



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Estudio de la Microbiota Salival Humana en Pacientes con
Cáncer Epidermoide de Laringe

D. Juan David Lara Lozano

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Estudio de la Microbiota Salival Humana en Pacientes con Cáncer
Epidermoide de Laringe

Autor: D. Juan David Lara Lozano

Directores: D. Diego Hellín Meseguer

D. Vicente Navarro López

Murcia, 2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA

D./Dña. Juan David Lara Lozano

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Estudio de la Microbiota Salival Humana en Pacientes con Cáncer Epidermoide de Laringe

y dirigida por,

D./Dña. Diego Hellin Meseguer

D./Dña. Vicente Navarro López

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 15 de Septiembre de 2023

Fdo.: Juan David Lara Lozano

Esta DECLARACIÓN DE AUTORES Y COAUTORES debe ser incluida en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Judith Lozano Ramos, el motor que tengo en mi vida para realizar cada uno de mis objetivos, por enseñarme que las cosas difíciles solo se consiguen con trabajo y disciplina, y que posiblemente son las que más merecen la pena. Porque con su esfuerzo estoy donde estoy y llegaré hasta donde pueda hacerlo.

A Luis, por su paciencia y animo durante el tiempo que más sentía que iba a flaquear. Por su cariño que me acompañó durante todo el proceso y el ejemplo de dedicación y disciplina que siempre me muestra.

A mis hermanos, mi tía, toda mi familia y amigos que siempre han sido un pilar de mi vida que, aunque lejos, siempre están en mi corazón y en mi mente, con ganas de hacerlos sentir orgullosos de mis logros.

Al Dr. Diego Hellín y Vicente Navarro, por siempre estar dispuestos y llenos de ganas por la investigación, por la paciencia y constante ayuda imprescindible para llevar a cabo este proceso.

Al Dr. Juan Cabeza y D^a Lucrecia Luna por su colaboración e implicación dentro del proyecto, por los consejos, correcciones y sobre todo el tiempo invertido con tanta disposición.

A mis compañeros de trabajo del servicio de Otorrinolaringología del HCUVA, a mi jefe Dr. José Domingo Cubillana, compañeros de residencia y actuales residentes que hacen del día a día un camino más llevadero y entretenido, lleno de retos y alegrías.

«No son los más fuertes de la especie los que sobreviven, ni lo más inteligentes. Sobreviven los más flexibles y adaptables a los cambios»

Charles Darwin.

ABREVIATURAS

CCC: Cáncer de cabeza y cuello.

ERGE: Enfermedad por reflujo gastroesofágico.

VPH: Virus del Papiloma Humano.

CCND1: Ciclina D1.

PAAF: Punción y aspiración con aguja final.

BAG: Biopsia por aguja gruesa.

TC: Tomografía computarizada.

RM: Resonancia magnética.

PET-TC: Tomografía computarizada por emisión de positrones.

PET- RM: Resonancia magnética por emisión de positrones.

18F-FDG: 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucosa.

GLUT1: Transportador de glucosa de membrana.

RT/QT: Radio-quimioterapia.

ADC: Coeficiente de difusión aparente.

EEE: Espacio extracelular extravascular.

AJCC: The American Joint Committee on Cancer

T: Tamaño.

N: Ganglio.

M: Metástasis.

ACS: American Cancer Society.

LSC – CHEP: Laringectomía supracricoidea con crico-hioido-epiglotopexia.

LT: Laringectomía total.

N+: Ganglio positivo.

TL-TOUSS: Laringectomía total transoral ultrasónica.

VAS: Vía aérea superior.

MM: meato medio.

RE: Receso esfenoidal.

TRAF: Tracto reproductor alto femenino.

TEA: Trastorno del espectro autista.

TLR: Receptores tipo Toll.

CEE: Carcinoma escamoso esofágico.

CEL: Carcinoma escamoso laríngeo.

PCoA: Análisis de Coordenadas Principales.

CPS – II: Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort.

PLCO: Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial.

OCC: Cáncer de cavidad oral.

OPC: Cáncer orofaríngeo.

RFL: Reflujo faringo laríngeo.

GCF: Fluido Crevicular gingival.

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

OTU: Unidad Taxonómica Operativa.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

OBJETIVOS	14
Objetivo Principal	15
Objetivos Específicos	15
MARCO TEÓRICO	16
Cáncer De Laringe	17
Epidemiología y Generalidades.....	17
Diagnóstico	22
Diagnóstico Radiológico.....	23
Clasificación del cáncer de laringe	38
Estadificación del Cáncer Laríngeo	46
Tratamiento	62
Tratamiento del Cuello	73
Pronóstico	77
Microbiota: Generalidades.....	79
Microbiota de Vía Aérea Superior	82
Microbiota de Cavidad Oral	86
Microbiota Intestinal	88
Microbiota del Aparato Genital Femenino	91
Microbiota de la piel	93
Microbiota y el Comportamiento	95
Microbiota y Cáncer De Laringe.....	106
Saliva como Método de Estudio	120
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	124
Autonomía	125
Beneficencia.....	125
No-Maleficencia	126
Justicia	126
MATERIALES Y MÉTODOS	128
Población de Referencia y de Estudio	129
Población diana.....	129
Población de Estudio.....	130
Muestra.....	130
Definición de Grupos de Trabajo	131
VARIABLES DEL ESTUDIO	132
Recogida de Datos	136
Obtención y Preparación de las Muestras Biológicas.....	136
Materiales	137
Obtención De La Muestra	138
Transporte y/o Conservación.....	138
Determinación Metataxonómica de la Composición del Microbiota Salival	139
Extracción del ARN	140

Amplificación y Secuenciación del ARN	141
Análisis Bioinformático de las Secuencias de Amplicones del Gen Bacteriano ARNr 16S y Asignación Taxonómica	144
Expresión de Resultados	146
Estructura de las Comunidades Microbianas.....	146
Diversidad y Riqueza de la Microbiota.....	147
Diversidad Alfa (α)	148
Índice para Cuantificar la Diversidad Alfa y Riqueza	149
Representación Gráfica de los Índices de Alfa Diversidad y Estudio de Diferencias Estadísticamente Significativas entre los Grupos.....	154
Curvas de rarefacción	154
Diversidad Beta (β)	155
Índices para Cuantificar la Beta Diversidad	156
Estudio de la Composición de la Microbiota Salival.....	161
Curvas de eficacia diagnóstica (Curvas ROC)	161
Área bajo la curva (AUC)	163
RESULTADOS	165
Características Clínico – Patológicas de los Pacientes a Estudio	166
Análisis de la Composición de la Microbiota Salival	169
Descripción y Comparación del Rango Taxonómico Familia de los Grupos de Casos y Controles ..	169
Análisis Estadístico entre el Grupo de Casos y Controles en Rango Taxonómico Familia	175
Descripción y Comparación del Rango Taxonómico Género de los Grupos de Casos y Controles ..	176
Análisis Estadístico entre Grupo de Casos y Controles en Rango Taxonómico Genero.....	184
Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota salival de los grupos a estudio	186
Índices de la Alfa Diversidad de Shannon y Simpson	186
Estimadores de Riqueza.....	189
Curvas de Rarefacción.....	192
Beta Diversidad Mediante Índice de Jaccard	195
Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de los grupos de casos y controles	198
Método UniFrac Weighted	198
Método UniFrac Unweighted	199
Descripción de Área Bajo la Curva en Curvas ROC	201
Alloprevotella.....	201
Campylobacter	203
Rothia.....	205
DISCUSIÓN	208
Comparación de Características Clínico – Patológicas de los Pacientes del Estudio.....	213
Comparación de la Composición de la Microbiota Salival en Rango Taxonómico <i>Familia</i> en Grupos de Casos y Controles	214
Comparación de la Composición de la Microbiota Salival en Rango Taxonómico <i>Género</i> en los Grupos de Casos y Controles	217
Alfa Diversidad y Riqueza Del Rango Taxonómico <i>Género</i> en el Grupo de Casos de Pacientes con Carcinoma Escamoso de Laringe en Comparación con Controles	220

Beta Diversidad y Riqueza en el Grupo de Casos de Paciente con Carcinoma Escamoso de Laringe en Comparación con Controles.....	223
Método Unifrac para el Análisis de las Muestras de los Grupos de Casos y Controles del Estudio.....	226
Análisis del Área Bajo la Curva en Curvas ROC a partir de los Casos y Controles Estudiados	227
CONCLUSIONES	231
BIBLIOGRAFÍA	234
ANEXOS.....	252

OBJETIVOS

Objetivo Principal

El objetivo de este estudio es definir la microbiota salival de pacientes con cáncer epidermoide de laringe y establecer las diferencias que hay entre estos y un grupo de pacientes con patología benigna de laringe. Esto ayudará a definir a los microorganismos que se relacionan con este tipo de cáncer y estudiar en un futuro su posible implicación en el origen del mismo. Además, estos microorganismos podrían servir como biomarcador para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Objetivos Específicos

- Describir la composición de la microbiota en la saliva de pacientes con carcinoma epidermoide de laringe.
- Describir la composición de la microbiota en la saliva de pacientes sanos.
- Comparar la microbiota de la saliva entre pacientes con carcinoma epidermoide de laringe y pacientes sanos.
- Definir la microbiota que se puede utilizar como biomarcador temprano en cáncer escamoso de laringe.

MARCO TEÓRICO

Cáncer De Laringe

Epidemiología y Generalidades

El término Cáncer de Cabeza y Cuello (CCC) se emplea para describir al conjunto de tumores malignos localizados en el tracto aerodigestivo superior, incluyendo senos paranasales, cavidad oral, lengua, glándulas salivares, faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe) y laringe, quedando fuera de este grupo los tumores de piel, sistema nervioso central y glándula tiroides. El cáncer de laringe constituye aproximadamente el 75% de los tumores de cabeza y cuello (Ballesteros, 2023).

A nivel mundial el cáncer de laringe es la séptima tumoración maligna más frecuente, con un 3% de incidencia dentro de todos los cánceres (Snow, 2020). La incidencia y la prevalencia del cáncer de laringe ha aumentado en un 12% y 23,8% respectivamente en las últimas tres décadas, según cifras de la Global Health Data Exchange (Nocini et al., 2020). A pesar de esto y gracias al avance en las técnicas diagnósticas y terapéuticas, la mortalidad ha disminuido discretamente. Geográficamente, Europa con 5,45 nuevos casos por 1000.000 habitantes, es el continente con mayor número de casos nuevos por año, 8 veces mayor a la de África, que es el continente que registra el menor número de casos. Sin embargo, aunque la mortalidad asociada también sea mayor en los países europeos, si se compara la ratio entre muertes e incidencia es significativamente mayor en África debido a la menor disponibilidad de recursos. Se reconoce que la población africana presenta esta patología a una menor edad y con una incidencia y mortalidad mayor en comparación con la raza caucásica (Gil & Fliss, 2009; Steuer et al., 2017). La

diferencia entre géneros se ve superada por los hombres en cuanto a incidencia, prevalencia, mortalidad y carga de la enfermedad, 5 veces superior al de las mujeres, con un incremento progresivo de estas últimas debido al aumento del hábito tabáquico (Sturgis et al., 2019). En ambos géneros se alcanza un pico máximo de prevalencia aproximadamente a los 65 años y la mortalidad a los 80 años (Marur & Forastiere, 2008; Nocini et al., 2020; Steuer et al., 2017).

A nivel nacional, España, según la Sociedad Española de Oncología Médica a partir de datos aportados por la Red Española de Registros de Cáncer (Ballesteros, 2023), ha disminuido en 3.211 nuevos casos de cáncer de laringe en el 2020, que representó un 1,16% del total de tumores, siendo un 88% de casos en hombres. De esta forma, se considera la tercera neoplasia más frecuente del tracto aerodigestivo, por detrás del cáncer de pulmón y el cáncer de cavidad oral y faringe. En complemento, se estima que el número de nuevos diagnósticos de cáncer de cabeza y cuello incrementará hasta un 62% al 2035 (Lim et al., 2018).

El hábito tabáquico constituye el principal factor de riesgo, registrado aproximadamente entre 70 – 95% de los casos, con un aumento en el riesgo de 10 a 15 veces por encima de los paciente no fumadores, y de 30 veces en pacientes grandes fumadores (Marur & Forastiere, 2008; Snow, 2020; Steuer et al., 2017). Además, el consumo excesivo de alcohol, no solo se considera un factor de riesgo aislado, también presenta un sinergismo con el tabaco, aumentando 6 veces el riesgo cuando su consumo es en conjunto. Dentro de otros factores de riesgo se encuentran algunos menos frecuentes como la

enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), reflujo faríngeo laríngeo, Síndrome de Plummer – Vinson (Déficit de Vitamina A e hierro), malformaciones anatómicas, exposición a químicos, asbestos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, radiaciones ionizantes, dietas ricas en grasas y conservantes, infecciones como la del Virus del Papiloma Humano (VPH), presencia del marcador p16, así como infecciones por *Helicobacter pylori*. (H. Gong et al., 2012; Koroulakis A, 2021; Steuer et al., 2017; Sturgis et al., 2019). La asociación de esta patología con el VPH está aumentando la incidencia por la creciente prevalencia del VPH en países desarrollados, prácticas de sexo oral no protegido y el aumento del número de parejas sexuales. El subtipo más frecuentemente encontrado es el subtipo 16, con una afectación mucho más frecuente en personas jóvenes, donde se evidencia una latencia de 10 a 30 años desde la exposición oro-sexual. (Marur & Forastiere, 2008; Snow, 2020).

La tumorigénesis en la vía aerodigestiva está dada por cambios genéticos que se dan como resultado de la exposición constante a agentes cancerígenos. En los últimos años esta área ha despertado el interés de investigadores, con descubrimientos que son importantes a la hora del pronóstico y tratamiento. La ciclina D1 (CCND1) es un oncogén que activa la progresión del ciclo celular, la cual ha sido encontrada entre el 30% y 50% de los pacientes con tumores de laringe. Una sobreexpresión de este oncogén se ha visto asociado a una enfermedad más avanzada, aumento en la recurrencia y disminución del pronóstico (Marur & Forastiere, 2008).

Dentro de los genes supresores de tumor, el TP53 se encuentra mutado entre el 40 y 60%

de los pacientes con tumores de laringe, hallando una relación con la progresión de lesiones premalignas a enfermedades invasivas (Marur & Forastiere, 2008).

El CDKN2A, conocido también como gen P16, es un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, con una gran importancia en la regulación del ciclo celular. La inactivación del gen P16 se considera el cambio más común en la progresión de los tumores de laringe (Marur & Forastiere, 2008).

Por otra parte, la vía Notch se encuentra como una de las vías de señalización asociadas con el cáncer de laringe. Algunos estudios muestran los altos niveles en la expresión de Notch1 sugiriendo un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (Porcheri & Mitsiadis, 2021; Snow, 2020). De igual manera, la mutación de Notch1 se ha visto asociado con la resistencia al tratamiento con quimioterapia. Una sobreexpresión de D114, otra vía de señalización, se relaciona con la reorganización vascular y el riesgo de metástasis que empeora el pronóstico de los pacientes (Porcheri & Mitsiadis, 2021).

El 98% de los tumores malignos de laringe corresponden a carcinomas epidermoides bien o moderadamente diferenciados (Gil & Fliss, 2009; Marur & Forastiere, 2008). El 2% corresponde a otros tipos histológicos como adenocarcinomas, condrosarcomas, leiomiomas, linfomas y tumores neuroendocrinos. Es fundamental el diagnóstico anatomopatológico para realizar un adecuado tratamiento terapéutico (Koroulakis A, 2021; Nocini et al., 2020).

La localización anatómica del tumor es una importante distinción para realizar durante el diagnóstico, clasificándola entre supraglotis, glotis y subglotis. Según sea la localización los tumores presentan diferencias clínicas, terapéuticas y pronósticas. Así, aproximadamente el 66% de los tumores se originan en la región glótica, seguidos de la supraglotis en un 30%, y por último, en la subglotis (Koroulakis A, 2021).

Clínicamente la principal manifestación de los tumores glóticos inicialmente es disfonía de varios días de evolución, conforme avanza la afectación y en estadios más avanzados, se podría encontrar síntomas como disfagia, odinofagia, estridor, disnea, otalgia reflejo o hemoptisis. Por el contrario, en los tumores supraglóticos la disfonía se encuentra en estadios más avanzados de la enfermedad, y su síntoma inicial es la sensación de cuerpo extraño faríngeo o directamente con adenopatías cervicales metastásicas. Los tumores subglóticos son frecuentemente asintomáticos, razón por la cual existe un retraso en su diagnóstico y peor pronóstico. En fases avanzadas todos los tumores presentan frecuentemente la asociación con síntomas constitucionales como astenia, anorexia y pérdida de peso (SEORL-CCC, 2019).

Existen múltiples barreras de tejido conectivo que impiden la diseminación de los tumores a otros niveles de la laringe. El cono elástico, que cruza entre el ligamento vocal y el cartílago cricoides, previene la diseminación de la glotis a la subglotis. Así mismo, la membrana cuadrangular, que se extiende desde el ligamento vocal a la epiglotis (superior) y cartílago aritenoides (posterior), es la barrera que impide el paso de la supraglotis a la glotis (Steuer et al., 2017).

De igual manera que cada región anatómica presenta diferentes patrones de síntomas, encontramos que la diseminación linfática varía entre cada una. Los tumores supraglóticos se diseminan precozmente hacia ganglios linfáticos cervicales de las áreas II, III y IV, de tal forma que, al momento del diagnóstico, hasta el 55% de los pacientes presentan adenopatías unilaterales y 16% contralaterales. Los tumores subglóticos suelen diseminarse a ganglios de las áreas cervicales IV y VI. A diferencia de los anteriores, los tumores glóticos, debido a la ausencia de irrigación linfática, no suelen producir metástasis locoregionales (Koroulakis A, 2021).

Diagnóstico

El diagnóstico del cáncer de laringe se realiza fundamentalmente con una historia clínica completa, realizando hincapié en los principales factores de riesgo (tabaco y alcohol), y los síntomas anteriormente descritos (Snow, 2020). En cuanto a la exploración física exhaustiva, se espera que incluya valoración oral directa y con nasofibrolaringoscopia para identificar la lesión y determinar extensión, tamaño, localización e infiltración de la misma; igualmente se debe realizar una palpación cervical, para valorar la existencia de adenopatías y el grado de afectación local. El diagnóstico definitivo se realiza mediante la toma de biopsia por laringoscopia directa o punción aspiración con aguja fina (PAAF) de adenopatías para el estudio por anatomía patológica (Gil & Fliss, 2009; Snow, 2020). Adicionalmente siempre se debe completar el estudio de localización y delimitación de la lesión con una tomografía computarizada (TC) con contraste de cabeza y cuello o resonancia magnética nuclear (RM); ante la sospecha de metástasis a distancia se debe

solicitar una TC de tórax con contraste y tomografía computarizada por emisión de positrones (PET-TC), para de esta manera estadificar según el TNM (Koroulakis A, 2021).

