas: tamaño de la lesión, compromiso ganglionar locoregional y presencia de metástasis (clasificación TMN) (Neville y cols., 2009; Monteiro y cols., 2018).

En este estudio se determinó y analizó la inmunoexpresión de la proteína COX-2 según distintos grados de diferenciación para COCE. Las muestras de grado histológico poco diferenciado presentaron diferencia estadísticamente significativa en relación con las muestras de COCE de grado bien diferenciado ($p < 0.05$). Estos resultados son similares a los observados por Moazeni-Roodi y cols. quienes estudiaron la expresión de la proteína COX-2 según grado de diferenciación histológica para COCE, y describen una alta expresión en COCE poco y moderadamente diferenciados versus COCE bien diferenciados ($p = 0.0003$). En un estudio de Cui y cols. (Cui y cols., 2015) se analizó la expresión de COX-2 en carcinoma de células escamosas en esófago, en el cual reportan que una alta expresión de COX-2 se correlacionó significativamente con el grado de diferenciación poco diferenciado ($p = 0.000,1$) y en COCE con metástasis ($p = 0.002$). Sin embargo, Pandey (Pandey y cols., 2008), Seyedmajidi (Seyedmajidi y cols., 2014), Sappayatosok (Sappayatosok y cols., 2009) y Lee (Lee y cols., 2015) no encontraron diferencias significativas entre los distintos grados histológicos de COCE para la proteína COX-2 ($p = 0.338$ y $p = 0.147$ respectivamente). Estas evidencias podrían sugerir que el rol tumorigénico de la proteína COX-2 estaría asociado a las etapas tempranas de la carcinogénesis, siendo una molécula que actúa como promotor tumoral y no necesariamente una alta expresión es requerida durante el desarrollo de todo el proceso carcinogénico (Shibata y cols., 2005; Tsubochi y cols., 2006; Morita y cols., 2014; Akbarzadeh y cols., 2017). En este sentido, otros estudios también sugieren un papel importante de COX-2 en lesiones potencialmente malignas como leucoplasias (Grau de castro 2005) y en alteraciones de la arquitectura y celularidad de los epitelios orales (Pontes y cols.,

2013). Nagatsuka y cols, estudiaron la expresión de COX-2 durante la progresión histomorfológica de displasia epitelial a COCE, en el cual observaron un aumento progresivo de su expresión a medida que se desarrollaba el proceso carcinogénico, lo que sugiere un papel activo de COX-2 en las etapas tempranas promotoras de la carcinogénesis, (Nagatsuka y cols., 2012). No obstante, Shibata y cols al., al evaluar la expresión de COX-2 detectaron que ésta fue más alta en lesiones con displasia epitelial oral comparado con COCEs, hallazgo similar ha sido previamente descrito para otros cánceres humanos (Shibata y cols., 2005). Estudios similares describen que el aumento de la proteína COX-2 en desordenes orales potencialmente malignos se presenta previo a la expresión de marcadores biológicos relacionados a apoptosis y angiogénesis, confirmando su rol biológico como molécula reguladora y promotora en las etapas iniciales del cáncer (Li y Cui, 2013).

En relación con el análisis de VEGF, se observó diferencia estadísticamente significativa en la inmunexpresión de esta proteína entre mucosa oral normal y COCE para sus distintos grados histológicos (MO v/s COCE BD $p < 0,0001$, MO v/s COCE MD $p < 0,0001$; MO y COCE PD $p < 0,0001$), lo cual sugiere que la expresión de la proteína VEGF es un regulador fundamental en el proceso angiogénico tumoral (Sappayatosok y cols., 2009). VEGF es responsable del aumento de la permeabilidad vascular, promover proliferación celular y migración de células endoteliales (Gallo y cols., 2001) y de la producción de moléculas vasoactivas u quimiotaxis de mastocitos, los cuales regulan la angiogénesis en el crecimiento tumoral (Akbarzadeh y cols., 2017). Los resultados de este estudio en relación con la inmunexpresión de VEGF según grado histológicos en COCE, demostraron diferencia estadística significativa entre PD y MD ($p < 0,001$), entre PD y BD ($p < 0,0001$) y entre MD y BD ($p < 0,05$). Estos resultados son similares a estudios previos que indican que VEGF se correlaciona con el grado de diferenciación histológica y la estadificación clínica del tumor (Sappayatosok y cols., 2009; Kim y cols, 2015). De estos datos, se sugiere que una alta expresión de la proteína VEGF se asociaría con angiogenesis neoplásica, crecimiento

tumoral y producción de metástasis, participando de manera activa en el mantenimiento tumoral.

Diferentes estudios han sugerido una relación entre la expresión de la proteína COX-2 y el aumento de los factores de crecimiento pro-angiogénicos, en particular VEGF. VEGF se correlaciona con altos niveles de COX-2 en carcinomas de: esófago, colon, estómago y pulmón (Toomey y cols., 2009). En este estudio se detectó correlación positiva para el aumento de la expresión de ambas proteínas en COCE: poco ($p=0,003$) y moderadamente diferenciados ($p=0.017$), lo que sugiere que el aumento de la expresión citoplasmática de la proteína COX-2 implicaría concomitantemente un aumento en la expresión de la proteína VEGF, esto eventos sugieren que el control de la angiogénesis tumoral en COCE esta mediada por inflamación crónica inducida por COX-2. El crecimiento y progresión de la masa tumoral debe estar precedido por un aumento en el suministro vascular para entregar nutrientes y oxígeno al tumor, colaborando en la invasión y diseminación metastásica. (Macedo y cols., 2017). Estos hallazgos son similares a los descrito en otros estudios, en los cuales se detectó correlación positiva en el aumento de las proteínas COX-2 y VEGF en neoplasias malignas. (Gallo y cols., 2001; Sappayatosok y cols., 2009; Wang y cols., 2011; Morita y cols., 2012; Kono y cols., 2013; Morita y cols., 2014; Akbarzadeh y cols., 2017). Asimismo, Gallo y cols. reportan el papel crítico de la COX-2 en la angiogénesis para cáncer de cabeza y cuello mediante la regulación en la expresión de VEGF (Gallo y cols., 2001), así como también en la posible inducción de la expresión de VEGF por parte de PGE1 y PGE2 en sistemas celulares no neoplásicos (Williams). Estos eventos sugieren un papel de la COX-2 en la regulación de la producción de VEGF (Gallo y cols., 2001). El aumento de la expresión de COX-2, y por lo tanto de la síntesis de PGE-2 aumentaría los niveles de VEGF (Rakech y cols., 2016), por lo que COX-2 podría ser objetivo de terapia para inhibir y/o suprimir la diseminación metastásica a nódulos linfáticos en sus primeras etapas. (Morita y cols., 2014)