Diagnóstico Radiológico

La nasofibrolaringoscopia permite visualizar la existencia de una lesión que puede ser sospechosa de malignidad, su localización y extensión superficial, así como evaluar la movilidad de las cuerdas vocales. Sin embargo, esta exploración no permite definir la extensión en profundidad del proceso neoplásico, en especial la invasión de espacios profundos pre-epiglóticos y paraglóticos, cartílagos laríngeos o presencia de adenopatías afectadas por metástasis locales, característicos de los tumores del área supraglótica. Es aquí donde las técnicas de imagen radiológico cobran gran importancia por su mayor sensibilidad y especificidad al momento del diagnóstico inicial de esta patología (Snow, 2020).

Existen situaciones en las cuales la información aportada por los estudios radiológicos es imprescindible para conseguir una estadificación adecuada de los tumores y, en consecuencia, escoger la alternativa terapéutica más adecuada. Por ejemplo, en la comisura anterior el ligamento vocal se inserta directamente en el cartílago tiroides, sin presencia de pericondrio, lo cual favorece directamente la propagación del tumor a los cartílagos laríngeos. En estos tumores solo el estudio radiológico permite diferenciar entre un tumor no infiltrante y un tumor con afectación cartilaginosa. En los tumores supraglóticos el estudio radiológico es necesario para diagnosticar la posible infiltración de los espacios pre-epiglótico y paraglótico. Así mismo, también permiten evaluar si hay

exteriorización del tumor por la membrana tirohioidea o extensión hacia la valleculea o la base de la lengua. En los tumores transglóticos y glóticos avanzados, con fijación de la cuerda vocal, el estudio radiológico permite evaluar la afectación de las estructuras cartilaginosas y la posible exteriorización tumoral, criterio clave para definir la categoría T4 (Rovira et al., 2011).

Ecografía

A pesar de la alta tecnología con la que se cuenta en la actualidad, la ecografía es una técnica radiológica simple y de fácil acceso que se debe tener la mano en el momento de diagnóstico del carcinoma de cabeza y cuello. La ecografía es especialmente útil cuando se habla de identificar ganglios cervicales metastásicos y un medio de ayuda para la biopsia de los mismos (Burkill et al., 2016).

La biopsia por punción y aspiración con aguja fina (PAAF) o gruesa (BAG) de los ganglios cervicales metastásicos muchas veces es el diagnóstico necesario para comenzar un tratamiento específico. Para realizar una adecuada técnica de biopsia se necesitan 3 ítems a seguir: posición, técnica y configuración del ecógrafo. En la posición óptima se tiene al médico frente al ecógrafo junto con una localización que haga reducir los ángulos entre la sonda, aguja, médico y paciente. La técnica de la biopsia se mejora cuando se sujeta la sonda más cerca del transductor con los dedos abiertos tocando el paciente, creando una imagen de ultrasonido constante que muestra la ruta óptima hacia el

ganglio. El paralelismo es fundamental a la hora de realizar la punción con la aguja (Burkill et al., 2016; Leoncini et al., 2014b).

La ecografía es un examen inicial de gran utilidad en la diferenciación de adenopatías benignas y malignas. Los nódulos benignos tienden a ser elongados, con formas fusiformes y centro con hilio ecogénico, en comparación con las características malignas como formas redondas, sin identificación del hilio por necrosis o destrucción de la arquitectura. La necrosis puede ser fácilmente identificada como necrosis cística, o menos fácil, como necrosis por coagulación. El tamaño en su eje corto es determinante como característica de malignidad, siendo de 5,8 a 10 mm los límites que más sugieren patología. La experiencia del evaluador es muy importante en el reconocimiento de las características antes mencionadas (Burkill et al., 2016; Leoncini et al., 2014b).

Tomografía Computarizada (TC)

La TC tiene una gran sensibilidad y un alto valor predictivo negativo para la detección de la invasión de los cartílagos si se utilizan los criterios de erosión, esclerosis, lisis y extensión extralaringea (Figura 1). (Juliano & Moonis, 2018).

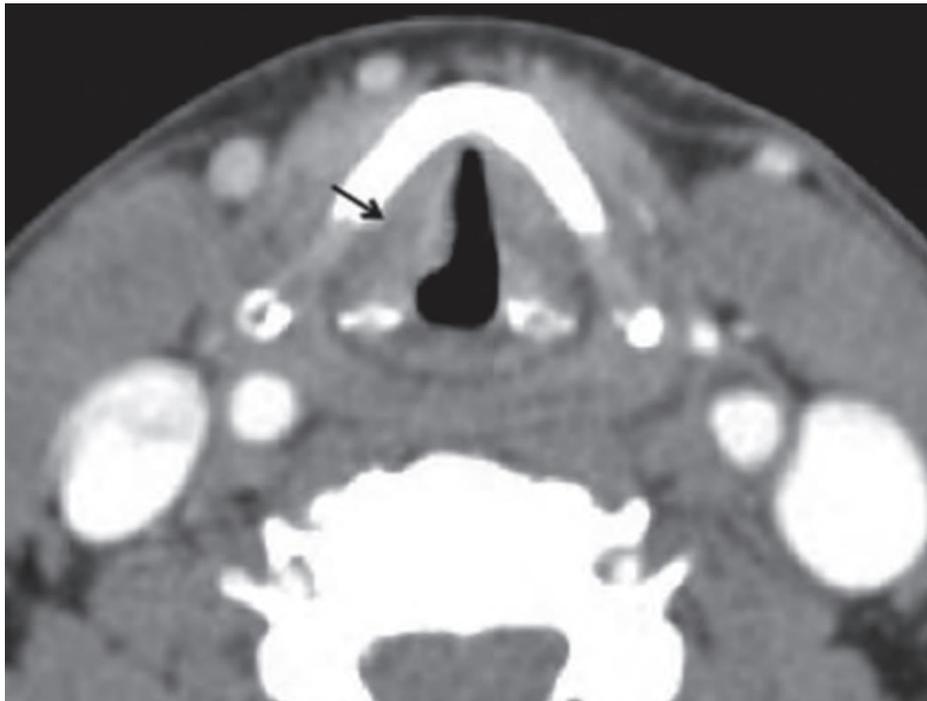


Figura 1. Neoplasia del tercio medio de la cuerda vocal derecha (Rovira et al., 2011).

La esclerosis es un signo sensible de invasión del cartílago por las neoplasias, se produce por remodelación ósea y con actividad osteoblástica, inducido a veces por la presencia de tumor adherido al cartílago (Figura 2) (Rovira et al., 2011).

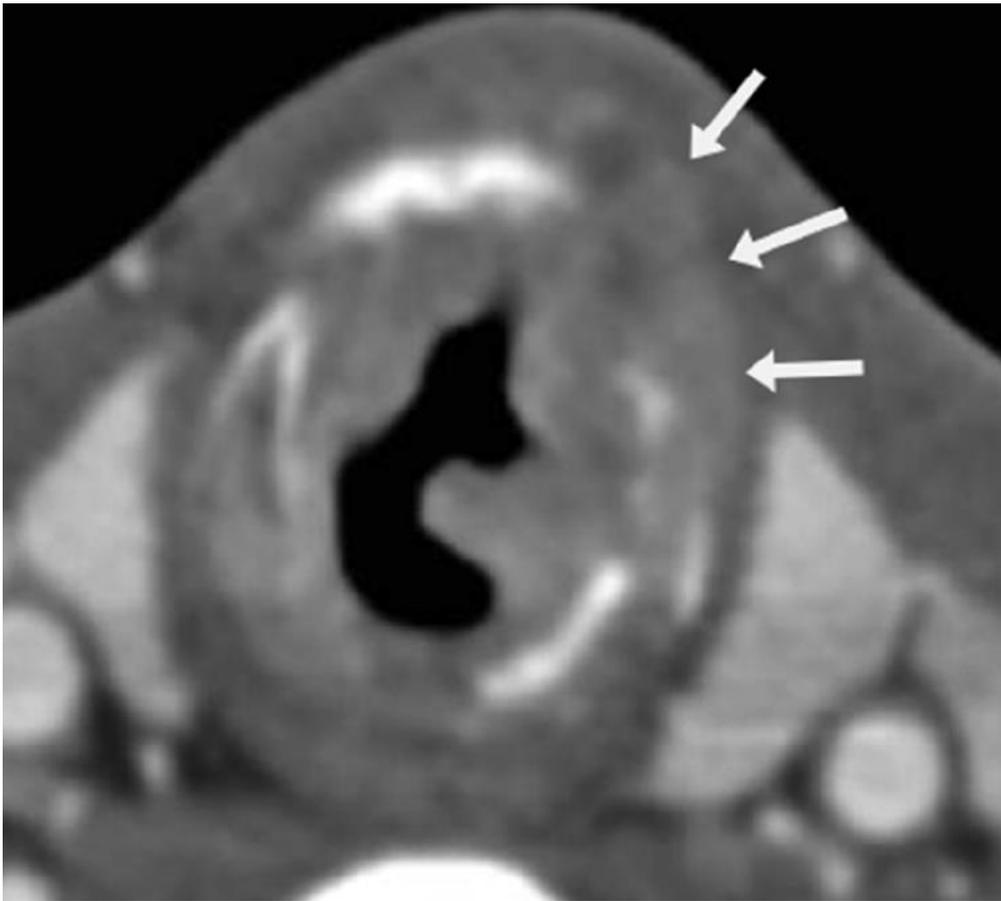


Figura 2. La imagen axial de TC con contraste muestra tejido blando anormal más allá de la superficie externa de los cartílagos laríngeos (flechas), lo que confirma inequívocamente la invasión del cartílago en la TC y el estado T4 del tumor (Juliano & Moonis, 2018).

La existencia de esclerosis en el cartílago tiroides solo tiene una especificidad del 40% (Figura 3). La erosión y la lisis se consideran criterios específicos de invasión y su presencia de forma conjunta tiene una especificidad del 93%, mientras que la extensión extralaringea tiene una especificidad del 95% (Rovira et al., 2011).

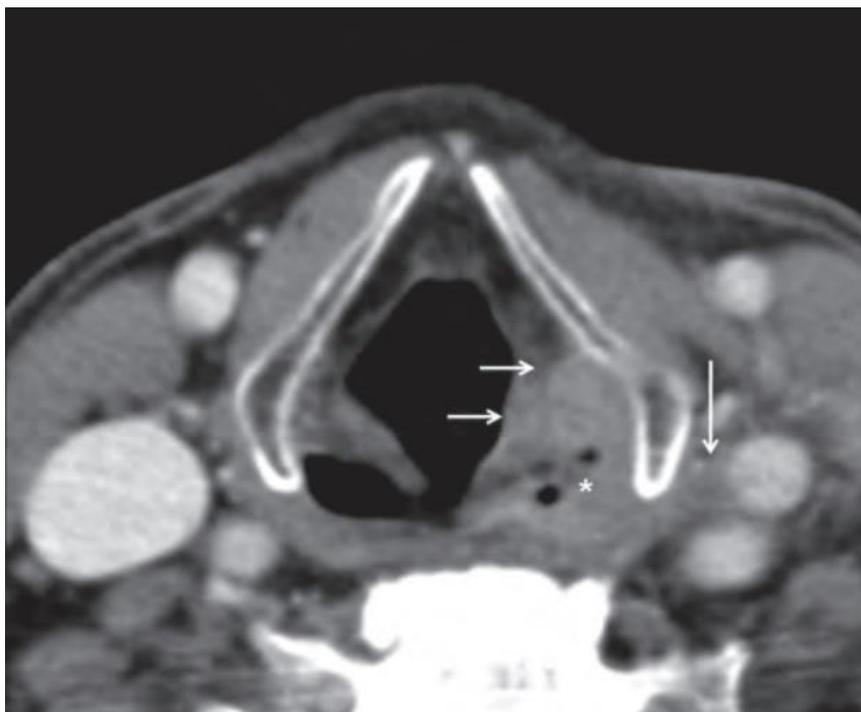


Figura 3. TC de cuello con contraste. Se visualiza neoplasia en el seno piriforme izquierdo (asterisco) con extensión laríngea al repliegue aritenopiglótico y al espacio paraglótico (flechas pequeñas), y extralaríngea, a través de la membrana tirohioidea, al espacio carotídeo con pérdida del plano graso de separación con la carótida, pero sin criterios radiológicos de infiltración vascular (flecha larga). La extensión extralaríngea hace que sea T4a (Rovira et al., 2011).

La decisión de realizar TC o RM en la estadificación del cáncer de cabeza y cuello depende principalmente de la preferencia y experiencia del instituto. En algunos centros se prefiere utilizar la RM debido a la resolución superior del contraste que mejora la detección del tumor y la definición de márgenes, visualización de invasión nerviosa o dolor referido. Las preferencias de la RM sobre la TC son cada vez mayores en los

profesionales sanitarios por la mejora en la definición de la imagen. A pesar de esto, la TC es más utilizada a nivel mundial cuando se trata del diagnóstico, tratamiento, complicaciones y seguimiento de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Figura 4). Las técnicas que se manejan con la TC, al igual que la RM, necesitan cooperación por parte del paciente, la mayor parte de las veces se necesita un estudio radiológico que permita la visualización desde la base del cráneo hasta el tórax con cortes de 1 - 1.5 mm con brazos abajo. El medio de contraste es necesario, a menos de presentar alergia o disfunción renal, con un volumen de 100 ml a 1 mL/s, iniciando la toma de la imagen al terminar la perfusión (Burkill et al., 2016).

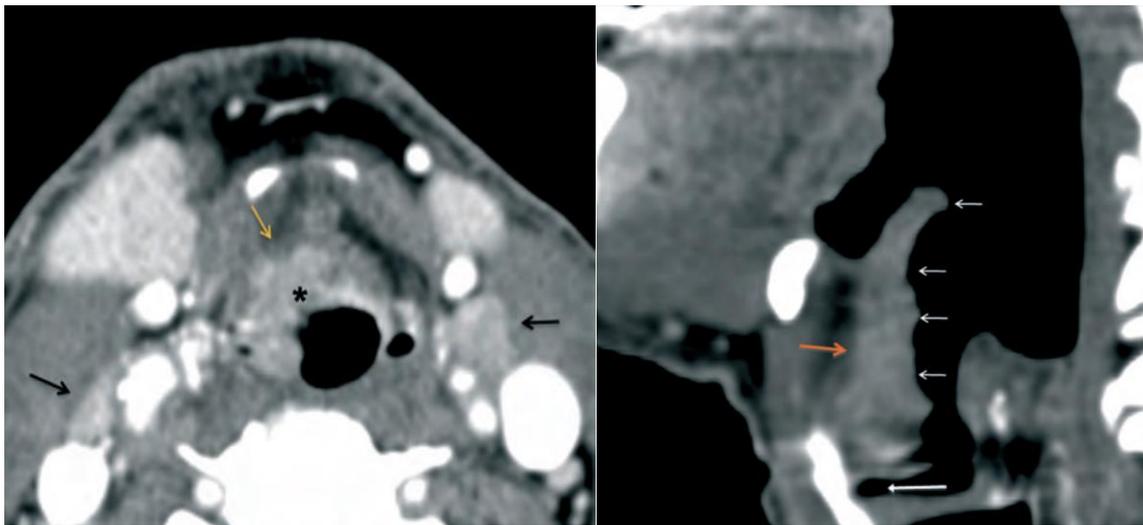


Figura 4. Tumoración con extensa afectación de la epiglotis (asterisco) que en profundidad afecta al espacio preepiglótico (flecha naranja). Hay adenopatías yugulares bilaterales (flechas negras).

Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética (RM) es el estudio radiológico más utilizado en los últimos años para la estadificación de los tumores de cabeza y cuello. Es un método de emisiones con capacidad multiplanar y posibilidad de obtener cortes primarios en cualquier dirección del espacio, con una elevada resolución de contraste y ausencia de efectos nocivos conocidos al no utilizar radiaciones ionizantes. La RM se basa en la excitación de los núcleos de uno de los tres isótopos del hidrógeno, previamente introducidos en un potente campo magnético estático (Figura 5) (Juliano & Moonis, 2018).

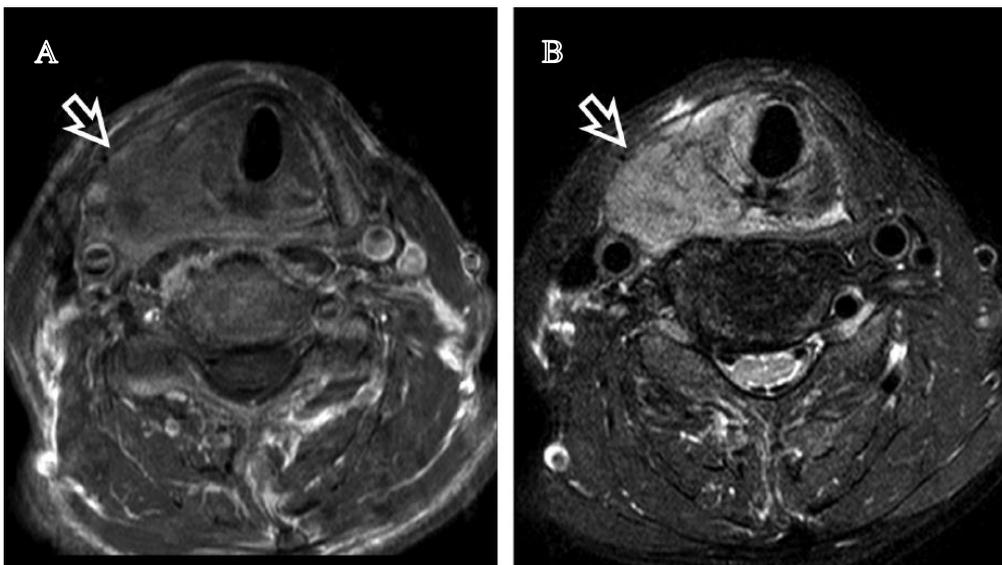


Figura 5. Imágenes de resonancia magnética axiales de un carcinoma escamocelular hipofaríngeo del lado derecho (flecha) en (A) imagen postcontraste ponderada en T1, (B) imagen ponderada en T2. (Dai & King, 2018)

Tomografía Computarizada por Emisión de Positrones

La tomografía computarizada por emisión de positrones (PET-TC) con 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucosa (18F-FDG) ha cobrado un papel importante en el manejo del carcinoma de cabeza y cuello (Wong et al., 2012). El 18F-FDG es el marcador más utilizado con el PET-TC a nivel oncológico. Este es emisor de electrones positivos (positrones), que sufren una reacción de “destrucción” con los electrones vecinos, produciendo una gran energía de fotones captados por el detector de positrones formando la imagen base de esta prueba. FDG es un análogo de la glucosa que es transportado desde la sangre hasta las células por transportadores de glucosa de membrana (GLUT1). Una vez en la célula, la FDG es fosforilada por la hexoquinasa a la forma FDG-fosfatasa y atrapada en la célula. Este método se basa en el aumento del metabolismo de glucosa en las células tumorales, aunque también se puede presentar en procesos inflamatorios o infecciosos. Por esto es tan importante saber cuáles son las variantes de la normalidad del 18F-FDG, dado que algunas áreas del organismo tienen un aumento fisiológico de la función de este marcador (Figura 6).

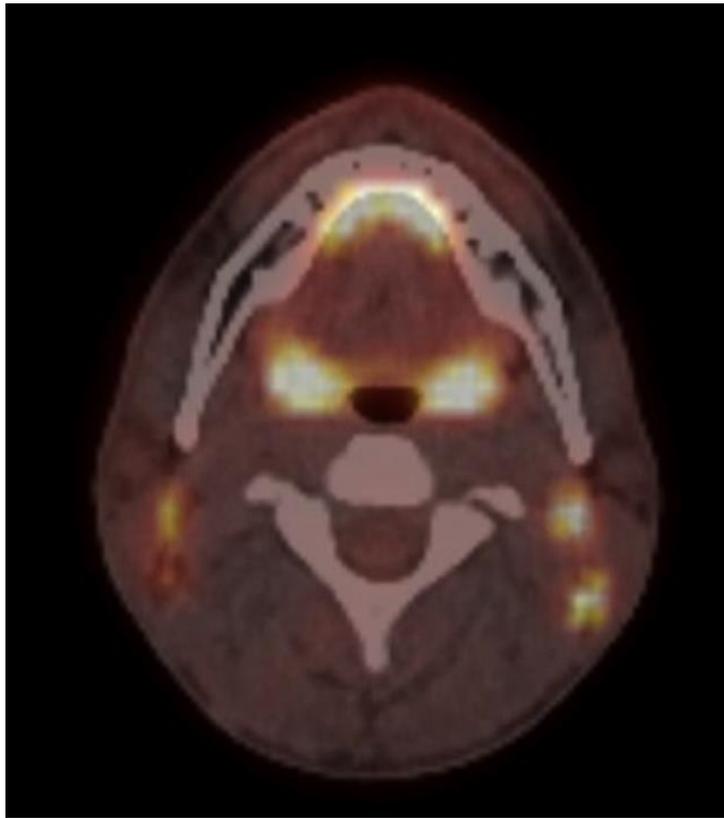


Figura 6. PET-TC con captación fisiológica sobre músculos milohioideos y amígdalas palatinas.

La PET-TC tiene una limitación a la hora de realizar el estadiaje tumoral por su baja resolución en la imagen y la mala resolución del contraste. Nuevos estudios demuestran que la resonancia magnética por emisión de positrones (PET-RM) tiene mejores resultados para la delimitación del tumor y que el uso de contraste en la TC como parte del PET-TC ayudaría a mejorar el estudio. Los estudios que comparan el PET-TC con 18F-FDG con la TC con contraste, RM y ecografía (pruebas anatómicas) muestran que la primera es más precisa en el momento de localizar metástasis de ganglios cervicales. En un metaanálisis donde se compararon estas pruebas se evidenció que la sensibilidad y especificidad del PET-TC con 18F-FDG era 80 y 86% respectivamente, mientras las

pruebas “anatómicas” mostraban 75% y 79% respectivamente. Este aumento de la sensibilidad en la detección de ganglios metastásicos es debido a que no se depende del tamaño como criterio diagnóstico. Los factores que contribuyen a presentar falsos negativos en los resultados de los estudios son la necrosis ganglionar amplia y la hiperglucemia o hiperinsulinemia. La especificidad se ve limitada en pacientes con infección o inflamación, problema variable que se puede resolver con una historia clínica de cirugía reciente, estados hiperinmunes o coexistencia de otra enfermedad (Leoncini et al., 2014a).

Una ventaja significativa se ve reflejada en la detección de metástasis a distancia y tumores primarios sincrónicos, que presentan una incidencia del 5- 10% de los casos. Dentro de las localizaciones más frecuentes de tumores primarios sincrónicos son otros de cabeza y cuello, esófago y pulmón (Figura 7). La PET-TC es una técnica útil para la detección de estas lesiones con un alto valor predictivo negativo y menor valor predictivo positivo (Burkill et al., 2016). En un metaanálisis la PET-TC tuvo una sensibilidad del 88% (Intervalo de confianza del 95% 82,7-92,8%) y especificidad del 95,1% (Intervalo de confianza del 95% 93,6-96,3%) para detectar metástasis a distancia o tumores primarios sincrónicos (Leoncini et al., 2014a).



Figura 7. a) PET-TC de carcinoma primario de pulmón. b) PET-TC con FDG de carcinoma escamocelular de nasofaringe.

En el rango de 2%- 7% de los casos, el primer síntoma de un tumor de cabeza y cuello es un ganglio cervical metastásico, sin primario identificado después de una adecuada valoración del paciente con nasofibrolaringoscopia e imágenes radiológicas “anatómicas”. El uso de la PET-TC para la detección de primarios de origen desconocido cada vez es más relevante. Los tumores de pequeño tamaño, bajo consumo de glucosa o regiones hipermetabólicas cercanas pueden hacer que este estudio no sea ideal ni de elección para la identificación del tumor primario. Por esta razón, la identificación de tumores primarios por PET-TC se debe acompañar de una nueva valoración completa con nasofibrolaringoscopia y biopsia de la lesión (Wong et al., 2012).

La PET-TC es útil a la hora de evaluar la respuesta después del tratamiento con radio - quimioterapia (RT/QT), incluso llegando a identificar la remisión completa del tumor. Un metaanálisis mostró la sensibilidad y especificidad de la PET-TC para detectar lesiones residuales o recurrentes en cabeza y cuello después del tratamiento con RT/QT, siendo

94% (95% intervalo de confianza 87 - 97%) y 82% (95% intervalo de confianza 76 - 86%) respectivamente. De igual manera, se determinó un valor predictivo negativo de 95% (95% intervalo de confianza 92 - 97%) y valor predictivo positivo de 75% (95% intervalo de confianza 68 - 82%) (Burkill et al., 2016; Isles et al., 2008). La indicación de realizar PET-TC para seguimiento es de 2-3 meses después de terminar el tratamiento con RT/QT. Aquellos que se realizan en un periodo menor pierden exactitud (Isles et al., 2008).

Resonancia Magnética Funcional

La resonancia magnética ponderada en difusión visualiza la difusión del agua en los espacios extracelular, intracelular e intravascular del tumor. Muchos tumores malignos muestran una restricción en la difusión del agua que los tejidos normales o tumores benignos, llevando a una mayor intensidad en la señal en los valores B altos y menor intensidad de señal en los mapas de coeficiencia de difusión aparente (ADC). EL grado de restricción a la difusión es inversamente proporcional a la celularidad tisular y a la integridad de las membranas. Los procesos que causan aumento en la restricción de la difusión y disminución de ADC son los canceres con alta celularidad, células inflamatorias, fluidos proteínicos, fibrosis, viscosidad aumentada. Los procesos que causan disminución en la restricción de la difusión y aumento de ADC son los cenceres de baja celularidad, contenido estromal alto, queratina, tejidos mixomatosos, necrosis, quistes, edema y perfusión en la microcirculación (Dai & King, 2018) (Figura 8).

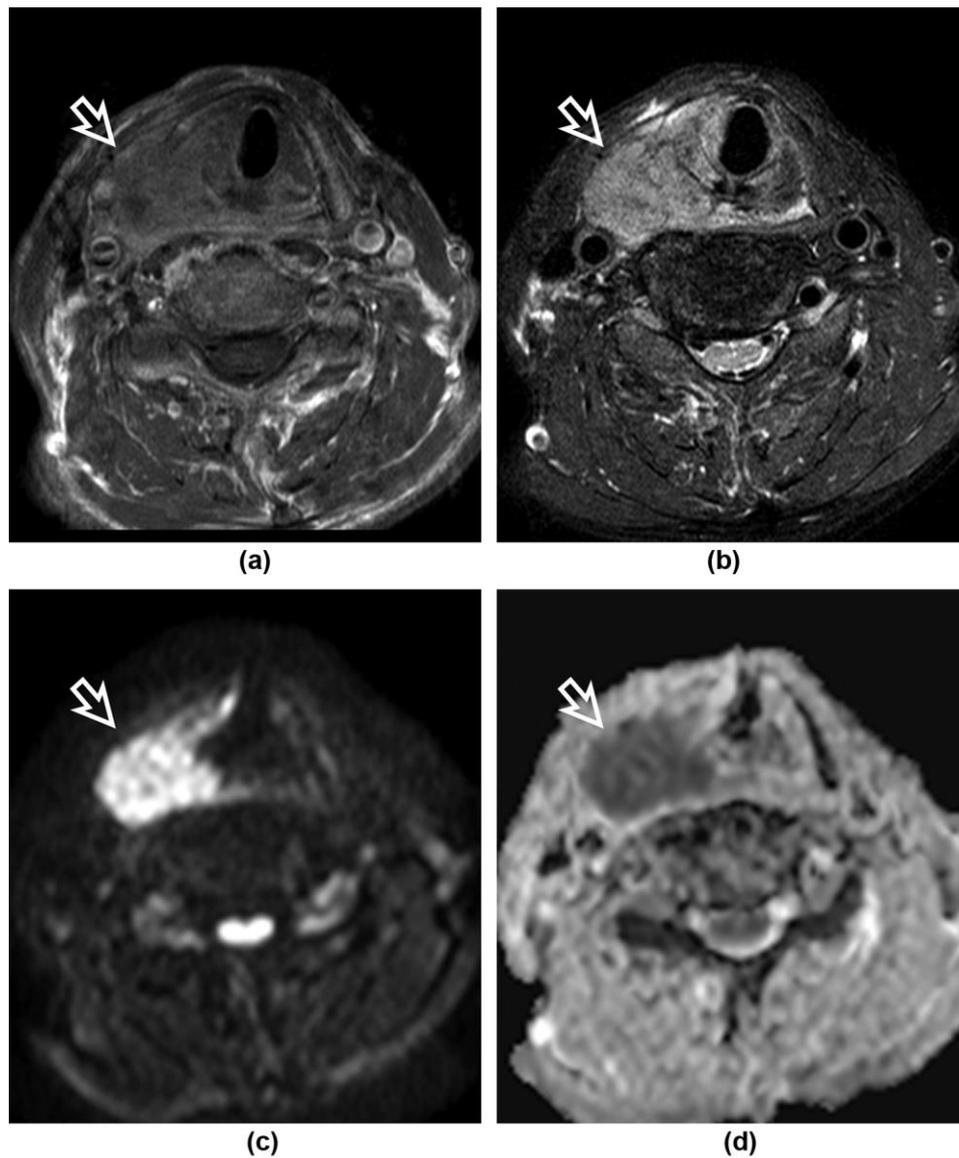


Figura 8. Resonancia magnética ponderada en difusión. a) Imagen de T1 ponderado post-contraste. b) Imagen de T2 ponderado. c) Valor B. d) Mapa ADC. El tumor muestra restricción en la difusión con señal de intensidad alta en valores B y de baja intensidad en el mapa ADC comparado con el tejido adyacente (Dai & King, 2018).

Resonancia Magnética Mejorada con Contraste Dinámico

Este tipo de RM obtiene imágenes de secuencias rápidas del tumor antes, durante y después del contraste intravenoso mediante bolos y evalúa el promedio del paso de ese contraste entre el compartimiento intravascular y el espacio extracelular extravascular (EEE) del tumor (Burkill et al., 2016).

En cabeza y cuello la imagen rápida ponderada en T1 tiende a usarse para analizar los cambios de relajación relacionados con la fuga de gadolinio dentro y fuera del espacio extravascular extracelular. El análisis de la RM mejorada con contraste dinámico puede ser semicuantitativo utilizando curvas de intensidad de tiempo para mostrar parámetros que reflejan el lavado de entrada y salida del medio de contraste. El análisis también puede ser cuantitativo ajustando la concentración de gadolinio tisular y la función de entrada arterial a un modelo cinético de dos compartimentos para producir parámetros como K_{trans} (función de transferencia del plasma al EEE), K_{ep} (función de transferencia del EEE al plasma) y V_e (volumen del EEE por unidad de volumen de tejido). Esta técnica ha sido más lenta para implementar en los protocolos clínicos de rutina en parte debido a problemas técnicos como la confiabilidad de la función de entrada arterial y la gran cantidad de parámetros potenciales para la investigación (Dai & King, 2018).

Finalmente, el estudio radiológico es necesario para evaluar la resecabilidad de los tumores de laringe, exponiendo que tumores alcanzan la extensión extra laríngea y definiéndose como no resecables. El protocolo de estudio de extensión para todos los pacientes con carcinoma de la laringe debe incluir un estudio radiológico, excepto, los pacientes con carcinoma incipiente en el plano glótico, en los que se visualiza el tumor

limitado a la porción membranosa de la cuerda vocal, sin alcanzar la comisura anterior (Rovira et al., 2011).

Clasificación del cáncer de laringe

The American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha creado la clasificación de TNM para diferenciar los estadios de la enfermedad, y basar en esto muchos de los tratamientos y pronóstico de la patología. Los estados precoces (I y II) hacen referencia a tumores de pequeño tamaño sin amplia invasión de ganglios linfáticos. Por otro lado, los estados tardíos (III y IV) se caracterizan por ser tumores localmente avanzados con invasión a estructuras circundantes o con una invasión linfática más numerosa, con metástasis a distancia, que define clínicamente el estado IV. EL cáncer orofaríngeo presenta una clasificación diferente dependiendo de la positividad del HPV o expresión de p16, que actúa como marcador sustituto para el primero. (Snow, 2020)

Tumor primario (T)

La clasificación del cáncer de laringe difiere según la localización del tumor.

Supraglotis

Se extiende desde la punta de la epiglotis a la unión entre el epitelio respiratorio y escamoso en el suelo del ventrículo laríngeo (zona superior de la cuerda vocal). La clasificación de la AJCC se basa en su extensión dentro de esta zona (Tabla 1)

T (Tumor primario)	Extensión
TX	Tumor primario que no puede ser evaluado.

T (Tumor primario)	Extensión
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor limitado a un subsitio de la supraglotis, pero con movilidad normal de las cuerdas vocales.
T2	El tumor invade la mucosa de más de un subsitio adyacente de supraglotis o glotis o región fuera de la supraglotis, por ejemplo: mucosa de vallecúla, base de lengua, pared medial del seno piriforme. No presenta fijación de la laringe.
T3	Tumor limitado a la laringe acompañado de fijación de las cuerdas vocales y/o invade cualquiera de las siguientes áreas: área postcricoidea, espacio preepliglótico, espacio paraglótico y/o corteza interna del cartílago tiroideo.
T4	<p>Tumor moderadamente avanzado o muy avanzado.</p> <p>T4a: Enfermedad local moderadamente avanzada.</p> <p>El tumor invade a través de la corteza externa del cartílago tiroideo y/o invade tejidos más allá de la laringe, por ejemplo: tráquea, tejidos blandos del cuello, músculos extrínsecos profundos de la lengua, glándula tiroidea o esófago.</p>

T (Tumor primario)	Extensión
	T4b: Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade espacio prevertebral, recubre la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.

Tabla 1. Clasificación TNM de la AJCC para la localización del tumor en supraglotis.

Glottis

Se define como el espacio limitado por la comisura anterior, las cuerdas vocales verdaderas, y la comisura posterior. De igual manera la AJCC clasifica el tumor primario según la extensión (Tabla 2).

T (Tumor primario)	Extensión
TX	Tumor primario que no puede ser evaluado.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor limitado a las cuerdas vocales con movilidad normal. Puede involucrar comisura anterior o posterior. T1a: Tumor limitado a una cuerda vocal. T1b: Tumor que involucra ambas cuerdas vocales.
T2	Tumor que se extiende a la supraglotis y/o subglottis, asociado a alteración de la movilidad de las cuerdas vocales.

T (Tumor primario)	Extensión
T3	Tumor limitado a la laringe con fijación de las cuerdas vocales y/o invasión del espacio paraglótico y/o corteza interna del cartílago tiroideo.
T4	<p>Tumor moderadamente avanzado o muy avanzado.</p> <p>T4a: Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor invade a través de la corteza externa del cartílago tiroides y/o invade tejidos más allá de la laringe, por ejemplo: tráquea, tejidos blandos del cuello, músculos extrínsecos profundos de la lengua, glándula tiroides o esófago.</p> <p>T4b: Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade espacio prevertebral, recubre la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.</p>

Tabla 2. Clasificación TNM de la AJCC para la localización del tumor en glotis.

Subglotis

Esta delimitado desde la unión del epitelio escamoso y respiratorio en la superficie de la cuerda vocal (5mm por debajo del borde libre de la cuerda vocal verdadera) al borde inferior del cartílago cricoides. La Tabla 3 muestra su clasificación según la AJCC.

T (Tumor primario)	Extensión
TX	Tumor primario que no puede ser evaluado.
Tis	Carcinoma in situ.
T1	Tumor limitado a la subglotis.
T2	Tumor que se extiende a una o ambas cuerdas vocales con movilidad conservada o deficiente.
T3	Tumor limitado a la laringe con fijación de las cuerdas vocales y/o invasión del espacio paraglótico y/o corteza interna del cartílago tiroideo.
T4	<p>Tumor moderadamente avanzado o muy avanzado.</p> <p>T4a: Enfermedad local moderadamente avanzada. El tumor invade a través de la corteza externa del cartílago tiroideo y/o invade tejidos más allá de la laringe, por ejemplo: tráquea, tejidos blandos del cuello, músculos extrínsecos profundos de la lengua, glándula tiroidea o esófago.</p> <p>T4b: Enfermedad local muy avanzada. El tumor invade espacio prevertebral, recubre la arteria carótida o invade estructuras mediastínicas.</p>

Tabla 3. Clasificación TNM de la AJCC para la localización del tumor en subglotis.

Ganglios Linfáticos Regionales (N)

La región de la cabeza y cuello contiene el 30 % de todos los ganglios linfáticos del cuerpo. Se han propuesto varias formas de esquematizar la compleja anatomía de los linfáticos del cuello por las diferentes escuelas clásicas de anatomía. Las diferencias que ofrecen las diferentes clasificaciones no son banales, dada la importancia que en nuestra especialidad tiene la cirugía y el comportamiento oncológico de los ganglios cervicales.