En otros estudios (Akbarzadeh y cols., 2017) analizaron la expresión de VEGF, COX-2 y el aumento en la densidad de mastocitos (MCD) en COCE, concluyendo que la correlación significativa en la expresión de VEGF respecto a la expresión de COX-2 y MCD representarían roles biológicos activos de la proteína COX-2 y de mastocitos en la angiogénesis tumoral, modulando la producción de VEGF. A pesar de esto, la expresión de VEGF COX-2 y MCD no necesariamente podría ser indicadores en el pronóstico en COCEs. Del mismo modo, Seki y cols., examinaron factores asociados al pronóstico en COCE y concluyeron que la expresión de COX-2 no podía predecir el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, la expresión fuertemente positiva de VEGF-A o VEGF-C podría reforzar el diagnóstico histopatológico de invasión vascular y mejorar la precisión y la eficacia de la predicción pronóstica de COCE (Seki y cols., 2011). Por otro lado, Tsujii y cols. analizaron la relación de COX-2 y angiogénesis en las células de cáncer de colon, en el cual la regulación disminuida de la expresión de COX-2 por el uso de inhibidores de la COX-2 se asoció con un evidente efecto antitumoral y anti angiogénico (Tsujii y cols., 1997).

Estudios previos en murinos (Morita y cols., 2012) relacionaron la expresión de VEGF-C (un miembro de la familia de VEGF asociado a linfoangiogenesis) y COX-2, con metástasis y linfoangiogenesis, en los cuales se demuestra que la proteína VEGF-C inducida por COX-2 se asociaría a metástasis a nódulos linfáticos, del mismo modo, la inhibición en la producción de COX-2 generaría una disminución significativa en metástasis y linfoangiogenesis. Estos mismos autores (Morita y cols., 2014) evaluaron los mismos parámetros en COCEs humano de lengua, encontrando resultados similares. Trabajos similares han correlacionado la inmunoexpresión de COX-2 y VEGF-C con metástasis a nódulos linfáticos en tumores colorrectales (Soumaoro y cols., 2006; Von Rahden y cols., 2006), gástricos (Liu y cols., 2005), pulmonares (Niki y cols., 2000), mama (Zhang y cols., 2008 y próstata (Di y cols., 2009). La correlación significativa de COX-2, angiogénesis y linfoangiogenesis (VEGF-C), se asociaría a un peor pronóstico clínico y una menor tasa de supervivencia, incluso en pacientes sin invasión en las primeras etapas de la carcinogénesis. (Wang y cols., 2011; Kono y cols, 2013;

Morita y cols., 2012; Morita y cols., 2014). Además, la correlación en el aumento de la expresión de estas proteínas se asocia a una baja tasa de sobrevida en pacientes con COCE (Kono y cols., 2013; Morita y cols., 2014).

La expresión de la proteína COX-2 ha sido validada como un factor pronóstico independiente para la supervivencia específica en adenocarcinomas esofágicos, carcinoma colorrectal metastásico y cáncer de pulmón (Prins y cols., 2012). Li y cols., han sugerido COX-2 tendría valor clínico en la evaluación del pronóstico para COCE (Li y cols., 2008). Sin embargo, existen opiniones ambiguas con respecto al uso de COX-2 como factor pronóstico independiente para COCE. (Seki y cols., 2011; Kono y cols., 2013; Akbarzadeh y cols., 2017).

Un metaanálisis realizado por Zhao y cols. que valoro la sobreexpresión de VEGF en carcinomas orales y evidencio que la alta expresión de VEGF está asociado a una menor sobrevida en pacientes con COCE y, por lo tanto, a un peor pronóstico (Zhao y cols., 2013). Estudios similares han descrito que VEGF puede ser utilizado como biomarcador pronóstico confiable en COCEs (Seki y cols., 2011; Aggarwal y cols., 2014). Morita y cols., indican que una expresión combinada de VEGF y COX-2 puede predecir la mortalidad por metástasis a nódulos linfáticos (Morita y cols., 2014). Los datos anteriores confirman el desempeño de un papel clave y la estrecha relación estas proteínas en el crecimiento, la invasión tumoral y metástasis (Wang y cols., 2011; Rakech y cols., 2016; Akbarzadeh y cols., 2017).

APLICABILIDAD y USO TERAPEUTICO

Basados en las evidencias que la proteína COX-2 representaría un rol relevante en la carcinogénesis y en la progresión tumoral mediada por la inflamación crónica, las terapias no invasivas, como el uso de inhibidores de COX-2, deberían ser consideradas como estrategia quimiopreventiva para reducir la mortalidad por cáncer en tejidos tumorales que manifiestamente expresen un aumento en la expresión de esta proteína (Grau de castro, 2005; Byatnal y cols., 2015). Asi

mismo, dado que VEGF está relacionada íntimamente con la progresión tumoral, también puede ser un objetivo potencial para el desarrollo de estrategias quimiopreventivas y quimioterapéuticas (Aggarwal y cols., 2014). La ciclooxigenasa es blanco de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, y se ha demostrado que la utilización de ellos reduce el riesgo de cánceres colorrectales, pulmonares y mama. En modelos animales experimentales, se demostró que los inhibidores COX-2 suprimen la formación, crecimiento y metástasis de tumores, y, además, mejoran la actividad citotóxica de agentes anticancerosos y radiación (Tsubochi y cols., 2006; Rakech y cols., 2016). Los inhibidores de la COX podrían tener efectos antiangiogénicos y antitumorales en cánceres ubicados en otras regiones anatómicas, como los del tracto aéreo superior, tracto digestivo, lo que sugiere nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento y prevención del cáncer en humanos (Gallo y cols., 2001).