Esta descripción de la red linfática del cuello reparte los ganglios de la cabeza y el cuello en seis grupos. Comprende una red superficial que drena la piel de cabeza y cuello, y otra profunda que drena la mucosa de la vía aerodigestiva superior, laringe y tiroides. El sistema linfático de cabeza y cuello se agrupa en grupos linfáticos ganglionares:

- Círculo ganglionar pericervical.
- Cadena yugular anterior.
- Cadena yugular externa.
- Grupo lateral profundo del cuello.
- Grupo cervical profundo yuxtavisceral.

Según la afectación de cada uno de los grupos linfáticos ganglionares y del tamaño de los mismos la AJCC ha clasificado en 2 grandes grupos según el diagnóstico clínico y por anatomía patológica, juntos con 5 subgrupos en cada uno de ellos, como se puede ver la Tabla 4 y 5.

Clínica (cN)	Extensión
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N0	No existe metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral al tumor, de 3 cm o menos y ENE (-).
N2	<p>N2a: Metástasis en un solo nodo ipsilateral > 3 cm < 6 cm y ENE (-).</p> <p>N2b: Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, todos < 6 cm y ENE (-).</p> <p>N2c: Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, todos < 6 cm y ENE (-).</p>
N3	<p>N3a: Metástasis en un ganglio linfático > 6 cm y ENE (-).</p> <p>N3b: Metástasis en cualquier ganglio linfático con ENE (+) clínicamente.</p>

Tabla 4. Clasificación TNM de la AJCC para ganglios linfáticos cervicales de acuerdo a la clínica.

Patológico (pN)	Extensión
Nx	Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N0	No existe metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
N1	Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral al tumor, de 3 cm o menos y ENE (-).
N2	<p>N2a: Metástasis en un ganglio linfático ipsilateral al tumor, de 3 cm o menos y ENE (+), o metástasis en un solo nodo ipsilateral > 3 cm < 6 cm y ENE (-).</p> <p>N2b: Metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, todos < 6 cm y ENE (-).</p> <p>N2c: Metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, todos < 6 cm y ENE (-).</p>
N3	<p>N3a: Metástasis en un ganglio linfático > 6 cm y ENE (-).</p> <p>N3b: Metástasis de un ganglio linfático ipsilateral > 3 cm y ENE (+); o metástasis a múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, contralaterales o bilaterales, cualquiera con ENE (+); o un solo ganglio contralateral de cualquier tamaño y ENE (+).</p>

Tabla 5. Clasificación TNM de la AJCC para ganglios linfáticos cervicales de acuerdo con el resultado de la anatomía patológica.

Metástasis a Distancia (M)

Se considera metástasis cuando existe diseminación de células cancerosas desde el lugar donde se formó el cáncer por primera vez hasta otra parte del cuerpo. La metástasis se presenta cuando las células cancerosas se desprenden del tumor original (primario), viajan por el cuerpo a través de la sangre o el sistema linfático y forman un tumor nuevo en otros órganos o tejidos. El nuevo tumor metastásico es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario (Tabla 6).

Metástasis	Extensión
M0	No existe metástasis a distancia.
M1	Existe metástasis a distancia.

Tabla 6. Clasificación TNM de la AJCC para la presencia de metástasis a distancia.

Estadificación del Cáncer Laríngeo

La estadificación define la extensión del cáncer, teniendo en cuenta por ejemplo el tamaño del tumor y si se diseminó. Tener clara la estadificación del cáncer ayuda a entender la gravedad de este y las probabilidades de supervivencia, planificar el mejor tratamiento e identificar estudios clínicos que podrían ser opciones de tratamiento. La

estadificación del cáncer de laringe dada por la American Cancer Society (ACS) según su localización se muestra en las Tablas 7, 8 y 9.

El cáncer siempre lleva el nombre del estadio en el momento del diagnóstico, aunque luego empeore o se disemine. La información sobre los cambios en el cáncer que ocurren con el tiempo se añade a la estadificación inicial. Es decir, aunque cambie el cáncer, el estadio no cambia.

Supraglótico

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
0	Tis N0 M0	El tumor está presente en la capa superficial de las células que recubren la laringe y no han crecido hacia profundidad. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
I	T1 N0 M0	<p>El tumor ha crecido más profundamente, se encuentra solo en una región de la supraglotis y las cuerdas vocales se mueven normalmente.</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
	T2 N0 M0	<p>El tumor ha crecido más profundamente, se ha extendido a más de una región de supraglotis y/o glotis y las cuerdas vocales aún se mueven normalmente.</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
III	T3 N0 M0	<p>El tumor ha crecido solo en la laringe, sin embargo, ha hecho que alguna cuerda vocal deje de moverse, o el tumor ha crecido en alguna área adyacente como área post-cricoidea, espacio paraglótico, tejidos pre-epigloticos o la parte interna del cartílago tiroideo (T3).</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
	T1 a T3 N1	<p>El tumor podría haber crecido o no en estructuras justo afuera de la laringe, de igual manera, podría haber</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
	M0	<p>afectado la movilidad de una cuerda vocal. El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho.</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>
	T4a N0 o N1 M0	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la lengua o del cuello.</p> <p>Esta etapa también es conocida como Enfermedad local moderadamente avanzada.</p> <p>El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacente, o puede haberlo hecho, afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVA	T1-T4a N2 M0	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la lengua o del cuello. De igual manera, podría haber afectado una cuerda vocal.</p> <p>El tumor es N2:</p> <p>El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, midiendo más de 3 cm, pero menos de 6 cm.</p> <p>El tumor ha afectado más de un ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo ninguno de estos más de 6 cm de ancho.</p> <p>El tumor ha afectado al menos un ganglio linfático contralateral al tumor, ninguno de los cuales mide más de 6 cm de ancho.</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVB	T4b Cualquier N M0	<p>El tumor ha crecido en la zona frente a la columna vertebral a nivel cervical, alrededor de la arteria carótida o hacia abajo en el espacio entre los pulmones.</p> <p>Esta etapa se conoce también como Enfermedad local muy avanzada.</p> <p>El tumor puede haberse diseminado a ganglios linfáticos adyacentes, sin invadir regiones distantes del cuerpo.</p>
	Cualquier T N3 M0	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p> <p>El cáncer ha infiltrado, al menos, un ganglio linfático que mide más de 6 cm o ha infiltrado un ganglio linfático y luego ha crecido fuera del mismo. No se ha propagado a partes distales del cuerpo.</p>
IVC	Cualquier T Cualquier N M1	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
		El cáncer puede haber infiltrado a los ganglios linfáticos adyacentes. El tumor se ha diseminado a partes distantes del cuerpo.

Tabla 7. Clasificación del estadiaje del cáncer de laringe a nivel de supraglotis según la ACS.

Glótico

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
0	Tis N0 M0	El tumor está presente en la capa superficial de las células que recubren la laringe y no han crecido hacia profundidad. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).
	T1 N0 M0	El tumor ha crecido más profundamente, se encuentra solo en las cuerdas vocales, y estas se mueven normalmente.

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
I		En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).
II	T2 N0 M0	<p>El tumor ha crecido en la supraglotis o subglotis y/o las cuerdas vocales no se mueven con normalidad (paresia).</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
	T3 N0 M0	<p>El tumor ha crecido solo en la laringe, sin embargo, ha hecho que alguna cuerda vocal deje de moverse, o el tumor ha crecido en alguna área adyacente como área post-cricoidea, espacio paraglótico, tejidos pre-epiglóticos o la parte interna del cartílago tiroideo (T3).</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
	T1 a T3 N1 M0	<p>El tumor podría haber crecido o no en estructuras justo afuera de la laringe, de igual manera, podría haber afectado la movilidad de una cuerda vocal.</p> <p>El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho. En</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
III		<p>esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>
	<p>T4a</p> <p>N0 o N1</p> <p>M0</p>	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la lengua o del cuello.</p> <p>Esta etapa también es conocida como Enfermedad local moderadamente avanzada.</p> <p>El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacente, o puede haberlo hecho, afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>
	<p>T1-T4a</p> <p>N2</p> <p>M0</p>	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVA		<p>lengua o del cuello. De igual manera, podría haber afectado una cuerda vocal.</p> <p>El tumor es N2:</p> <p>El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, midiendo más de 3 cm, pero menos de 6 cm.</p> <p>El tumor ha afectado más de un ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo ninguno de estos más de 6 cm de ancho.</p> <p>El tumor ha afectado al menos un ganglio linfático contralateral al tumor, ninguno de los cuales mide más de 6 cm de ancho.</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVB	T4b Cualquier N M0	<p>El tumor ha crecido en la zona frente a la columna vertebral a nivel cervical, alrededor de la arteria carótida o hacia abajo en el espacio entre los pulmones.</p> <p>Esta etapa se conoce también como Enfermedad local muy avanzada.</p> <p>El tumor puede haberse diseminado a ganglios linfáticos adyacentes, sin invadir regiones distantes del cuerpo.</p>
	Cualquier T N3 M0	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p> <p>El cáncer ha infiltrado, al menos, un ganglio linfático que mide más de 6 cm o ha infiltrado un ganglio linfático y luego ha crecido fuera del mismo. No se ha propagado a partes distales del cuerpo.</p>
IVC	Cualquier T Cualquier N M1	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
		El cáncer puede haber infiltrado a los ganglios linfáticos adyacentes. El tumor se ha diseminado a partes distantes del cuerpo.

Tabla 8. Clasificación del estadiaje del cáncer de laringe a nivel de glotis según la ACS.

Subglótico

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
0	Tis N0 M0	El tumor está presente en la capa superficial de las células que recubren la laringe y no han crecido hacia profundidad. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).
I	T1 N0 M0	El tumor ha crecido más profundamente, se encuentra solo la subglotis. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
II	T2 N0 M0	<p>El tumor ha crecido hacia las cuerdas vocales, las cuales puede o no moverse con normalidad (paresia).</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
	T3 N0 M0	<p>El tumor ha crecido solo en la laringe, sin embargo, ha hecho que alguna cuerda vocal deje de moverse, o el tumor ha crecido en alguna área adyacente como área post-cricoidea, espacio paraglótico, tejidos pre-epiglóticos o la parte interna del cartílago tiroideo (T3).</p> <p>En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a ganglios linfáticos locales (N0) o partes distantes del cuerpo (M0).</p>
III	T1 a T3 N1 M0	<p>El tumor podría haber crecido o no en estructuras justo afuera de la laringe, de igual manera, podría haber afectado la movilidad de una cuerda vocal.</p> <p>El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho. En</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
		<p>esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>
	<p>T4a N0 o N1 M0</p>	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la lengua o del cuello.</p> <p>Esta etapa también es conocida como Enfermedad local moderadamente avanzada.</p> <p>El cáncer no se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacente, o puede haberlo hecho, afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo este mas de 3 centímetros (cm) de ancho. En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>
	<p>T1-T4a N2 M0</p>	<p>El tumor ha crecido a través del cartílago tiroideo y/o se ha extendido a tejidos más allá de la laringe como glándula tiroides, tráquea, esófago, músculos de la</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVA		<p data-bbox="619 327 1356 439">lengua o del cuello. De igual manera, podría haber afectado una cuerda vocal.</p> <p data-bbox="619 544 823 577">El tumor es N2:</p> <p data-bbox="619 683 1356 873">El tumor puede haber afectado un solo ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, midiendo más de 3 cm, pero menos de 6 cm.</p> <p data-bbox="619 978 1356 1169">El tumor ha afectado más de un ganglio linfático cervical ipsilateral a donde se encuentra el tumor, no midiendo ninguno de estos más de 6 cm de ancho.</p> <p data-bbox="619 1274 1356 1464">El tumor ha afectado al menos un ganglio linfático contralateral al tumor, ninguno de los cuales mide más de 6 cm de ancho.</p> <p data-bbox="619 1570 1356 1682">En esta etapa el tumor aún no se ha propagado a regiones distantes del cuerpo (M0).</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
IVB	T4b Cualquier N M0	<p>El tumor ha crecido en la zona frente a la columna vertebral a nivel cervical, alrededor de la arteria carótida o hacia abajo en el espacio entre los pulmones.</p> <p>Esta etapa se conoce también como Enfermedad local muy avanzada.</p> <p>El tumor puede haberse diseminado a ganglios linfáticos adyacentes, sin invadir regiones distantes del cuerpo.</p>
	Cualquier T N3 M0	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p> <p>El cáncer ha infiltrado, al menos, un ganglio linfático que mide más de 6 cm o ha infiltrado un ganglio linfático y luego ha crecido fuera del mismo. No se ha propagado a partes distales del cuerpo.</p>
IVC	Cualquier T Cualquier N M1	<p>El tumor puede haber crecido a estructuras fuera de la laringe y podría haber afectado a una cuerda vocal.</p>

ESTADIO	TNM	SIGNIFICADO
		El cáncer puede haber infiltrado a los ganglios linfáticos adyacentes. El tumor se ha diseminado a partes distantes del cuerpo.

Tabla 9. Clasificación del estadiaje del cáncer de laringe a nivel de subglotis según la ACS.

Tratamiento

El tratamiento del cáncer de laringe se basa en el estadio tumoral respaldado en el sistema TNM, la región anatómica afectada, la experiencia del centro hospitalario y la preferencia del paciente. La evaluación multidisciplinar de los pacientes es fundamental en el momento de escoger el tratamiento adecuado. Siempre se debe tener en cuenta que los principales objetivos del tratamiento son la resección o resolución del tumor con la menos morbilidad posible, la preservación y/o restauración de la función del órgano, y la mejoría en la calidad de vida del paciente (Gil & Fliss, 2009).

Aproximadamente el 30 – 40% de los pacientes se diagnostican en estados precoces, tumores localizados sin metástasis ganglionares ni a distancia, Tis, T1a, T1b, 2N0M0 (Snow, 2020). La cirugía robótica para cáncer orofaríngeo y la cirugía microscópica laser para otras localizaciones son el pilar del tratamiento, siendo equivalente a la radioterapia, ambas con intención curativa, con una tasa de control local del 80 – 100%, sin embargo,

el tratamiento inicial con cirugía deja abierta la puerta para otros tratamientos en caso de recurrencias (Fernández-Fernández et al., 2016). Cuando se quiere realizar una cirugía conservadora en estadio precoz de la enfermedad se debe tener dos principios básicos: preservar el cartílago cricoides para mantener la integridad, y preservar un complejo crico-aritenoideo (aritenoides, cricoides y complejo neuromuscular correspondiente) para mantener la seguridad de la vía aérea (Brizel et al., 2018; Steuer et al., 2017).

Las técnicas quirúrgicas utilizadas en el manejo de los tumores de laringe e hipofaringe han evolucionado en las últimas 3 décadas con la creciente aplicación de la cirugía transoral. Las cirugías parciales abiertas ahora rara vez están indicados. La microcirugía transoral con láser de CO₂ es la técnica endoscópica más común, pero también se ha utilizado la cirugía transoral robótica (TORS) para lesiones glóticas y supraglóticas. La cirugía de conservación transoral es útil para tumores T1, T2 y T3 y T4 altamente seleccionados (Baird et al., 2018; McMullen & Smith, 2015).

Las técnicas transorales tienen muchos beneficios sobre los procedimientos laríngeos conservadores abiertos y la RT. Algunos de los beneficios de la microcirugía transoral con láser de CO₂ se basan en que reduce significativamente la necesidad de traqueotomía, la colocación de un tubo de alimentación, la duración de la estancia hospitalaria y la tasa de fístulas faringocutáneas posoperatorias en comparación con la resección abierta. Sin embargo, no en todos los pacientes es el abordaje de elección. Los pacientes que no son candidatos a esta técnica son los que presentan tumores con invasión de cartílago, grandes tumores que requieren una resección amplia que conlleva a aspiración,

compromiso aritenoides bilateral, difícil visualización intraoperatoria del tumor, extensión directa en los tejidos blandos del cuello, extensión a base de lengua, hipofaringe o subglotis y pacientes con pobre función pulmonar (McMullen & Smith, 2015).

Cirugía Transoral

La cirugía transoral de tumores de glotis usualmente presentan muy buenos resultados oncológicos y funcionales para los cánceres de glotis Tis, T1 y T2 (Figura 9). Los estudios muestran cada vez más que, en manos experimentadas, los resultados de esta técnica son comparables con la radioterapia, de hecho, pueden ser superiores, con el beneficio adicional de la capacidad de reservar la radioterapia para la enfermedad locorregional recurrente. La calidad vocal después de la resección con láser se ha visto que no es diferente al resultado con el tratamiento de radioterapia. Se pueden implementar diferentes técnicas dentro de la cirugía con láser CO₂, dependiente de la necesidad de resección se pueden realizar cordectomías más o menos amplias, como lo detalla la Tabla 10. (Han & Sumer, 2021).

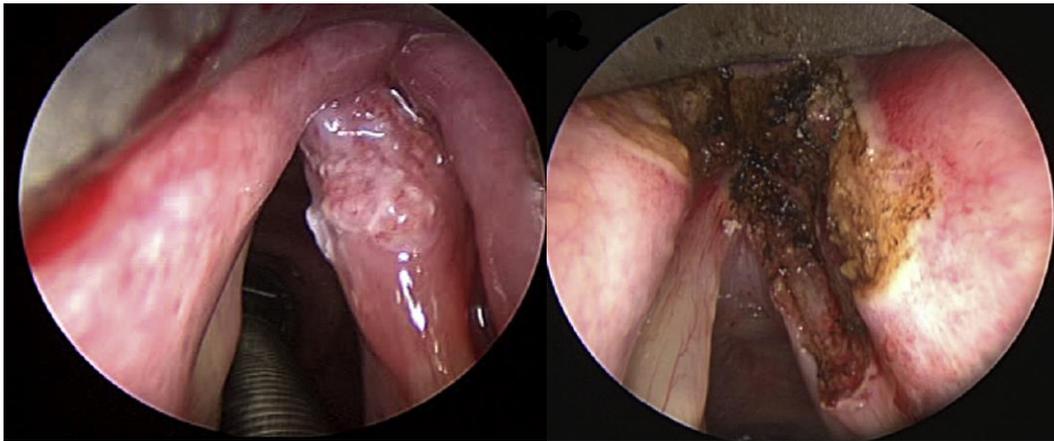


Figura 9. a) Tumor T1 glótico. b) Resección transoral con láser CO₂.

Tipo	Procedimiento	Detalles
I	Corpectomía subepitelial	Resección del epitelio de la cuerda vocal, a través de la capa superficial de la lámina propia.
II	Corpectomía subligamentaria	Resección del epitelio, espacio de Reinke y ligamento vocal.
III	Corpectomía transmuscular	Resección del epitelio, lamina propia y parte del musculo vocal.
IV	Corpectomía total o completa	Resección de la cuerda vocal desde el proceso vocal hasta la comisura anterior y el pericondrio interno del cartílago tiroides.
Va	Corpectomía extendida a la cuerda vocal contralateral	Tipo IV + un segmento de la cuerda vocal contralateral a lo largo del cartílago a la altura de la comisura anterior, resecaando el

Tipo	Procedimiento	Detalles
		ligamento de Broyle.
Vb	Corpectomía extendida abarcando el aritenoides	En los casos donde el tumor infiltra el proceso vocal y un poco de aritenoides, la resección puede incluir el cartílago hasta la mucosa posterior del aritenoides.
Vc	Corpectomía extendida a ventrículo laríngeo	Para lesiones que se extienden al ventrículo o tumores transglóticos, la resección incluye la tipo IV, ventrículo laríngeo y ventrículo de Morgagni hasta toda la curva vocal en su porción inferior.
Vd	Corpectomía extendida a subglotis	Resección se extiende a 1 cm por debajo de la glotis con exposición del cartílago cricoides.

Tabla 10. Clasificación de corpectomías para la resección transoral de carcinomas glóticos de acuerdo con la Sociedad Europea de Laringología.

La Sociedad Europea de Laringología ha incluido una clasificación sistemática para la cirugía de laringectomía endoscópica supraglótica basada principalmente en la localización y la extensión de la resección (Tabla 11). El tratamiento adyuvante con radioterapia postoperatoria en la zona del tumor primario puede ser una alternativa, aunque se debe intentar evitar. Para los tumores supraglóticos la cirugía endoscópica con láser CO₂ ha mostrado unos resultados oncológicos con preservación de órgano mejor

que la radioterapia (Figura 10) (Baird et al., 2018; McMullen & Smith, 2015).

Tipo	Procedimiento	Detalles
I	Escisión limitada	Para lesiones pequeñas y superficiales
II	Resección del espacio pre-epiglótico	Resección de la mitad de la epiglotis supra hioidea (IIa) o epiglotectomía total (IIb) para lesiones en la cara laríngea de la epiglotis.
III	Laringectomía supraglótica + Resección del espacio pre-epiglótico	Resección de epiglotis y espacio pre-epiglótico a lo largo de la lámina interna del cartílago tiroides (IIIa). Para tumores de epiglotis infrahioidea se incluye el tejido superior del ventrículo laríngeo (IIIb).
IV	Laringectomía supraglótica lateral	Resección del repliegue ariteno-epiglótico, repliegue faríngeo-epiglótico, borde libre de la epiglotis con el aritenoides (IVb) o sin él (IVa).

Tabla 11. Clasificación de los procedimientos transorales para el carcinoma supraglótico según la Sociedad Europea de Laringología.

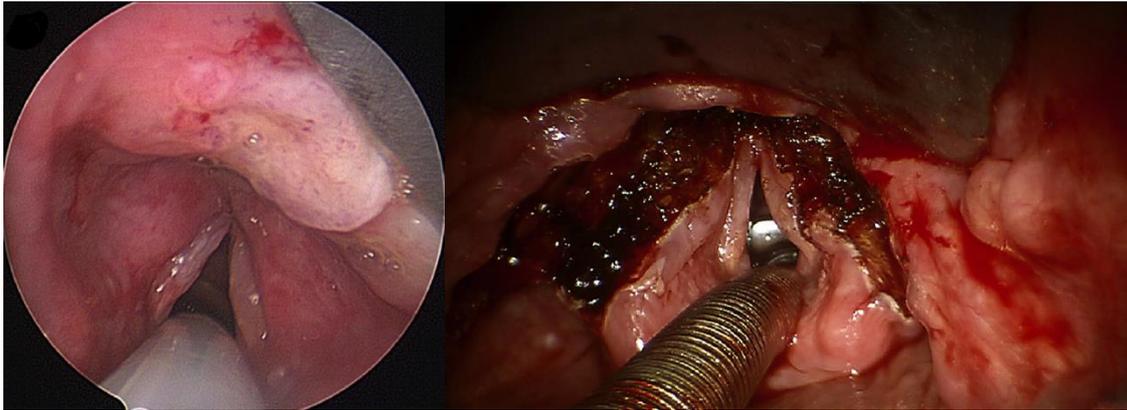


Figura 10. a) Tumoración supraglótica. b) Resección transoral con láser CO₂.

Se han aplicado técnicas transorales similares para seleccionar tumores de hipofaringe con resultados oncológicos y funcionales aceptables. Las lesiones limitadas del seno piriforme y de las paredes faríngeas son particularmente susceptibles de cirugía microscópica láser o TORS. No se deben realizar procedimientos de conservación para lesiones que involucren el vértice del seno piriforme profundo o que invadan el espacio retrocricoideo (Han & Sumer, 2021).

Cirugía abierta

La cirugía de conservación abierta para los tumores de laringe ha sido reemplazada en gran medida por técnicas transorales. Casi siempre se requiere una traqueotomía temporal y una sonda de alimentación para estos procedimientos. Las indicaciones y contraindicaciones de las cirugías abiertas de conservación de laringe son similares a las de las técnicas de conservación endoscópicas. Los procedimientos parciales abiertos se pueden considerar cuidadosamente como una alternativa a la radioterapia o la

laringectomía total en cánceres glóticos o supraglóticos seleccionados. Los procedimientos abiertos de preservación de órganos también son factibles para ciertos cánceres de hipofaringe a través de un abordaje de faringotomía suprahioidea, faringotomía lateral o laringectomía parcial supraglótica extendida (Han & Sumer, 2021).

Los tumores glóticos se pueden resear a través de laringofisura simple con cordectomía (Figura 11) o laringectomía parcial vertical (Figura 12), donde se aborda la endolaringe a través de una incisión vertical en la línea media en la comisura anterior.

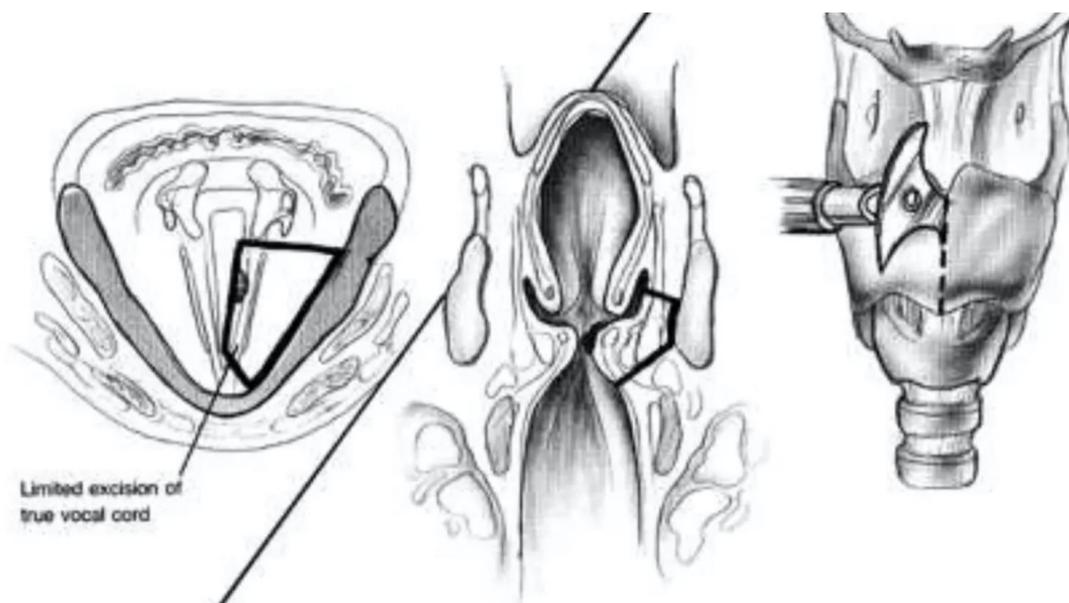


Figura 11. Cordectomía simple por laringofisura.

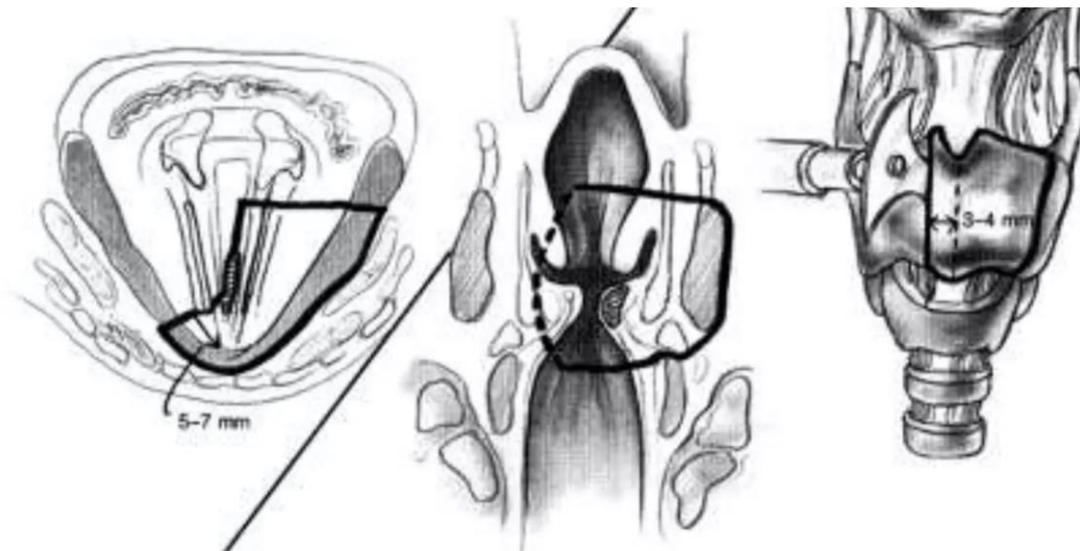


Figura 12. Laringectomía parcial vertical.

Para realiza la resección de un tumor supraglótico por medio de cirugía abierta se debe realizar una laringectomía parcial horizontal, para la cual se accede a la endolaringe a través de una incisión horizontal en el cartílago tiroides que permite la extirpación parcial de las estructuras supraglóticas (Figura 13) (Han & Sumer, 2021). Si el tumor tiene una extensión inferior significativa, se requiere una laringectomía supracricoidea. La laringectomía supracricoidea con crico-hioido-epiglotopexia (LSC-CHEP) está indicada en tumores supraglóticos y transglóticos más extensos. LSC-CHEP implica la resección de todo el cartílago tiroides y su contenido, la epiglotis, un complejo aritenoides, el espacio paraglótico y el espacio preepiglótico, dejando intactos el cricoides, el hioides y un complejo aritenoides (Figura 14) (McMullen & Smith, 2015).

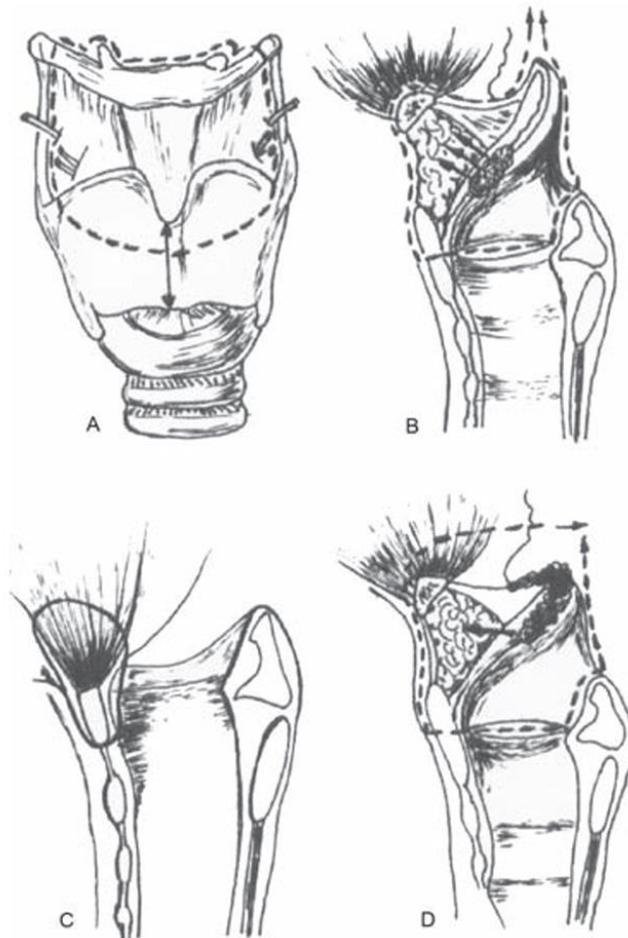


Figura 13. Laringectomía parcial horizontal

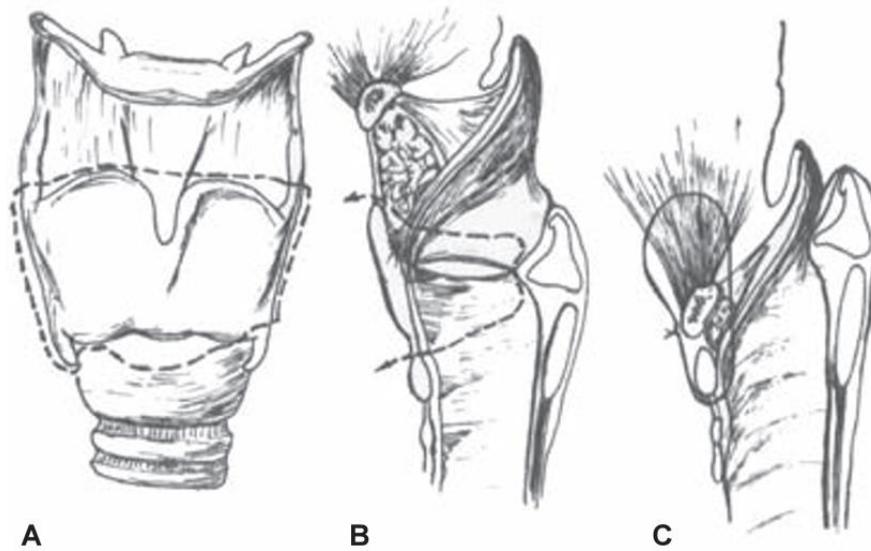


Figura 14. Laringectomía supracricoidea con crico-hioido-epiglotopexia

Las complicaciones de los procedimientos laríngeos parciales abiertos incluyen sangrado, infección, formación de fístulas faringocutáneas, disfonía grave, dependencia de traqueotomía y aspiración crónica. La disfagia severa y la aspiración ocurren en muchos pacientes.

La laringectomía total (LT) sigue siendo el pilar del tratamiento de los tumores laríngeos e hipofaríngeos avanzados. Después de la LT, la mayoría de los pacientes seguirán necesitando terapia adyuvante. La LT es apropiada para pacientes con aspiración grave, compromiso de las vías respiratorias, destrucción del cartílago tiroideos, diseminación extralaríngea, compromiso de la comisura posterior, compromiso del complejo aritenoides bilateral y extensión significativa superior o inferior que afecta la base de la lengua, la subglotis o el cartílago cricoides (Forastiere et al., 2018)(McMullen & Smith,

2015).

En estados localmente avanzados (T3-4N1-3M0) que se ven en el 60% de los pacientes al momento del diagnóstico, se debe emplear una combinación de radioquimioterapia (RT/QT) con cisplatino o bien RT/QT junto con laringectomía en casos muy avanzados que no permita la preservación de órgano (Brockstein et al., 2019; Koroulakis A, 2021; Snow, 2020).

Para la rehabilitación vocal, la punción traqueoesofágica para el habla traqueoesofágica a través de prótesis fonatoria se puede realizar en el momento de la cirugía primaria o como un procedimiento secundario. Otra opción es el tratamiento logopédico para la realización de erigmofonía.

Tratamiento del Cuello

El tratamiento cuello depende tanto de la localización del tumor primario como de la clasificación N según la afectación de los ganglios linfáticos. Esto es importante para el pronóstico y el tratamiento. El reporte de la tasa de falsos negativos en el intento de identificar presencia o ausencia de ganglios linfáticos metastásicos por medio de la palpación es del 20-51%. Existe evidencia amplia que incluso los procedimientos radiológicos más avanzados y sensibles pueden ser incapaces de mostrar micrometástasis del tumor en el tiempo preoperatorio. Debido a que los cambios de la infiltración del tumor en los ganglios pueden ser mínima, sin mostrar cambios en el tamaño, morfología macroscópica o consistencia. Incluso en el momento del estudio de

anatomía patológica donde se define un ganglio como libre de tumor, puede no estar libre de metástasis ocultas, esto debido a que se localiza en otro nivel del ganglio estudiado o raramente pasado por alto por el patólogo (Ferlito et al., 2000).

Los pacientes que presentan cuello clínicamente negativo precisan un tratamiento que se debe basar en el contexto del tamaño, lugar, fenotipo y plan de tratamiento para el tumor primario. El papel del tratamiento electivo del cuello está aún muy controvertido, dentro de esto se puede incluir la disección cervical, radioterapia, observación con posterior cirugía de rescate en caso de aparecer metástasis claras, o examen intraoperatorio del ganglio centinela con la resección inmediata en caso de ser positivo (Ferlito et al., 2000).

La cirugía cervical electiva se refiere a la resección de los ganglios linfáticos cervicales en ausencia de metástasis diagnosticada, por medio del vaciamiento cervical radical, modificado, selectivo (3 áreas cervicales) o limitado (no más de 2 áreas cervicales). La cirugía cervical electiva es recomendada en pacientes N0 con tumores supraglóticos T2 – T4, glóticos T3 – T4, subglóticos T3 – T4 y pacientes con recurrencia de tumor supraglótico o tumor avanzado de glotis tratado previamente con radioterapia y que precisen cirugía de rescate con laringectomía (Brockstein et al., 2019; Steuer et al., 2017).

Un tratamiento alternativo a la cirugía cervical electiva o coadyuvante es la radioterapia. Irradiación primaria para el tratamiento electivo del cuello ha demostrado una efectividad similar al tratamiento quirúrgico. La disección electiva del cuello proporciona

información importante con fines pronósticos y decisiones terapéuticas, al establecer la presencia, el número, la ubicación y la naturaleza de las metástasis ocultas en los ganglios linfáticos. Sin embargo, el uso de irradiación primaria para tratar a estos pacientes hace que sea imposible establecer si hubo metástasis en los ganglios linfáticos tratados y, por lo tanto, dificulta comparar la eficacia de la disección electiva del cuello versus la irradiación electiva del cuello. Otra desventaja de la irradiación es que el tratamiento quirúrgico conserva la capacidad de emplear radioterapia subsiguiente para segundos tumores primarios, que se desarrollan en el 11-19 % de los pacientes con cáncer de laringe, más a menudo dentro de los primeros 5 años después tratamiento (Ferlito et al., 2000).