En la actualidad, hay evidencia sostenible que los inhibidores de la COX-2 podrían desempeñar un papel en la prevención de carcinomas. La participación de COX-2 en la progresión del cáncer se ha visto reforzada por el efecto de los inhibidores de COX-2 que se han utilizado con éxito en el tratamiento de cáncer de mama (Chen y Holmes 2017), y colorrectal (Kohene y Dubois, 2004; Huang y cols, 2017). La eficacia de los inhibidores selectivos y no selectivos de COX-2 frente a la carcinogénesis oral ha sido confirmada por estudios in vitro e in vivo en murinos (Silva y cols., 2017). Los inhibidores de COX-2 mostraron ser quimiopreventivos, disminuyendo el crecimiento celular, proliferación de tumores xenoinjertos, invasión y la mortalidad relacionada con cáncer (Punse y cols., 2017).

En cuanto a los mecanismos de acción anti carcinogénica de los inhibidores de la COX-2, se ha estudiado el efecto anti proliferativo y pro apoptótico, inhibición de la angiogénesis, efecto anti metastásico, inhibición de macrófagos y efecto inmunomodulador (Grau de castro, 2005). Resulta de gran interés que las prostaglandinas derivadas de la COX-2 son capaces de inducir la síntesis y secreción de VEGF por parte de fibroblastos y macrófagos, y a su vez, el VEGF tiene la capacidad de inducir la expresión de COX-2 en las células endoteliales

humanas, con lo que constituyen una gran vía señalización molecular de importancia para la angiogénesis. Aún más importante para la quimioprevención es el hecho de que la neoangiogenesis tumoral anómala se inicia en las etapas preneoplásicas (Grau de castro, 2005). La inhibición de la COX-2 puede aumentar la eficacia de los tratamientos anti-angiogénicos lo cual abre camino para investigaciones clínicas de bloqueo concomitante de la señalización de COX-2 y VEGF (Ben-Batalla y cols., 2015).

El aumento de la expresión de COX-2 durante la carcinogénesis oral puede depender de la etapa de desarrollo del tumor, así como de factores etiológicos. Por lo tanto, hay una amplia variación en las vías y los factores que conducen o afectan la carcinogénesis oral. Además, se requieren estudios adicionales para determinar cuál de estos mecanismos es más importante en el desarrollo y la progresión de COCE (Seyedmajidi y cols., 2014).

La existencia de factores pronósticos es de suma importancia para proporcionar información más precisa, identificar la agresividad de la neoplasia y determinar la terapia molecular dirigida complementaria más adecuada (Hwa y cols., 2015). Se requieren más estudios para evidenciar el uso de COX-2 y VEGF como factor pronóstico en COCE, y así utilizarlo como herramienta a la hora del diagnóstico y pronóstico en la planificación de la terapia multidisciplinaria. (Lee y cols., 2015).

10.- CONCLUSIONES

Se midió una alta expresión de la proteína COX-2 en COCE en todos sus grados de diferenciación en comparación con muestras de mucosa oral.

Asimismo, se presenta una alta expresión de la proteína VEGF en COCE en todos sus grados de diferenciación en comparación con muestras de mucosa oral.

Por otro lado, se observa una correlación positiva en la expresión de las proteínas COX-2 y VEGF en COCE en los grados moderado y poco diferenciado, lo que evidencia el efecto de COX-2 sobre la expresión de VEGF.

El aumento de la expresión de la proteína COX-2 podría ser considerado como un marcador biológico para COCE y a los anticuerpos primarios anti-COX-2 y anti VEGF como marcadores pronósticos en el crecimiento, progresión y diseminación tumoral.

Por lo tanto, el uso de inhibidores de COX-2 podría ser utilizado como apoyo al tratamiento quirúrgico de COCE por sus efectos antiproliferativos, proapoptóticos e inhibidor de la angiogénesis, ayudando a disminuir la metástasis y mejorando el pronóstico y la tasa de supervivencia de los pacientes.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aggarwal, S., Devaraja, K., Sharma, S. y Das, S. (2014). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Clinical Chimica Acta*, 436, 35-40. doi: 10.1016/j.cca.2014.04.027.

Akbarzadeh, A., Taghavi, N., Shahla, M. (2017). Combined Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor Expression with Cyclooxygenase-2 and Mast Cell Density in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathobiology*, 84 (2), 80-86. doi: 10.1159/00044777.

Bandyopadhyay, R., Chatterjee, U., Mondal, S. K., Nag, D., & Sinha, S. K. (2011). A study on expression pattern of cyclooxygenase-2 in carcinoma of cervix. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 54(4), 695-699. doi: 10.4103/0377-4929.91495.

Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., & Sidransky, D. (2005). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and genetics of head and neck tumors, Lyon, France, IARC.

Basnaker, M., Sr, S., & Bnvs, S. (2014). Expression of Endoglin (CD-105) y Microvessel Density in Oral Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical & Diagnostic Research*, 8(9), ZC91-94. doi: 10.7860/JCDR/2014/9429.4904.

Ben-Batalla, I., Cubas-Cordova, M., Udonta, F., Wroblewski, M., Waizenegger, J. S., Janning, M., Sawall, y cols. (2015). Cyclooxygenase-2 blockade can improve efficacy of VEGF-targeting drugs. *Oncotarget*, 6(8), 6341-58.