Actualmente el vaciamiento cervical radical no está indicado cuando se trata de cirugía cervical electiva, a menos que el cirujano rechace el procedimiento o carezca de experiencia en su realización. El procedimiento de elección para la cirugía electiva es el vaciamiento cervical funcional que comprende los niveles II, III, IV (Figura 15) y conserva el músculo esternocleidomastoideo, la vena yugular interna, el nervio espinal accesorio y la glándula submandibular.

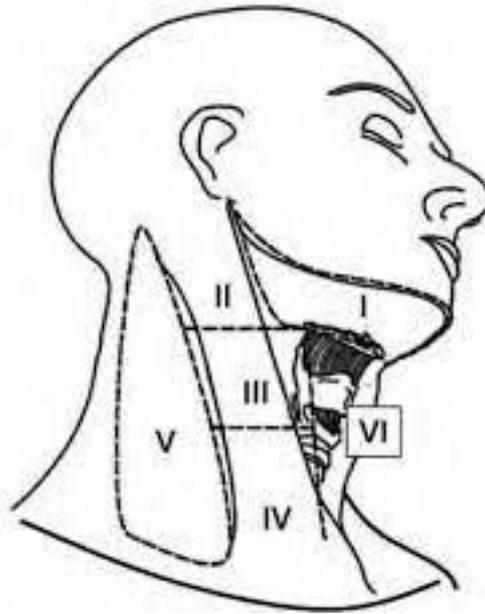


Figura 15. Áreas anatómicas del cuello.

Los pacientes que presentan ganglios positivos (N+) requieren de tratamiento definitivo, ya sea por disección cervical quirúrgica o tratamiento con RT/QT (Svider et al., 2017). El vaciamiento cervical radical, funcional o selectivo puede emplearse según la extensión y la ubicación de la enfermedad metastásica. La disección de los ganglios en el nivel VI es una característica importante de la disección del cuello para el tratamiento del tumor primario que puede metastatizar en esta región. Dado que el objetivo de la disección del cuello es extirpar toda la enfermedad ganglionar metastásica clínicamente evidente y los grupos ganglionares con mayor riesgo, pueden estar indicadas modificaciones conservadoras del vaciamiento cervical. Hay poca evidencia para apoyar la disección de rutina de los niveles I y V en el cáncer de laringe N1 porque la participación de los ganglios linfáticos en estos niveles es prácticamente inexistente (Ferlito et al., 2000).

El tratamiento adyuvante puede mejorar los resultados en el tratamiento de pacientes con enfermedad del cuello en etapa avanzada, independientemente del tipo de disección del cuello empleada. El valor de la radiación adyuvante en el posoperatorio para pacientes con cuello patológicamente positivo es controvertido. La diseminación extracapsular macroscópica de la enfermedad de los ganglios linfáticos cervicales es el factor pronóstico adverso independiente más significativo, y los pacientes con diseminación extracapsular en sus muestras de cuello tienen la incidencia más alta de recurrencia regional, así como de metástasis a distancia. La irradiación postoperatoria quizás sea mejor emplearla selectivamente en pacientes con diseminación extraganglionar de la enfermedad (Ferlito et al., 2000).

Pronóstico

Por último, el pronóstico del cáncer de laringe está determinado fundamentalmente por el estadio TNM, invasión linfática, invasión vascular, la edad y estado funcional del paciente. Los tumores asociados a VPH presentan un mejor pronóstico debido a la buena respuesta que presentan ante el tratamiento de RT/QT y el estado clínico de los pacientes que presentan menos comorbilidades asociadas (Gil & Fliss, 2009; Snow, 2020). La mayor parte de los tumores se diagnostican en estadios III y IV debido a la presentación tardía de síntomas y la rápida diseminación linfática en algunos de ellos que afectan desfavorablemente el pronóstico (Nocini et al., 2020). A pesar de no mejorar significativamente las cifras de supervivencia, el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas como la laringectomía total transoral ultrasónica (TL-TOUSS), ha permitido una disminución en la morbilidad de la cirugía y proporcionar una recuperación funcional

mayor (Fernández-Fernández et al., 2016). Los pacientes con tumores de cabeza y cuello tienen un riesgo del 4% de desarrollar un segundo tumor primario, incluso después de una remisión completa (Gil & Fliss, 2009).

Microbiota: Generalidades

La microbiota humano se define como la agrupación de microorganismos constituidos por bacterias, virus y demás eucariotas que se comportan como un órgano funcional en el ser humano y coexisten con el mismo. (Baquero & Nombela, 2012; H. Gong, Shi, et al., 2017; H. Gong, Wang, et al., 2017; H. L. Gong et al., 2013; Su, 2017; Zaura et al., 2009). Estos microorganismos colonizan de manera fisiológica formando una flora microbiana comensal, dentro de la que factores fisiológicos como la temperatura, presencia de nutrientes, humedad, entre otras; favorecen el desarrollo de una comunidad diferente dependiendo del ambiente en que se encuentre, díganse cavidad oral, respiratoria, gastrointestinal, piel, vaginal o urogenital (Su, 2017; Zaura et al., 2009). La formación de la microbiota se realiza durante los 3 primeros años de vida, evidenciado una gran variación interpersonal en la composición de las especies bacterianas que componen un hábitat. La estructura de las comunidades bacterianas puede variar significativamente entre los diferentes hábitats del cuerpo humano (Gonzalez et al., 2011).

Dentro de las funciones más características de la microbiota se encuentran la digestión de alimentos, síntesis de nutrientes y prevención de enfermedades, ya que junto con el sistema inmunológico, hace frente a patógenos externos (Su, 2017). El microbioma se considera como un genoma en constante interacción con el medio ambiente, por ello, una alteración en su composición o funcionamiento, también llamada disbiosis, cumple un papel fundamental en el estado de salud y enfermedad del organismo (Baquero & Nombela, 2012; Su, 2017). Se ha relacionado con enfermedades como intestino irritable,

autismo, obesidad o síndrome metabólico, desnutrición, depresión, enfermedades autoinmunes y enfermedades neurodegenerativas (Baquero & Nombela, 2012; H. Gong, Shi, et al., 2017; H. Gong, Wang, et al., 2017; Su, 2017; Zaura et al., 2009) A pesar de que cada vez es más evidente la implicación de la microbiota en determinadas enfermedades, no siempre se tiene la certeza de esta asociación (Zaura et al., 2009).

Así como lo hace el linaje humano con la replicación celular descendiente, vertical bien definida y específica, lo hace la microbiota humana en la transmisión del material genético de una generación a otra, pero de manera menos específica y más reproductiva, llevando por consiguiente a que se mantenga un núcleo común de microbiota con variaciones interpersonales en todas las generaciones dentro de una misma familia (Baquero & Nombela, 2012).

En estudios de microbiota con gemelos se evidencia que existe un grado general de similitud en la composición de la microbiota intestinal en gemelos monocigóticos y dicigóticos. Incluso, dentro de una misma familia se puede compartir grandes similitudes en la microbiota intestinal en comparación a personas que no son de la misma familia. A pesar de que existe un conjunto de genes de microbiota compartidos, los miembros de una familia no solo comparten este Core, sino también, comparten un grado mayor de similitud en los componentes variables cuando se comparan con personas sin relación entre ellas. Todo esto evidencia como existe un flujo de microbios y genes microbianos que se transmiten entre miembros de la misma familia y por generaciones en el mismo linaje. Este flujo se ve influenciado por la exposición temprana al medio ambiente como

el contacto físico dentro de la misma familia, dietas, incluso la leche materna. El hecho de que la variación intrapersonal en la composición de la comunidad microbiana dentro de un hábitat corporal sea sustancialmente menor que la variación interpersonal significa que cada individuo representa su mejor control para evaluar los efectos de diversas alteraciones/perturbaciones en la estructura y función de la microbiota, mientras que la familia proporciona los controles de referencia (Gonzalez et al., 2011).

Estudios de secuenciación del material genético han demostrado que el genoma de la microbiota es 150 veces mayor al genoma humano (Shi et al., 2017). El *Human Microbiome Project* realizó un gran análisis de la composición de los diferentes nichos de microbiota existentes en el cuerpo humano, identificando más de 1300 especies de bacterias diferentes (Gail A. Cresci, 2016).

Existe un número de bacterias “iniciales” como *Lactobacillus*, *Prevotella* o *Sneathia* que se adquieren normalmente en el canal del parto vaginal, y posiblemente algunas otras poblaciones pioneras se adquieren mediante la lactancia materna. Se puede pensar que algunos de estas colonias adquiridas en el principio de la vida pueden actuar como mediadores o inductores de otras familias bacterianas, y de igual manera, estas serlo para otras familias (Baquero & Nombela, 2012). Para realizar un adecuado diagnóstico y tratamiento de las enfermedades en su etapa más temprana es importante saber cuál es la microbiota comensal asociada al estado de salud de cada ecosistema (Zaura et al., 2009).

El cultivo bacteriano ha sido la base de la microbiología tradicional, permitiendo el aislamiento de microorganismos y su posterior identificación en base a las características morfológicas, bioquímicas y genéticas. El 99,8% de los microorganismos presentes en la naturaleza no se pueden cultivar mediante técnicas habituales por carecer de condiciones y métodos adecuados (Baquero & Nombela, 2012; Su, 2017).

En la actualidad, la era molecular ha permitido identificar microorganismos en base a su huella genética, gracias a la metagenómica, una aplicación de la biología molecular al estudio de comunidades bacterianas desde el punto de vista genómico, partiendo del ADN de las muestras sin necesidad de cultivarlas. Para determinar la microbiota de una muestra se inicia con el ADN que se extrae, se amplifica y secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal, presente en todas las bacterias existentes. La subunidad 16S del ARN ribosomal se considera la diana universal para la identificación bacteriana, por sus características que permiten la caracterización taxonómica de los microorganismos (S. Yuan et al., 2012).

Microbiota de Vía Aérea Superior

La vía aérea superior (VAS), comprendida entre narinas, fosas nasales, senos paranasales, nasofaringe, orofaringe y supraglotis, contiene una importante flora microbiana conocida como nichos ecológicos que varía según la localización. Las zonas que se consideran estériles son los senos paranasales, trompas de Eustaquio y el tracto respiratorio debajo del nivel de la laringe. Sin embargo, se ha encontrado relación entre la disbiosis de la microbiota con enfermedades alérgicas y asma bronquial (Su, 2017).

La evidencia de que las comunidades bacterianas de la VAS tienen un papel importante a la hora de permitir a los patógenos respiratorios asentarse e infectar en su mucosa y de esta manera diseminarse hasta el tracto respiratorio inferior es cada vez mayor. Para la mayoría de los patógenos respiratorios la colonización de la VAS es un primer paso necesario para la infección de vías altas, bajas y diseminación sistémica. La inhibición de este primer paso por la microbiota residente, llamado también “resistencia por colonización” puede ser un hallazgo de gran importancia para la prevención de infecciones respiratorias (Kumpitsch et al., 2019; Man et al., 2017).

Además de la relación simbiótica presente entre la VAS y las comunidades bacterianas que la habitan también es probable que la microbiota tenga un papel importante a la hora de la maduración estructural del tracto respiratorio y la formación de su inmunidad local (Man et al., 2017)

Como se ha explicado antes la transferencia de anticuerpos maternos y moléculas microbianas en el útero influye notablemente en el desarrollo inmunitario posnatal. Esto, a su vez, prepara al recién nacido para la exposición a microorganismos que ocurre después del nacimiento. Durante las primeras horas de vida se puede detectar una amplia gama de microorganismos en la VAS de los recién nacidos a término sanos. En un principio, estos microorganismos son inespecíficos y son de presunto origen materno. Durante la primera semana de vida, la diferenciación de nichos en la VAS conduce a una alta abundancia de *Staphylococcus spp.*, seguida del enriquecimiento de

Corynebacterium spp. y *Dolosigranulum spp.*, y el posterior predominio de *Moraxella spp.* Los perfiles de microbiota que se caracterizan por *Corynebacterium spp.* y *Dolosigranulum spp.* temprano en la vida, y *Moraxella spp.* a los 4–6 meses de edad, se ha demostrado que se correlacionan con una composición estable de la comunidad bacteriana y con la salud respiratoria (Man et al., 2017).

La cavidad nasal está revestida por diferentes tipos de epitelio, lo que proporciona diferentes micronichos: la parte anterior de la nariz comienza con un epitelio similar a la piel no queratinizado, cambiando a células epiteliales escamosas estratificadas sin microvellosidades, seguido por epitelio de transición con microvellosidades cortas, antes de la transición al meato medio con su epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Las narinas están más cerca del entorno externo y están revestidas con un epitelio escamoso queratinizado similar a la piel, que incluye glándulas serosas y sebáceas, lo que conduce al enriquecimiento de colonizadores lipofílicos de la piel, incluidos *Staphylococcus spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Corynebacterium spp.* Las bacterias que se encuentran con frecuencia en otros nichos respiratorios, como *Moraxella spp.*, *Dolosigranulum spp.* y *Streptococcus spp.*, también se han observado en el tercio anterior de las fosas nasales. La composición de las comunidades bacterianas en la nasofaringe es más diversa que en las partes anteriores y demuestra una superposición considerable con las fosas nasales anteriores. También contiene *Moraxella spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Corynebacterium spp.* Sin embargo, otras bacterias habitan más típicamente en el nicho nasofaríngeo, más notablemente *Dolosigranulum spp.*, *Haemophilus spp.* y *Streptococcus spp.* (Kumpitsch et al., 2019).

Los cambios en la conformación de la microbiota en la VAS se van dando con el transcurso del tiempo y la exposición de diferentes agentes como la lactancia materna, las estaciones, vacunación, relación con familiares, cuidado diario, exposición al humo del tabaco, infecciones o tratamientos antibióticos. Este último causa alteraciones que se caracterizan por una disminución de la abundancia de presuntas bacterias comensales beneficiosas, como *Dolosigranulum spp.* y *Corynebacterium spp.* en la VAS de niños. Esto, a su vez, podría aumentar el riesgo de infecciones del tracto respiratorio después del tratamiento con antibióticos (Kumpitsch et al., 2019; Man et al., 2017).

La microbiota de la VAS de los adultos difiere del de los niños, aunque las características del nicho parecen bastante similares. En comparación, la microbiota nasal de los niños es más densa (mayor carga bacteriana) pero menos diversa. Las fosas nasales anteriores de los adultos albergan principalmente *Actinobacteria*, *Firmicutes* y, en menor cantidad, *Bacteroidetes* anaerobios (Kumpitsch et al., 2019). La comparación de diferentes sitios de muestra de la cavidad nasal mostró que el meato medio (MM) y el receso esfenoidal (RE) son casi idénticos con respecto a la composición de la comunidad microbiana, mientras que las fosas nasales anteriores muestran una diversidad significativamente reducida de la misma. Además, las fosas nasales anteriores albergan una mayor proporción de *Firmicutes* y *Actinobacteria*, y menos *Proteobacteria* en comparación con el meato medio y el RE (Kumpitsch et al., 2019).

Además de las comunidades bacterianas identificadas en la VAS, también se ha detectado

un extenso número de patógenos virales. Se ha informado de una tasa de 67% de virus respiratorios en niños sanos y asintomáticos, incluidos el rinovirus humano, el bocavirus humano, los poliomavirus, el adenovirus y el coronavirus humanos. Sin embargo, los avances recientes en metagenómica han revelado que todo el viroma respiratorio contiene muchos otros virus (Man et al., 2017).

Microbiota de Cavidad Oral

La cavidad oral humana es colonizada por numerosos y diversos microorganismos comensales. Estas bacterias constituyen una comunidad microbiana compleja en las superficies intraorales que junto con la placa dental son las dos principales causas de enfermedades orales, caries dentales y periodontitis. El *Streptococcus* es la mayor causa de caries y la *Porphyromona gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola* son de la periodontitis. Esta última enfermedad se entiende también como una enfermedad polimicrobiana caracterizada por el crecimiento de ciertos organismos patógenos en los surcos de las encías. La periodontitis crónica se ha reportado como un factor de riesgo para lesiones premalignas orales y cáncer, al igual que el aumento en los cambios de la composición de la microbiota bacteriana y fúngica de la cavidad oral. (Schmidt et al., 2014) (Takeshita et al., 2016).

La saliva contiene las bacterias que se desprenden de las comunidades bacterianas que se encuentran en las superficies orales, incluyendo superficies dentales, surcos gingivales, paladar blando y duro, dorso de la lengua y mucosa bucal. Estas bacterias normalmente contenidas en la saliva no son responsables de patologías orales, sin

embargo, la transmisión de bacterias patológicas esta mediada por la dispersión de bacterias vía saliva (Takeshita et al., 2016; Zaura et al., 2009).

La cavidad oral está expuesta al ambiente exterior, por lo cual, las comunidades bacterianas son afectadas por factores externos como el tabaquismo y la higiene oral. Además de las condiciones sistémicas del huésped que también influyen en los cambios de la microbiota en la saliva. Basándonos en las conexiones que existen entre las enfermedades sistémicas del huésped, las microbiota salival puede considerarse un marcador prometedor del diagnóstico del estado de salud y enfermedad del ser humano (Takeshita et al., 2016).

La cavidad oral representa el 25% del microbiota humana. Según el “Human Oral Microbiome Database” se han identificado aproximadamente 700 especies procariotas presentes en la cavidad oral humana, sin embargo, en presencia de patología suelen disminuir de 600 a 160, desapareciendo sobre todo los más resistentes a los ácidos, lo que puede llevar a pensar que las especies que desaparecen actúan como factor protector de enfermedad. El surco gingival se considera un ecosistema parecido al colon, con una concentración bacteriana de hasta 10^{12} , donde los anaerobios representan el 99% de la población (Su, 2017)(Schmidt et al., 2014).

Cuando el balance simbiótico de la diversidad de microbiota presente en la cavidad oral del huésped se altera, estos mismos microorganismos se ven involucrados a la hora de causar patologías. Por ejemplo, en la lengua, donde se encuentran las criptas mucosas

que permiten la proliferación de microorganismos anaerobios pueden ser una causa de halitosis. Otro claro ejemplo se evidencia en las superficies laterales de los dientes, donde poco alcance tienen los productos de limpieza y la saliva, por lo cual, es más propenso a crear caries dentales (Zaura et al., 2009).

Microbiota Intestinal

La microbiota intestinal está formada por 100 billones de microorganismos con más de 1000 especies diferentes como mínimo, y más de 3 millones de genes. Aproximadamente un tercio de la microbiota intestinal es común para la mayoría de los seres humanos. Está claro que la composición de esta microbiota varía dependiendo de las porciones del intestino en que se encuentren, por ejemplo, cuando se presentan una interrupción del flujo del contenido en el intestino delgado secundario a obstrucciones, divertículos, asas ciegas u otras patologías, se puede ver como la concentración bacteriana de predominio anaerobio y el sobre crecimiento del mismo se han visto relacionados con síndromes de mala absorción o intestino irritable. La mayor concentración de microorganismos anaerobios se encuentra en el íleon terminal y sobre todo en el colon, siendo este último el lugar con mayor contenido bacteriano, aproximadamente 10^{14} microorganismos por mililitro.