Blatt S., Kruger M., Ziebart, T., Sagheb, K., Schiegnitz, E., Goetze, E., Pabst, A. M. (2017). Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma:

A review of the literature. *Journal of Cranio-maxillo-facial Surgery*, 45(5), 722-730. doi: 10.1016/j.jcms.2017.01.033.

Byatnal, A. A., Byatnal, A., Sen, S., Guddattu, V., y Solomon, M. C. (2015). Cyclooxygenase-2--An Imperative Prognostic Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma--An Immunohistochemical Study. *Pathology and Oncology Research*, 21(4), 1123-1131. doi: 10.1007/s12253-015-9940-9.

Campuzano-Maya, G. (2010). Utilidad clínica de los marcadores tumorales. *Medicina & Laboratorio*, 16, 411-445.

Chan, G., Boyle, J. O., Yang, E. K., Zhang, F., Sacks, P. G., Shah, J. P., Woerner, B. M. (1999). Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Research*, 59(5), 991-994.

Clark, P., Marker, P., Bastian, H.L., Krogdahl, A. (2006) Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression. *Journal Oral Pathology and Medicine*, 35(9), 568-72.

Chen, W. Y. y Holmes, M.D. (2017). Role of Aspirin in Breast Cancer Survival. *Current Oncology Reports*, 19 (7), 48. doi: 10.1007/s11912-017-0605-6.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*, 30(7), 1073-1081. doi: 10.1093/carcin/bgp127.

Costache, M.I., Ioana, M., Iordache, S., Ene, D., Costache, C., Săftoiu, A. (2015). VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature. *Romanian Journal of Internal Medicine*.53(3),199-208.

Davies, G., Salter, J., Hills, M., Martin, L-A., Sacks, N., Dowsett, M. (2003) Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human

breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 9 (7), 2651–6.

De La Fuente Ávila, Matteo, Díaz Jara, Mauricio, & Martínez Rondanelli, Benjamín. (2016). Carcinoma espinocelular de lengua: estudio de sobrevida a 5 años. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 9(1), 74-78.

Delgadillo Villarroel, J. E., & Ticona Velasco, A. D. (2014). ONCOGENES. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 43, 229.

Di, JM., Zhou, J., Zhou, XL.,(2009). Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-C and lymph node metastases in human prostate cancer. *Archives of Medical Research*, 40, 268-275.

Díaz Prado, S., Gallego Guadalupe, A., López-Cedrún, J. L., Ferreras Granado, J., & Antón Aparicio, L. (2009). La ciclooxigenasa-2 (COX-2) y el factor de crecimiento epidérmico (EFG) en lesiones epiteliales orales premalignas. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 31, 170-181.

Dirven, R., Ebrahimi, A., Moeckelmann, N., Palme, C., Gupta, R., Clark, J. (2017). Tumor thickness versus depth of invasion - Analysis of the 8th edition American Joint Committee on Cancer Staging for oral cancer. *Oral Oncology*, 74, 30-33. doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.09.007.

Duffy, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., & Harmey, J. H. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in non-endothelial cells: Autocrine signalling by VEGF. *VEGF and Cancer*, 133-144.

Eberhart, C., Coffey, R., Radhika, A., Giardiello, F., Ferrenbach, S., DuBois, R. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase- 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, 107(4), 1183–8.

Effiom, O.A., Adeyemo, W.L., Omitola, O.G., Ajayi, O.F., Emmanuel, M.M., Gbotolorun, O.M. (2008). Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66 (8), 1595-9. doi: 10.1016/j.joms.2007.12.025.

El-Naggar, A. K., Chan, J. K. C., Glandis, J. R., Takata, T., Slotweg, P. J. (2017). *World Health Organization Classification of Tumours* Lyon, France, IARC.

Feller, L., Altini, M., & Lemmer, J. (2013). Inflammation in the context of oral cancer. *Oral Oncology*, 49(9), 887-892. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.07.003.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, 359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.

Folkman J. (2006). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, 57, 1-18. doi: 10.1146 / annurev.med.57.121304.131306.

Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E-C., Lu, N. y cols. (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell*, 94, 715-725.

Gallo, O., Franchi, A., Magnelli, L., Sardi, I., Vannacci, A., Boddi, V., y cols. (2001). Cyclooxygenase-2 Pathway Correlates with VEGF Expression in Head and Neck Cancer. Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 3(1), 53-61.

García García, V., González-Moles, M., & Bascones Martínez, A. (2005). Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. *Avances en Odontoestomatología*, 21, 287-295.

Grau de Castro, J.J. (2005). Inhibidores de la ciclooxygenasa-2 en la prevención

del cáncer. *Revista Clínica Española*, 205 (9), 446-456. doi: 10.1157/13079075.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.

Hillen, F., y Griffioen, A. W. (2007). Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(3-4), 489–502. doi:10.1007/s10555-007-9094-7.

Huang, W-W., Hsieh, K-P., Huang, R-Y., Yang, Y-H. (2017). Role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the survival outcome of colorectal cancer patients: A population-based cohort study. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 33 (6), 308-314. doi: 10.1016/j.kjms.2017.03.004.

Hussain, S. P., & Haclarris, C. C. (2007). Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *International Journal of Cancer*, 121(11), 2373-2380. doi: 10.1002/ijc.23173.

Hwa, JS., Kwon, OJ., Park, JJ., Woo, SH., Kim, JP., Ko, GH., y cols. (2015). The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 272 (10), 2953–2959.

Jané Salas, E., Chimenos Küstner, E., López López, J., & Roselló Llabrés, X. (2003). Importancia de la dieta en la prevención del cáncer oral. *Medicina Oral*, 8 (4), 260-268.

Itoh, S., Matsui, K., Furuta, I., Takano, Y. (2003) . Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. *Oral Oncology*, 39 (8) 829–35. doi: 10.1016/S1368-8375(03)00105-2

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., & Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. A

Cancer Journal for Clinicians, 60(5), 277.

Johnson, N. W., Jayasekara, P., & Amarasinghe, A. (2011). Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontology 2000*, 57(1), 19-37.

Kase, S., Osaki, M., Honjo, S., Adachi, H., Tsujitani, S., Kaibara, N. y cols. (2003). Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Archive*, 442: 129-135. doi: 10.1007/s00428-002-0706-x.

Khalili, J. (2008). Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. *Experimental Oncology*, 30(4), 259-264.

Kim, S. K., Park, S. G., & Kim, K. W. (2015). Expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 41(1), 11-8.

Kirschenbaum, A., Klausner, A., Lee, R., Unger, P., Yao, S., Liu, XH., y cols. (2000) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology*, 56 (4), 671–6.

Koehne, C.H. y Dubois, R.N. (2004). COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Seminars in oncology*, 31, 12-21.

Kömhoff, M., Guan, Y., Shappell, H. W., Davis, L., Jack, G., Shyr, Y., y cols. (2000). Enhanced Expression of Cyclooxygenase-2 in High Grade Human Transitional Cell Bladder Carcinomas. *The American Journal of Pathology*, 157(1), 29–35.

Kono, M., Watanabe, M., Abukawa, H., Hasegawa, O., Satomi, T., Chikazu, D.

(2013). Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 71(10),1694-702. doi: 10.1016/j.joms.2013.04.015.

Kumamoto, H. (2006) Molecular pathology of odontogenic tumors. *Journal of oral pathology & medicine*, 35 (2), 65-74. doi: 10.1111 / j.1600-0714.2006.00380.x.

Lee, E.-Y., Kang, J.-Y., & Kim, K.-W. (2015). Expression of cyclooxygenase-2, peroxiredoxin I, peroxiredoxin 6 and nuclear factor-κB in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, 10 (5), 3129–3136. doi:10.3892/ol.2015.3705.

Leung, W. K., To, K.-F., Ng, Y.-P., Lee, T.-L., Lau, J. Y. W., Chan, F. K. L., y cols. (2001). Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and missense *p53* mutations in gastric cancer. *British Journal of Cancer*, 84(3), 335–339. doi: 10.1054/bjoc.2000.1607.

Li, W. Z., Ding, Y. Q., Li, Z. G., Zhang, J. H. (2008) Expression of COX-2 and VEGF-C in squamous cell carcinoma of the tongue and its correlation to lymph node metastasis. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 28 (2), 180–183.

Li, T.-J., & Cui, J. (2013). COX-2, MMP-7 expression in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6 (8), 640-643. doi: 10.1016 / S1995-7645 (13) 60110-8.

Liu, C. H., Chang, S.-H., Narko, K., Trifan, O. C., Wu, M.-T., Smith, E., y cols. (2001). Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 18563-18569.

Liu, J., Yu, H. G., Yu, J.P., Wang, X.L., Zhou, X.D., Luo, H.S. (2005). Overexpression of cyclooxygenase-2 in gastric cancer correlates with the high abundance of vascular endothelial growth factor-C and lymphatic metastasis. *Medical Oncology*, 22, 389-397.

Macedo, F., Ladeira, K., Longatto-Filho, A., & Martins, S. F. (2017). Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission?. *Journal of gastric cancer*, 17(1), 1-10.

Malik, U. U., Zarina, S., & Pennington, S. R. (2016). Oral squamous cell carcinoma: Key clinical questions, biomarker discovery, and the role of proteomics. *Archives of Oral Biology*, 63, 53-65. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.11.017.

Mauro, A., Lipari, L., Leone, A., Tortorici, S., Burrzano, F., Provenzano, S. y cols. (2010). Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in normal and pathological human oral mucosa. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 48 (4), 555–563.

Mendes, R. A., Carvalho, J. F., & Waal, I. (2009). An overview on the expression of cyclooxygenase-2 in tumors of the head and neck. *Oral Oncology*, 45(10), e124-128. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.03.016.

Meza García, G., Muñoz Ibarra, J., Páez Valencia, C., Cruz Legorreta, B., & Aldape Barrios, B. (2009). Carcinoma de células escamosas de cavidad bucal en un centro de tercer nivel de atención social en la ciudad de México: Experiencia de cinco años. *Avances en Odontoestomatología*, 25(1), 19-28.

Mascitti, M., Rubini, C., De Michele, F., Balercia, P., Giroto, R., Troiano, G. y cols. (2018). American Joint Committee on Cancer staging system 7th edition versus 8th edition: any improvement for patients with squamous cell carcinoma of the tongue?. *Oral and Maxillofacial Pathology*.

Moazeni-Roodi, A., Allameh, A., Harirchi, I., Motiee-Langroudi, M., Garajei, A. (2016). Studies on the Contribution of Cox-2 Expression in the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma and H-Ras Activation. *Pathology & Oncology research*, 23 (2): 355-360. doi: 10.1007 / s12253-016-0114-1.

Moeckelmann, N., Ebrahimi, A., Tou, Y.K., Gupta, R., Low, T.H., Ashford, B. y

cols. (2018). Prognostic implications of the 8th edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system in oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 85, 82-86. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.08.013.

Momares D, B., Contreras C, G., Martínez R, B., Ávalos J, N., & Carmona R, L. (2014). SOBREVIDA EN CARCINOMA ESPINOCELULAR DE MUCOSA ORAL: ANÁLISIS DE 161 PACIENTES. *Revista chilena de cirugía*, 66, 568-576.

Monteiro, L., Diniz-Freitas, M., Warnakulasuriya, S., Garcia-Caballero, T., Forteza, J., Fraga, M. (2018). An immunohistochemical score to predict the outcome for oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & Medicine*, 47 (4), 375-381. doi: 10.1111 / jop.12682.