La colonización del tracto gastrointestinal comienza en la etapa intrauterina, influenciada por la microbiota intestinal materna, y continúa en el nacimiento, donde se adquiere un gran número de microorganismos (Gail A. Cresci, 2016). La microbiota va modificándose durante los primeros años de vida y, aproximadamente a los tres años, su composición

ya se asemeja a la que se mantiene en la edad adulta. En esta primera etapa del desarrollo, los factores que más influyen son el tipo de nacimiento (parto o cesárea), el tipo de lactancia (leche materna o con fórmula), la dieta y un posible consumo de antibióticos. Por ejemplo, la leche materna, a diferencia de la leche de fórmula, contiene aproximadamente 600 especies de bacterias que participan en el desarrollo del sistema inmune y, además, contiene oligosacáridos que ejercen un papel prebiótico promoviendo el desarrollo de la microbiota. Durante la edad adulta, exceptuando que se produzcan grandes cambios en la dieta o se tomen antibióticos de forma repetida, la microbiota intestinal permanece estable hasta la vejez. El enlentecimiento del vaciado gástrico, la alcalosis del pH, la disminución de la motilidad y, en general, los cambios fisiológicos que ocurren con el envejecimiento disminuyen la diversidad de la microbiota intestinal y se asocia con un aumento de la fragilidad. Otros factores que tienen un impacto negativo en la microbiota intestinal son el estrés crónico (trastornos en el eje intestino-cerebro pueden causar disbiosis de la microbiota), el ejercicio físico de alta intensidad (promueve la liberación de mediadores inflamatorios y altera la función intestinal), estados críticos de enfermedad (se ha visto que el uso de probióticos podría mejorar la situación de estos enfermos), y el empleo de antibióticos, que según la dosis empleada y su espectro, pueden hacer desaparecer algunas especies bacterianas de forma indefinida y alterar la relación de especificidad entre la microbiota y el sistema inmune del huésped (Gail A. Cresci, 2016; Su, 2017)

Con respecto a las funciones que cumple en el huésped, la microbiota intestinal participa en el catabolismo de carbohidratos complejos y en la síntesis de numerosos metabolitos

activos como, por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta (AGCC), vitaminas como la K y la B, metabolitos derivados del triptófano y poliaminas. Los AGCC (butirato, acetato, propionato) contribuyen en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal al servir como sustrato energético para las células, actúan modificando la función de los macrófagos intestinales, participan en la diferenciación de Linfocitos Treg y Linfocitos T CD4+ productores de IL-10 e IL-22, y estimulan la diferenciación de células plasmáticas secretoras de IgA. Los metabolitos derivados del triptófano (indol, I3A, IPA) también estimulan la síntesis de IL-22 que mantiene la homeostasis de la mucosa intestinal, participan en el metabolismo humano y aumentan la síntesis de sustancias con función neuroprotectora y antioxidante. En resumen, las especies bacterianas, entre sus funciones, cumplen un papel fundamental en la tolerancia inmune y la respuesta inflamatoria tanto a nivel intestinal como sistémico (Durack & Lynch, 2019; Khan et al., 2019; Shi et al., 2017; Shui et al., 2020).

A nivel intestinal, en individuos sanos suelen predominar cuatro grupos de bacterias: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (Shi et al., 2017). No obstante, la composición de la microbiota presenta una gran variedad interindividual debido a la influencia de la dieta, el componente genético y otros factores explicados a continuación.

Por consiguiente, la modificación de la composición de la microbiota intestinal podría servir para mejorar la eficacia de diferentes terapias y la calidad de vida de los pacientes. Actualmente, constituye un importante campo de investigación donde se están estudiado diferentes estrategias para conseguirlo. El trasplante de microbiota fecal, el

uso de probióticos o el desarrollo de antibióticos de espectro reducido que permitan seleccionar especies bacterianas concretas, son algunas de las propuestas en investigación (Durack & Lynch, 2019; Khan et al., 2019; Miller & Carson, 2020; Shui et al., 2020). Deben realizarse ensayos clínicos en humanos que permitan comprender mejor la relación la microbiota -huésped y cómo beneficiarse de ella.

Microbiota del Aparato Genital Femenino

El tracto genital femenino, compuesto por vagina, cérvix, endometrio, trompas de Falopio y ovarios, presenta una concentración de microorganismos de 10^8 por mililitro en la vagina y el cérvix, siendo esto el 9% del total de bacterias presentes en el cuerpo femenino (Punzón-Jiménez & Labarta, 2021). Sus principales cambios se ven causados por la influencia hormonal. Su población está dominada por *Lactobacillus*, que protegen la mucosa de la colonización de patógenos y mantienen un ecosistema saludable (Su, 2017). Se ha identificado en la microbiota vaginal 5 tipos de comunidades bacterianas, dentro de las cuales 3 o 4 contienen en más del 90% el *Lactobacillus*. El ácido láctico producido por la microbiota vaginal es el que ayuda a mantener su bajo pH (3.4 – 4.5), factor primordial en la limitación del crecimiento de bacterias con potencial infeccioso (Chen et al., 2017).

En contraste, el tracto reproductivo alto femenino (TRAF) aún está sin suficientes estudios que describan su microbiota comensal. Se han realizado estudios de identificación bacteriana en pequeños tamaños de muestra en el contexto de infecciones, sobre todo las relacionadas con los partos pretérmino. (Chen et al., 2017). La microbiota

del TRAF puede derivar de bacterias que ascienden desde la vagina, ya sea directamente o adheridas al semen. La comunicación entre la vagina y el útero sería facilitada o inhibida por las contracciones peristálticas, la consistencia del líquido cervical, los pliegues cervicales o la respuesta inmunitaria.

La microbiota del cérvix se ha descrito en algunos estudios que han mostrado el *Lactobacillus* como bacteria dominante, y una correlación muy fuerte entre las muestras de vagina, cérvix y endometrio entre la misma mujer. La microbiota se ha demostrado que cambia progresivamente conforme se sube del tracto genital inferior femenino al superior, encontrando menos abundancia de *Lactobacillus*. Varios estudios han evidenciado una alta diversidad de especies dentro de la misma microbiota cervical, junto con géneros específicos (como por ejemplo la *Gardnerella* spp) que se asocian al riesgo de infección por el VPH (Punzón-Jiménez & Labarta, 2021).

El endometrio alberga su microbiota única, a pesar de haber sido considerado un medio estéril durante muchas décadas. El endometrio muestra una biomasa microbiana baja, albergando de 100 a 10000 veces menos cantidad de bacterias que el nicho vaginal. Varios estudios sugieren que *Lactobacillus*, si el género más representado, indica salud ambiente uterino (Punzón-Jiménez & Labarta, 2021).

Las trompas de Falopio y los ovarios muestran comunidades bacterianas muy diferentes entre las mujeres. *Lactobacillus* spp está presente en menor proporción que en la vagina o en el cuello uterino. Las trompas de Falopio y los ovarios albergan una variedad de

bacterias que crecen en condiciones levemente alcalinas, en contraste con la acidez del pH vaginal. Entre algunas bacterias encontradas en las muestras de las trompas se encuentran *Bacterioides*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Coproccocus* o *Hymenobacter*; mientras que *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia* o *Blaudia* se recuperaron del líquido ovárico, lo que sugiere una alta variabilidad interindividual entre estos sitios anatómicos (Punzón-Jiménez & Labarta, 2021).

Las alteraciones en la microbiota vaginal juega un papel importante en condiciones frecuentes como vaginosis bacteriana, enfermedades de transmisión sexual, infecciones urinarias y parto pretérmino (Chen et al., 2017).

Microbiota de la piel

La microbiota de la piel está adaptada para la vida en los microhábitats únicos que definen las condiciones ambientales y de nutrientes de este ecosistema. Al interactuar entre sí y a través de interacciones mutualistas o comensales con células huésped de mamíferos, la microbiota de la piel promueve la defensa y las respuestas inmunitarias, inhibe la colonización y la infección por organismos oportunistas o patógenos y promueve la reparación de tejidos y las funciones de barrera por medio de la existencia de diferentes nichos protectores y nutrientes para la supervivencia microbiana, la competencia y la cooperación. (Su, 2017).

El *Cutibacterium* es la bacteria predominante de los lugares sebáceos, mientras el *Corynebacterium* lo es en zonas húmedas. De acuerdo con los estudios realizados en

cultivos de la microbiota de la piel, las especies de estafilococos fueron los más abundantes. La secuenciación de los amplicones del gen del ARN ribosomal fúngico demostró que *Malassezia* es el miembro abrumadoramente dominante de la microbiota fúngica en la mayoría de los sitios del cuerpo. La única excepción fueron los pies, que albergaban una mayor diversidad de especies de hongos (Flowers & Grice, 2020).

Como se ha comentado anteriormente, *Cutibacterium acnes* es una de las especies bacterianas más abundantes en la microbiota de la piel adulta. Anteriormente conocido como *Propionibacterium acnes*, *C. acnes* es un anaerobio aerotolerante que utiliza sebo rico en lípidos como fuente de nutrientes. Con una abundancia mínima en la piel prepuberal, *C. acnes* comienza a aparecer en la microbiota de la piel humana junto con la maduración de la glándula sebácea y la secreción de sebo durante la pubertad. En su papel como componente comensal de la microbiota de la piel, *C. acnes* produce ácido propiónico, que ayuda a mantener el pH ácido de la piel sana, inhibiendo así la colonización por microbios más patógenos (Erin Chen et al., 2018).

La microbiota residente protege la piel de microbios invasores, patógenos u oportunistas a través del proceso de resistencia a la colonización. Una forma en que las bacterias pueden eliminar la competencia es a través de la muerte directa de los microbios competidores. Se desconoce el alcance total de estas interacciones, pero las más estudiadas son aquellas en las que las especies de *Estafilococos* coagulasa negativos inhiben a su pariente cercano pero patógeno, *S. aureus*. Las especies *Estafilococo* coagulasa negativo son muy abundantes en la microbiota de la piel, dentro de los que se

comprenden principalmente *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. hominis*, *S. lugdunensis* y *S. haemolyticus* (Erin Chen et al., 2018; Flowers & Grice, 2020).

Una especie que aparece repetidamente y domina la microbiota en asociación con trastornos de la piel es *S. aureus*, que a menudo se encuentra donde hay una brecha en la barrera cutánea, como dermatitis atópica o heridas (Flowers & Grice, 2020).

Microbiota y el Comportamiento

Una relación conocida con base evolutiva se puede ver con el *Toxoplasma gondii*, el patógeno eucariota que causa la toxoplasmosis, y su huésped los roedores. El *T. gondii* es un parásito con unas condiciones difíciles necesarias para sobrevivir, que se completan en parte en un huésped (roedores) y luego en otro (felinos). Los roedores pierden el miedo innato a la orina del gato, por el contrario, buscan lugares que la tengan, haciendo que sean más propensos a ser cazados y consumidos, transmitiéndose de esta manera de un huésped al otro. El *T. gondii* ha sido relacionado con efectos sobre el comportamiento de otros huéspedes, como el ser humano, donde se ha observado efectos en rasgos de personalidad, autocontrol, calidez, impulsividad, muchas veces dependiendo del género (Gonzalez et al., 2011).

Existen muchos virus relacionados con el comportamiento, para poner algunos ejemplos, el bornavirus se ha relacionado con trastornos como manía y esquizofrenia; virus de insuficiencia humana (VIH), relacionado con discapacidad cognitiva, desordenes afectivos y psicosis; la rabia, una infección zoonótica causada por un virus RNA de una sola cadena

asociado con la hidrofobia. De igual manera existen bacterias como la *Brucellasis* relacionadas con las alteraciones cognitivas y emocionales; *Leptospira* asociado a manía, síntomas psicóticos resistentes a antipsicóticos que responden con el tratamiento antibiótico dirigido contra esta bacteria; *Mycobacterium tuberculosis* vinculado con depresión y ansiedad; trastorno obsesivo compulsivo y los desórdenes neuropsiquiátricos autoinmunes pediátricos ligados a la infección por estreptococo (PANDAS) (Gonzalez et al., 2011; Snider et al., 2005).

Se han publicado numerosos estudios de como la dieta puede alterar las manifestaciones clínicas de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia, la depresión mayor o el trastorno bipolar, incluso alteraciones del comportamiento como el trastorno por déficit de atención e hiperactividad y autismo. Sin embargo, aún existen algunos aspectos de esta relación pendientes por estudiar para tener un adecuado control. A menudo se relacionan los metabolitos de la dieta y la microbiota del ser humano con muchas de estas enfermedades. Las enzimas que producen estos metabolitos pueden estar codificados en la genética del ser humano o en la de la microbiota que habita en el intestino (Gonzalez et al., 2011; Nicholson et al., 2013).

El DSM V clasifica algunos desordenes como desordenes permanentes del comportamiento o trastornos del espectro autista (TEA) que incluyen: autismo, síndrome de asperger, síndrome de Rett, síndrome desintegrativo de la infancia y los trastornos permanentes del desarrollo inespecíficos. considerable. Se ha propuesto un vínculo “intestino-cerebro” para los TEA, basado en parte en informes de que los niños con TEA

a menudo experimentan una variedad de trastornos gastrointestinales. Algunos estudios muestran que los pacientes con TEA presentan una prevalencia de la familia Clostridiales en la microbiota fecal (Finegold et al., 2002; Parracho et al., 2005).

El metabolismo de la microbiota puede tener un impacto en la patogénesis del TEA. Evidencia inicial basada en un pequeño estudio de pacientes con autismo que fueron tratados con vancomicina, un glucopéptido mínimamente absorbido, con mejoría comportamental a corto plazo, llevando a pensar que los síntomas de autismo se pueden relacionar con metabolitos neurotóxicos producido por la microbiota intestinal (Gonzalez et al., 2011). Dos estudios posteriores de metabolitos en orina apoyan esta teoría al evidenciar metabolitos alterados por la microbiota en pacientes con TEA (Nicholson et al., 2013; Sandler et al., 2000).

La relación entre el autismo, las alteraciones gastrointestinales y la microbiota intestinal sugieren que la dieta tiene una importancia significativa en los síntomas desarrollados, por esto muchos padres de niños con autismo intentan ver el impacto que pueden tener los cambios en la dieta sobre el comportamiento de sus hijos, por ejemplo, utilizando dietas libres en gluten o en caseína, probióticos o suplementos nutricionales. Dos estudios aleatorizados donde se prueba la dieta libre de gluten y caseína muestran una mejoría en los pacientes con TEA, a pesar de ser estudios pequeños y de corta duración. La dieta libre de gluten y caseína puede realizar cambios tanto en la microbiota intestinal como en los metabolitos que esta misma produce. De igual manera se puede producir

mejorando la integridad intestinal, dado que el síndrome de permeabilidad intestinal se ha relacionado con TEA (De Magistris et al., 2010).

Las comunidades que componen la microbiota humana tienen la capacidad de reflejar y ayudar a definir las interacciones entre los genotipos humanos y las múltiples exposiciones con el medio ambiente. En el camino para entender la genética y los factores medioambientales que moldean las diferentes facetas del normal comportamiento del ser humano, los cambios del comportamiento con el envejecimiento y la perturbación de este por los trastornos mentales que lo pueden afectar, se necesitan realizar estudios más amplios y de mayor duración para definir las teorías encontradas (Gonzalez et al., 2011).

Microbiota y Cáncer

La correlación entre el cáncer y la microbiota aún está poco clara y por definir. Es conocido que la genética y los factores medioambientales son decisivos en el inicio y la progresión del cáncer, pero algunos estudios recientes han demostrado que los microorganismos también cumplen un papel importante. La asociación de la microbiota con el cáncer gástrico (Ferreira et al., 2018), ovario (Banerjee et al., 2017), páncreas (Pushalkar et al., 2018), próstata (J. Wang et al., 2007), pulmón (Mao et al., 2018), mama (Urbaniak et al., 2016) y colangiocarcinoma (Avilés-Jiménez et al., 2016) se ha encontrado cada vez con más frecuencia.

La asociación de infección bacteriana y cáncer está representada clásicamente por *Helicobacter pylori* y su implicación en el adenocarcinoma gástrico y el linfoma de tejido linfóide asociado a mucosas (MALT) (Tsai & Hsu, 2010). Algunos estudios sugieren vínculos de bacterias puntuales con tumores. Entre estas encontramos la *Salmonella typhi* y el cáncer de vesícula biliar, *Streptococcus bovis* y el cáncer de colon, *Chlamydia pneumoniae* y el cáncer de pulmón, las especies de *Bartonella* y la formación de tumores vasculares, *Propionibacterium acnes* y el cáncer de próstata y *Escherichia coli* en la enfermedad inflamatoria intestinal con mayor riesgo de cáncer de colon (Lax, 2005; Mager, 2006; Vogelmann & Amieva, 2007). Estos hallazgos se confirmaron mediante el uso de modelos animales como ratones para *Helicobacter hepaticus* asociado con carcinoma hepatocelular, cáncer de colon y cáncer en las

glándulas mamarias (Pushalkar et al., 2012) . Cada vez hay más pruebas de que la infección bacteriana está causalmente relacionada con la carcinogénesis.

Varios mecanismos para una posible asociación bacteriana en la carcinogénesis pueden incluir infección crónica por evasión del sistema inmunitario y supresión inmunitaria, o inducción de inflamación crónica, o interferencia directa o indirecta con el ciclo celular eucariótico y las vías de señalización, o a través del metabolismo de sustancias cancerígenas potenciales. Las células huésped son susceptibles a las endotoxinas microbianas (lipopolisacáridos), enzimas (proteasas, colagenasas, fibrinolisina y fosfolipasa) y sus subproductos metabólicos (sulfuro de hidrógeno, amoníaco y ácidos grasos) y pueden inducir directamente mutaciones en genes supresores de tumores y protooncogenes o alterar las vías de señalización que afectan la proliferación celular o la supervivencia de las células epiteliales. Los microorganismos y sus productos activan neutrófilos, macrófagos, monocitos, linfocitos, fibroblastos y células epiteliales para generar especies reactivas (peróxido de hidrógeno y radicales de oxígeno), especies nitrogenadas reactivas, lípidos reactivos y metabolitos (malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal) y metaloproteasas de matriz. Estos compuestos pueden inducir daños en el ADN en las células epiteliales y afectar directamente el crecimiento tumoral al activar los receptores tipo Toll (TLR) de las células tumorales que eventualmente conducen a la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B y la producción de citoquinas (Fukata et al., 2009). Estas citocinas se producen de forma desregulada y tienen funciones en el crecimiento celular, la invasión e interrupción de la supresión tumoral, el estado inmunitario e incluso la supervivencia. No está claro si estos mediadores son críticos para

el desarrollo y/o el crecimiento de los tumores y/o si constituyen un entorno propicio para la progresión de las neoplasias malignas. Se observaron niveles elevados de ciertas citocinas proinflamatorias y proangiogénicas dependientes de NF- κ B TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF y VEGF en muestras de suero, saliva y tejido de pacientes con cáncer oral (Pushalkar et al., 2012; Yu Wang et al., 2021). La mayoría de los estudios se han hecho en la microbiota de la cavidad oral e intestinal.