Moore, M. M., Chua, W., Charles, K. A., & Clarke, S. J. (2010). Inflammation and cancer: causes and consequences. *Clinical Pharmacologic & Therapeutics*, 87(4), 504-508. doi: 10.1038/clpt.2009.254.

Morita, Y., Hata, K., Nakanishi, M., Nishisho, T., Yura, Y., Yoneda, T. (2012). Cyclooxygenase-2 promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of oncology*, 41(3), 885-892. doi: 10.3892 / ijo.2012.1529

Morita, Y., Morita, N., Hata, K., Nakanishi, M., Kimoto, N., Omata, T., y cols. (2014). Cyclooxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor-c and lymph node metastasis in human oral tongue cancer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117 (4). 502-510. doi:10.1016/j.oooo.2013.12.410.

Nagatsuka, H., Siar, CH., Tsujigiwa, H., Naomoto, Y., Han, PP., Gunduz, M. y cols.(2012). Heparanase and cyclooxygenase-2 gene and protein expressions during progression of oral epithelial dysplasia to carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 16 (5), 354–361.

Neville, B. W., Damm, D. D., Chi, A. C., & Allen, C. M. (2015). *Oral and maxillofacial pathology*, Brazil, Elsevier Health Sciences.

Ng, J. H., Iyer, N. G., Tan, M. H., & Edgren, G. (2017). Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck*, 39(2), 297-304. doi: 10.1002/hed.24589.

Niki, T., Iba, S., Tokunou, M., Yamada, T., Matsuno, Y., Hirohashi, S. Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationships to lymph node status in lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 6, 2431-2439.

Oh, C-M., Won, Y-J., Jung, K-W., Kong, H-J., Cho, H., Lee, J-K., (2016). Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2013. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association*, 48(2), 436-450. doi: 10.4143/crt.2016.089.

Padma, R., Kalaivani, A., Sundaresan, S., Sathish, P. (2017) The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral & Maxillofacial Pathology*, 21 (3), 461.

Pandey, M., Prakash, O., Santhi, W.S., Soumithran, C.S., Pillai, R.M. (2008). Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *International Journal oral & maxillofacil surgery*, 37, 379–383. doi:10.1016/j.ijom.2008.01.004.

Pires, F. R., Ramos, A. B., de Oliveira, J. B. C., Tavares, A. S., da Luz, P. S. R., & dos Santos, T. C. R. B. (2013). Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. *Journal of Applied Oral Science*, 21(5), 460–467. doi: 10.1590/1679-775720130317.

Pollaers, K., Hinton-Bayre, A., Friedland, P.L, Farah, C. (2018). AJCC 8th Edition oral cavity squamous cell carcinoma staging - Is it an improvement on the AJCC 7th Edition?. *Oral Oncology*, 82:23-28. doi: 10.1016/j.oraloncology.2018.04.018.

Pontes, H.A., Pontes, F.S., Fonseca, F.P., de Carvalho, P.L., Pereira, E.M., de Abreu, M.C. y cols. (2013). Nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 immunoexpression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Annals of Diagnostic Pathology*, 17(1), 45-50. doi: 10.1016 / j.anndiagpath.2012.04.008.

Prins, M. J., Verhage, R. J., ten Kate, F. J., van Hillegersberg, R. (2012). Cyclooxygenase isoenzyme-2 and vascular endothelial growth factor are associated with poor prognosis in oesophageal adenocarcinoma. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 16 (5), 956–966.

Punse, R., Palaskar, S., Bartake, A., Shah, D., Cyclooxygenase–2 in Oral Cancer: A Review. (2017). *Indian journal of applied research*, 7 (5). doi: 10.15373 / 2249555X.

Rajabi, M., & Mousa, S. A. (2017). The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. *Biomedicines*, 5(2). doi: 10.3390/biomedicines5020034.

Rakesh, N., Iyengar, A., Majumdar, K., Vidya, G.S., Shantha Kumar, S.S. (2016). Quantitative Evaluation of Tumour--Associated Tissue Eosinophilia and Cyclo-oxygenase-2 Gene in Oral Cancer Patients with Assessment of Long Term Outcomes. *Pathology and Oncology Research*, 22 (2), 385-92. doi: 10.1007/s12253-015-0016-7.

Rekha KP, Angadi PV (2010). Verrucous carcinoma of the oral cavity: a clinico - pathologic appraisal of 133 cases in Indians. *Oral Maxillofacial Surgery*, 14(4), 211-218.

Riera S, P., & Martínez R, B. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y

faríngeo en Chile. *Revista médica de Chile*, 133, 555-563.

Ristimaki, A., Honkanen, N., Jankala, H., Sipponen, P. & Harkonen, M.. (1997). Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Research*, 57 (7), 1276- 80.

Rivera, H., Nikitakis, N.G., Correnti, M., Maissi, S., Ponce, J.G. (2008). Oral and oropharyngeal cancer in a Venezuelan population. *Acta Odontologica Latinoamericana*, 21 (2), 175-80.

Rosales Torres, A. M., & Guzmán Sánchez, A. (2012). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(1), 89-111.

Rosell, R., Abad, A., & Monzó, M. (2000). *Manual de oncología clínica y molecular*. Madrid, España. Arán Ediciones.

Sappayatosok, K., Maneerat, Y., Swasdison, S., Viriyavejakul, P., Dhanuthai, K. , Zwang, J., Chaisri, U. (2009). Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Medicina oral, Patología oral y cirugía oral*, 14 (7), E319-24.

Scanlon, C. S., Van Tubergen, E. A., Inglehart, R. C., & D'Silva, N. J. (2013). Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. *Journal and Dental Research*, 92(2), 114-121. doi: 10.1177/0022034512467352.

Segawa, E., Sakurai, K., Kishimoto, H., Takaoka, K., Noguchi, K., Hashitani, S.y cols. (2008) Expression of cyclooxygenase-2 and NA topoisomerase II alpha in precancerous and cancerous lesions of the oral mucosa. *Oral Oncology*, 44(7), 664–671.

Seki, S., Fujiwara, M., Matsuura, M., Fujita, S., Ikeda, H., Asahina, I., & cols. (2011). Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. *Oral Oncology*, 47(7), 588-593.

Seyedmajidi, M., Shafaei, S., Siadati, S., Khorasanim M., Bijani, A., Ghasemi, N. (2014). Cyclo-oxygenase-2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Journal cancer research and therapeutics*, 10 (4), 1024-1029.

Shibata, M., Kodani, I., Osaki, M., Araki, K., Adachi, H., Ryoke, K., & Ito, H. (2005). Cyclo-oxygenase-1 and-2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncology*, 41(3), 304-312.

Silva, L. P., Gonzaga, A. K. G., Serpa, M. S., Nascimento, G. J. F., y Sobral, A. P. V. (2017). Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 and cyclin-D1 in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 29, 377-382. doi: 10.1016/j.ajoms.2016.12.005

Silverman, S., Jr. (2001). Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *The Journal of American Dental Association*, 132, 7S-11S.

Soares, T. R. C., Carvalho, M. E. d. A., Pinto, L. S. S., Falcão, C. A., Matos, F. T. C., & Santos, T. C. (2014). Oral cancer knowledge and awareness among dental students. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 13(1), 28-33.

Soumaoro, L.T., Uetake, H., Takagi, Y. (2006). Coexpression of VEGFC and Cox-2 in human colorectal cancer and its association with lymph node metastasis. *Diseases of the Colon & Rectum*, 49, 392-398.

Taziki, M.H., Fazel, A., Salamat, F., Sedaghat, S.M., Ashaari, M., Poustchi, H., y cols. (2018). Epidemiology of Head and Neck Cancers in Northern Iran: A 10-Year Trend Study From Golestan Province. *Archives of Iranian medicine*, 21(9), 406-

411.

Toomey, D.P., Murphy, J.F., Conlon, K. C. (2009). COX-2, VEGF and tumour angiogenesis. *Surgeon*, 7 (3),174-80.

Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87-108. doi: 10.3322/caac.21262.

Tsubochi, H., Sato, N., Hiyama, M., Kaimori, M., Endo, S., Sohara, Y., y cols. (2006). Combined Analysis of Cyclooxygenase-2 Expression With p53 and Ki-67 in Nonsmall Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*, 82(4), 1198 - 1204. doi: 10.1016 / j.athoracsur.2006.04.069.

Tsujii, M., Kawano, S., y DuBois, R. N. (1997). Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3336–334.

Von Rahden, B.H., Brucher, B.L., Langner, C., Siewert, J.R., Stein, H.J., Sarbia, M. (2006). Expression of cyclo-oxygenase 1 and 2, prostaglandin E synthase and transforming growth factor beta1, and their relationship with vascular endothelial growth factors A and C, in primary adenocarcinoma of the small intestine. *British Journal of Surgery*; 93, 1424-1432.

Wang, Y. H., Wu, M. W., Yang, A. K., Zhang, W.D., Sun, J., Liu, T. R. y cols. (2011). COX-2 Gene increases tongue cancer cell proliferation and invasion through VEGF-C pathway. *Medical Oncology*, 28, S360–S366 doi: 10.1007/s12032-010-9737-3.

Wimberger, P., Chebouti, I., Kasimir-bauer, S., Lachmann, R., Kuhlisch, E., Kimmig, R., y cols. (2014). Explorative investigation of vascular endothelial growth factor receptor expression in primary ovarian cancer and its clinical relevance.

Gynecologic Oncology, 133(3), 467-72.

Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., Ristimäki, A. (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Research*, 58, 4997–5001.

Xu, Q.S., Wang, C., Li, B., Li, J.Z., Mao, M.H., Qin, L.Z. y cols. (2018). Prognostic value of pathologic grade for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral diseases*, 24 (3), 335-346. doi: 10.1111/odi.12727.

Yoshimura, R., Sano, H., Masuda, C., Kawamura, M., Tsubouchi, Y., Chargui, J., y cols. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer*, 89(3), 589-596.





Zhang, X.H., Huang, D.P., Guo, G.L. (2008). Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer* 8, 4.

Zweifel, B. S., Davis, T. W., Ornberg, R. L. y Masferrer J. L. (2002). Direct Evidence for a Role of Cyclooxygenase-2 derived Prostaglandin E₂ in Human Head and Neck Xenograft Tumors. *American Association for Cancer Research*, 62 (22), 6706-6711.

Zhao, S.F., Yang, X.D., Lu, M.X., Sun, G.W., Wang, Y.X., Zhang, Y.K., y cols. (2013). Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression in oral cancer: a meta-analysis of the literature. *Tumour Biology*, 34 (5), 3165-71. doi: 10.1007/s13277-013-0886-9.

12.- ANEXOS.

I. Anexo 1: Comité de Bioseguridad

 <p>UNIVERSIDAD DE CHILE Comité de Bioseguridad Administración Conjunta Campus Norte</p> 	
<p>Comité Institucional de Bioseguridad Administración Conjunta Campus Norte FDO N°101</p>	
<p>Santiago, 08 de Mayo de 2017.</p>	
<p><u>C E R T I F I C A D O</u></p>	
<p>El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación FIOUCH 2016 titulado "Correlación y Caracterización entre Inflamación (COX-2), Apoptosis Via Mitocondrial (Familia BCL-2), Densidad Microvascular (CD105) y Angiogénesis (VEGF) en Carcinomas Espinocelulares de Mucosa Bucal Según Grado de Diferenciación. Estudio Inmunohistoquímico". El Investigador Responsable de este proyecto es el Sr. Enrico Escobar López, Profesor Asistente del Departamento Patología y Medicina Oral.</p>	
<p>En el proyecto se utilizarán muestras de carcinoma espiño celular de mucosa bucal y mucosa oral normal, en las cuales se detectarán algunos marcadores mediante Inmunohistoquímica. Estos ensayos se realizarán en el Laboratorio de Histología y Morfología Oral perteneciente a la Facultad de Odontología. El personal que manipulará las muestras biológicas se encuentra debidamente entrenado en esta área. Además, técnicos y/o estudiantes que trabajarán con ellos estarán bajo la supervisión de los Prof. Escobar y Peñafiel, este último Co-Investigador del presente Proyecto.</p>	
<p>El CIB certifica que la Facultad de Odontología cuenta con las facilidades para el manejo y desecho del material biológico y químico a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el Investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.</p>	
<p>Se extiende el presente certificado a solicitud del Prof. Escobar para ser presentado en la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología.</p>	
 <p>Dr. Mario Chiong Secretario</p>	 <p>Dra. Carla Lozano M. Presidenta</p>

II. Anexo 2: Tabla de clasificación TNM para COCE (EI-Naggar y cols., 2017)

TNM classification of carcinomas of the lip and oral cavity ^{a,b}			
T – Primary tumour		N2b	Metastasis in multiple ipsilateral lymph nodes, all ≤ 6 cm in greatest dimension
TX	Primary tumour cannot be assessed	N2c	Metastasis in bilateral or contralateral lymph nodes, all ≤ 6 cm in greatest dimension
T0	No evidence of primary tumour	N3	Metastasis in a lymph node > 6 cm in greatest dimension
Tis	Carcinoma in situ	Note: Midline nodes are considered ipsilateral nodes.	
T1	Tumour ≤ 2 cm in greatest dimension	M – Distant metastasis	
T2	Tumour > 2 cm but ≤ 4 cm in greatest dimension	M0	No distant metastasis
T3	Tumour > 4 cm in greatest dimension	M1	Distant metastasis
T4a (lip)	Tumour invades through cortical bone, inferior alveolar nerve, floor of mouth, or skin (of chin or nose)	Stage grouping	
T4a (oral cavity)	Tumour invades through cortical bone, into deep/extrinsic muscle of tongue (genioglossus, hyoglossus, palatoglossus, and styloglossus), maxillary sinus, or skin of face	Stage 0	Tis N0 M0
T4b (lip and oral cavity)	Tumour invades masticator space, pterygoid plates, or skull base, or encases internal carotid artery	Stage I	T1 N0 M0
Note: Superficial erosion alone of bone / tooth socket by gingival primary is not sufficient to classify a tumour as T4.		Stage II	T2 N0 M0
N – Regional lymph nodes (i.e. the cervical nodes)		Stage III	T1–2 N1 M0
NX	Regional lymph nodes cannot be assessed		T3 N0–1 M0
N0	No regional lymph node metastasis	Stage IVA	T1–3 N2 M0
N1	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, ≤ 3 cm in greatest dimension		T4a N0–2 M0
N2	Metastasis as specified in N2a, N2b, or N2c below	Stage IVB	Any T N3 M0
N2a	Metastasis in a single ipsilateral lymph node, > 3 cm but ≤ 6 cm in greatest dimension		T4b Any N M0
		Stage IVC	Any T Any N M1
		^a Adapted from Edge et al. (625A) – used with permission of the American Joint Committee on Cancer (AJCC), Chicago, Illinois; the original and primary source for this information is the AJCC Cancer Staging Manual, Seventh Edition (2010) published by Springer Science+Business Media – and Sobin et al. (2228A). ^b A help desk for specific questions about TNM classification is available at http://www.uicc.org/resources/tnm/helpdesk .	

III. Anexo 3: Tabla de datos. IM para COx-2 y VEGF EN COCE y mucosa oral.

COX-2							
BD		MD		PD		MO	
Muestra	IM	Muestra	IM	Muestra	IM	Muestra	IM
1	0,874119	1	0,378517	1	0,9858612	1	0,07674
2	0,332893	2	0,5804598	2	0,433193	2	0
3	0,604072	3	0,7426557	3	0,6161504	3	0,0444
4	0,1982665	4	0,5280236	4	0,9738832	4	0,108
5	0,221198	5	0,9131455	5	0,9793651	5	0,0267
6	0,542199	6	0,594255	6	0,580214	6	0,00510
7	0,3288136	7	0,7169811	7	0,692037	7	0,032100
8	0,525641	8	0,3672161	8	0,9963557		
9	0,436508	9	0,380841	9	0,459459		
10	0,8877456	10	0,945423	10	0,461615		
11	0,6901408	11	0,4728033	11	0,9587629		
12	0,7626775	12	0,258652	12	1		
13	0,321101	13	0,6937984				
14	0,272873						
Distribución	Normal		Normal		No Normal		Normal
Media	0,49987486		0,5825209		0,76140804		0,0280

VEGF2							
BD		MD		PD		MO	
Muestra	IM	Muestra	IM	Muestra	IM	Muestra	IM
1	0,309264	1	0,38292	1	1	1	0
2	0,5759234	2	0,495077	2	0,641437	2	0
3	0,358944	3	0,3811075	3	0,828922	3	0,0056818
4	0,318056	4	0,6211878	4	0,70254958	4	0,0672515
5	0,0932377	5	0,8616541	5	0,9571248	5	0,0086831
6	0,387515	6	0,5338462	6	0,565108	6	0,0144928
7	0,440347	7	0,7255113	7	0,894382	7	0
8	0,281716	8	0,442646	8	0,8663149		
9	0,469016	9	0,3275229	9	0,687108		
10	0,4016393	10	0,7436464	10	0,449721		
11	0,3865248	11	0,46118722	11	0,8536184		
12	0,2171291	12	0,4416826	12	0,94864048		
13	0,4155844	13	0,3049404				
14	0,42160279						
Distribución	Normal		Normal		Normal		No Normal
Media	0,36260711		0,51714842		0,78291052		0,01372987