El carcinoma oral, es una de las asociaciones más estudiadas de microbiota con el cáncer. Con una tasa cada vez más alta de incidencia y con pocos recursos para el diagnóstico temprano. De igual manera con supervivencia del 40% a los 5 años que, no ha cambiado en los últimos 40 años, por el diagnóstico tardío y en etapas avanzadas de la enfermedad, tiene menos supervivencia que el cáncer de piel tipo melanoma, cervix o incluso ovario. Como principales factores de riesgo se encuentra el consumo de tabaco y alcoholismo pesado, que comparte con el cáncer de la laringe, y que de la misma forma actúan como agentes sinérgicos a la hora de producir lesiones tumorales. Otros posibles factores de riesgo son las infecciones virales, candidiasis, periodontitis, pobre higiene oral y estado dental, infecciones bacterianas crónicas e inflamación (Pushalkar et al., 2012). Cada vez se encuentra más asociación entre el virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer oral, que tiene un mejor pronóstico por tener mejor respuesta al tratamiento (Pushalkar et al., 2012; Schmidt et al., 2014).

La microbiota oral es tan compleja como común, dentro de las bacterias patogénicas más comunes se pueden encontrar al *Streptococcus anginosus*, *Veillonella*, *Fusobacterium*

nucleatum (*F. nucleatum*) y *P. gingivalis* (Irfan et al., 2020; Sun et al., 2020). Las bacterias patogénicas de la cavidad oral están asociadas a múltiples cánceres del sistema digestivo (Irfan et al., 2020). Adicionalmente las altas tasas de recurrencias y prevalencias de segundos tumores en la cavidad oral soporta la propuesta de que estos cánceres desarrollan un campo celular genéricamente alterados, concepto denominando “cancerización de campo”. Este campo se ha reportado que puede ser hasta de 7 cm desde el tumor y clínicamente ser normal.

El desarrollo de carcinoma esofágico se ha visto relacionado con *P. gingivalis* y *F. nucleatus*, encontrándose una tasa más alta de *P. gingivalis* en el tejido del carcinoma escamoso esofágico (CEE) que en el adyacente sano (X. Yuan et al., 2017). La *P. gingivalis* puede utilizar el eje del miR-194/GRHL3/PTEN/AKT para producir proliferación y migración del CEE. El ADN de *F. nucleatus* en el tejido del CEE es significativamente mayor que en los tejidos sanos adyacentes. Los niveles de bacterias orales, como el *Streptococcus* y *Clostridium*, en el tejido de cáncer gástrico es significativamente mayor que en el tejido normal, a diferencia del *Lactobacillus brevis* que es menos frecuente (Yu Wang et al., 2021). La proporción de *Bacteroides* y *Firmicutes* en pacientes sin cáncer gástrico disminuye significativamente, de igual manera, la abundancia de *Neisseria elongata* y *Streptococcus mitis* en la microbiota de la saliva de pacientes con cáncer de páncreas es significativamente menor que en la población sana, al contrario de bacterias como *Leptotrichia* y *Porphyromonas* (Torres et al., 2015; Yu Wang et al., 2021)

Campylobacter jejuni y *F. nucleatus* han mostrado ser bacterias causantes del cáncer colorrectal. *Helicobacter pylori* aumenta la expresión de VCAM1 en los fibroblastos asociados con el cáncer a través de la vía de señalización JAK/STAT1 en el carcinoma gástrico, y el nivel de VCAM1 en pacientes con cáncer gástrico se correlaciona positivamente con la progresión del tumor y un mal pronóstico (Yu Wang et al., 2021). En un estudio de cáncer colorrectal se ha encontrado inflamación crónica promovida por la acumulación de ciertas bacterias, como *Escherichia coli*, e induce carcinogénesis por medio de la toxina celular de expansión letal producida por el *C. jejuni* (He et al., 2019).

H. pylori es el mayor factor de riesgo para cáncer gástrico. Estudios han probado que aproximadamente el 2-3% de las personas infectadas con esta bacteria, eventualmente desarrollan cáncer gástrico (Schmidt et al., 2014). También se evidencia que la autofagia, entendida como la vía de degradación por la cual una célula eucariota degrada los órganos celulares y proteínas dañadas a través de lisosomas tanto en células sanas como cancerígenas, es inducida por *H. pylori* y factores de virulencia en las células tumorales. El gen A relacionado con la citotoxicidad y las Toxina vacuolar A son las dos vías de acción del *H. pylori* y las más relaciones con la autofagia en el cáncer gástrico. La relación de esta bacteria con el cáncer colorrectal también se ha demostrado en algunos estudios (Teimoorian et al., 2018). En general los mecanismos de esta bacteria para la formación de patología maligna gástrica no están aún totalmente claros y esta influenciadas por muchas variables, incluidas la cepa infectante, el papel complejo de la respuesta inflamatoria, la diversidad hereditaria del huésped, impacto ambiental, entre otras (Yu Wang et al., 2021).

De otra parte, el *F. nucleatum* está relacionado principalmente con el cáncer esofágico y pancreático y, de igual manera, un papel importante al hablar de cáncer oral, dado que puede elevar los niveles de IL-6, a través de la vía de señalización TLR en los tumores y por consiguiente activar la vía STAT3, y promover el crecimiento del carcinoma de células escamosas oral. Esta bacteria también puede promover la resistencia a los medicamentos de quimioterapia por medio de la regulación de la autofagia. En estudio in vivo e in vitro se mostró que *F. nucleatum* aumentaba los niveles de autofagia en paciente con cáncer intestinal. Esta bacteria desempeña un papel fundamental en la inducción de la quimioresistencia del cáncer colorrectal mediante el silenciamiento selectivo de miR-18a* y miR-4802 y la activación de las vías de autofagia. Además, se encontró que la concentración de *F. nucleatum* estaba positivamente relacionada con el nivel de CARD3, que era más bajo en aquellos sin metástasis. La regulación a la baja de CARD3 disminuyó la expresión de proteínas relacionadas con la migración, la invasión, la metástasis y la autofagia y la formación de autofagosomas inducida por *F. nucleatum* in vitro o in vivo (Yu Wang et al., 2021).

La *Porphyromona gingivalis* es un importante patógeno que causa periodontitis, cáncer de culas escamosas oral e incluso cáncer esofágico y su supervivencia depende de la activación de la autofagia en las células endoteliales del huésped. Después de la infección de la célula, el transporte endógeno y el proceso de autofagia se regula de manera aberrante, de esta manera, la bacteria puede escapar a la degradación en la célula huésped (Lim et al., 2018).

Estas claras asociaciones impulsan el estudio de la disbiosis de las comunidades bacterianas en el ser humano y su relación con la patogénesis de los tumores malignos desarrollados. No solo se encuentra asociación con la causa, sino también con el desarrollo y el pronóstico, por lo que los grupos bacterianos pueden ser utilizados como potenciales biomarcadores para la detección y monitorización del cáncer (Lim et al., 2018).

Microbiota y Cáncer De Laringe

Hongli Gong y col. en 2013 comenzó una serie de estudios comparativos, el primero de estos tenía como objetivo el investigar las características de la microbiota de la mucosa laríngea y analizar su abundancia comparando entre pacientes con cáncer de laringe y población sana. Se realizó un estudio de casos y controles con 60 pacientes, 29 de estos con diagnóstico histopatológico de CEL y 31 pacientes con pólipos de cuerda vocal. Se recogieron muestras de tejido tumoral, tejido sano adyacente a más de 1 cm del tumor y tejido de pólipos de cuerda vocal. De los 60 pacientes, 54 eran hombres y 6 mujeres (H. L. Gong et al., 2013).

Se implementó la secuenciación masiva para identificación de secuencias, encontrándose un total de 143.122 con un promedio de 1645 por muestra. Se encontraron 3334 OTUs en el tejido tumoral, 2639 en el tejido sano adyacente al tumor y 2378 en los controles (H. L. Gong et al., 2013).

Tras este proceso se identificaron 13 familias en la mucosa laríngea, dentro de las cuales las más prevalentes fueron Firmicutes (54%), Fusobacteria (17%), Bacteroidetes (15%), Proteobacteria (11%) y Actinobacteria (3%). De igual manera, se identificaron 280 géneros diferentes, dentro de los que los más predominantes fueron *Streptococcus* (36%), *Fusobacterium* (15%), *Prevotella* (12%), *Neisseria* (6%) y *Gemella* (4%) (H. L. Gong et al., 2013).

Existió una diferencia significativa entre las comunidades bacterianas de los tres grupos por separado, siendo la familia de Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroides y géneros como *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Neisseria* y *Gamella*, donde vas se hizo evidente esta diferente. Sin embargo, a la hora de agrupar las muestras de tejido tumoral y las de tejido sano adyacente la tumor, no se encontró una diferencia significativa al compararla con los controles. Por esto, se decidió realizar un análisis de subgrupos, donde se entró diferencia significativa entre los pacientes con lesiones > 2 cm y < 2 cm en los géneros de *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, que se mostraron más abundantes en el primero grupo. De igual manera, se encontró más abundancia del género *Oribacterium* en pacientes menores de 60 años. El PCoA mostró una diferencia significativa entre la estructura de la microbiota de los casos y los controles. A través del análisis de PLS-DA, LOOCV y MANOVA se encontró que la abundancia de *Fusobacterium*, *Prevotella* y *Gamella* era mayor en el grupo de casos y la prevalencia de *Streptococcus* y *Rothia* era mayor en los controles (H. L. Gong et al., 2013).

Hongli Gong y col. 2014 realizó un estudio piloto para determinar la estructura de las comunidades de microbiota presentes en la faringe y ver si alguna de estas se puede asociar al cáncer de laringe. Para esto realizó un estudio un estudio clínico transversal en el servicio de Otorrinolaringología del Hospital de la universidad de Fudan en Shanghai, China. Recogió 27 muestras de paciente con carcinoma escamosos de laringe (CEL) y 28 controles sanos. Las edades de los pacientes eran igual o mayor a 60 años. Las muestras se tomaron con frotis de faringe, tejido tumoral y adyacente sano. Se realizó secuenciación masiva a toda las muestras donde se consiguieron identificar 84.207

secuencias en el grupo de controles y 148.590 secuencias en los casos. 7.943 OTUs fueron reconocidos (H. Gong et al., 2014).

Se identificaron 14 familias y 218 géneros. Dentro de las familias más frecuentemente encontradas se encuentran Firmicutes (54.7%), Fusobacteria (14.8%), Bacteroidetes (12.7%), Proteobacteria (10.6%) y Actinobacteria (6.2%). Los géneros más frecuentes fueron *Streptococcus* (37,3%), *Fusobacterium* (11,3%), *Prevotella* (10,6%), *Neisseria* (7,0%), *Veillonella* (3,7%), *Gemella* (3,6%), *Actinomyces* (3,0%), *Leptotrichia* (3,0%), *Rothia* (2,7%), *Parvimonas* (2,2%), *Peptostreptococcus* (1,7%), *Granulicatella* (1,6%), *Haemophilus* (1,2%) y *Porphyromonas* (1,0%) (H. Gong et al., 2014).

Al comparar los grupos de casos y controles se evidenció un aumento en la abundancia relativa en el grupo de casos de familias como Fusobacteria, Spirochaetes, Prevotella, Parvimonas, Peptostreptococcus, Dialister, Catonella, Selenomonas, Peptostreptococcaceae incertae sedis, Treponema y Burkholderia, con respecto a los controles. Sin embargo, la proporción de *Streptococo* y *Rothia* disminuyó en los casos. La abundancia de los géneros *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium sp. oral taxon*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella tanneriae*, *Prevotella oris* y *Prevotella nigrescens* aumentaron en los pacientes con cáncer de laringe, a diferencia de *Streptococo parasanguinis* y *Strptococo sp. Oral taxon* que se redujo (H. Gong et al., 2014).

Posteriormente, en el 2017, Hongli Gong et al. realizó un estudio en la misma población, donde recolectó 31 muestras de pacientes con CEL, 24 muestras de tejido sano

adyacente (a más de 1 cm de la lesión tumoral) y 32 muestras de pacientes sanos con pólipos laríngeos. Con unas edades entre los 35 y 75 años y una media de 56,6. Seis eran mujeres y 57 horas. Dentro de los antecedentes se encontraban el tabaquismo y el alcoholismo. Se excluyeron pacientes que hacían tomado antibiótico o antimicótico en los últimos 30 días. Todos los pacientes fueron diagnosticados por estudios histopatológicos. El estudio de las muestras se hizo a través de la secuenciación masiva. Se identificaron 176.757 secuencias con una media de 2.032. Se obtuvieron 8.887 OTUs (H. Gong, Shi, et al., 2017).

Las familias que se encontraron fueron Firmicutes (46.4%), Bacteroidetes (18.7%), Fusobacteria (16.9%), Proteobacteria (13.0%) y Actinobacteria (2.4%). A nivel de género se encontraron Streptococo (41.7%), Fusobacterium (17.0%), Prevotella (13.2%), Gemella (4.1%), Helicobacter (2.6%), and Haemophilus (2.3%) (H. Gong, Shi, et al., 2017).

Encontraron que los géneros predominantes en los pacientes del grupo de control fueron *Streptococo*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Treponema*, *Capnocytophaga*, *Solobacterium* y *Porphyromonas* con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)(H. Gong, Shi, et al., 2017).

De igual manera, se encontró mucha más riqueza y diversidad Shannon en los pacientes con tumor que en los controles, así como también, se encontró mayor igualdad en las comunidades bacterianas del grupo de casos en comparación con los controles. EL análisis de coordenadas principales (PCoA) no muestra diferencia entre las bacterias

encontradas en los tejidos del tumor y los que se sacaron de tejido sano a más de 1 cm del mismo. En estos PCoA se encontró una separación del grupo de casos y de controles en los dos principales componentes en 14,35% y 10,51% de toda la variabilidad a nivel de género (H. Gong, Shi, et al., 2017).

Se demostró un aumento en la población de la familia Fusobacteria y disminución significativa de Firmicutes y Actinobacteria en el grupo de los casos comparado con los controles. A nivel de género se evidenció un aumento en las poblaciones de Fusobacterium, Gemella, Capnocytophaga, Parvimonas, Aggregatibacter y Peptostreptococo, así como se también, se encontró disminución de Streptococcus en las muestras de casos en comparación con las de control (De Magistris et al., 2010).

En el mismo año Hongli Gong et al. 2017, intenta definir la composición y abundancia de la microbiota faríngea en paciente con cáncer de laringe comparado con paciente con pólipos de cuerda vocal. Se realizó un estudio transversal con 40 pacientes con cáncer de laringe en el grupo de casos y 28 pacientes con pólipos de cuerda vocal en el grupo de controles. Recogidos también en el Hospital de la Universidad de Fudan (Shanghái) entre el 2010 y 2012. De los grupos de estudio, 62 pacientes fueron hombres y 6 mujeres. Las edades comprendieron entre el 24 y 81 años, con una media de 57,1 años. Se realizó la recogida de muestras por medio de tejidos de laringectomía de los casos o laringoscopia directa de los controles. Además, se recogieron muestras de frotis faríngeo. Se realizó el proceso de identificación de las muestras por medio de la secuenciación masiva. Se

encontraron 117.141 secuencias, con una media de 1.723 secuencias por paciente. De lo anterior, se identificaron 2.279 OTUs.

Se pudo identificar a partir de las muestras estudiadas, en grupo taxonómico familia, Firmicutes (55.0%), Fusobacteria (12.7%), Proteobacteria (11.2%), Actinobacteria (10.8%) y Bacteroidetes (9.6%). A nivel de grupo taxonómico género se encontró *Streptococcus* (39.0%), *Neisseria* (9.1%), *Prevotella* (7.8%), *Leptotrichia* (7.0%), *Veillonella* (6.9%), *Actinomyces* (6.6%), *Rothia* (4.6%), *Fusobacterium* (4.5%), *Gemella* (3.8%), *Granulicatella* (2.9%), *Megasphaera* (0.9%), *Porphyromonas* (0.7%), *Capnocytophaga* (0.6%) y *Solobacterium* (0.6%).

Se realizó un PCoA para ver la diferencia espacial entre los casos y los controles, sin observar diferencia entre ellos. Se realizó un análisis de la abundancia relativa de las comunidades bacterianas por medio del método FDS, sin identificar diferencia. Se estratificaron los pacientes de acuerdo con la edad, los menores de 60 años y los mayores de 60 años, sin identificar diferencia en la estructura bacteriana por medio de PCoA. Se realizó una segunda estratificación de los grupos por medio del sexo, sin encontrar diferencia significativa.

Se realizó una correlación inversa de la abundancia relativa de ambos grupos donde se encontró que la familia Firmicutes era inversamente correlacionado con *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Bacteroides*, usando un análisis del modelo de regresión lineal. A nivel del rango taxonómico genero también se realizó el mismo análisis,

mostrando una relación inversa entre la población *Streptococcus* con respecto a *Fusobacterium*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Megasphaera*, *Eubacterium*, *Solobacterium*, *Mogibacterium*, *TM7_genera_incertae_sedis* y *SR1_genera_incertae_sedis*.

Richard B. Hayes y col. 2018 realizó un estudio prospectivo anidado con el objetivo de definir la asociación entre la microbiota oral y la incidencia de carcinoma escamosos de cabeza y cuello (CECC). Este estudio de casos y controles anidados se realizó a partir de dos estudios de cohorte prospectivos: el American Cancer Society Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort (CPS-II) y el Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial (PLCO) (Hayes et al., 2018).

Se incluyeron en el estudio 129 pacientes que fueron diagnosticados de CECC durante el seguimiento de 3,9 años, y se escogieron 254 controles emparejados, dos controles por cada caso, teniendo en cuenta que 4 muestras fueron excluidas por presentar material inadecuado. Las muestras se tomaron a partir de enjuagues bucales que fueron enviados por los pacientes de ambos estudios. La edad de media de los pacientes fue de 71 años en el CPS-II y de 63 años en el PLCO. La mayoría de los pacientes eran varones. Se realizó un estudio de secuenciación masiva sobre las muestras a estudio con identificación de 3.217.274 secuencias que pertenecían a 10 filos, 22 clases, 36 órdenes, 62 familias, 127 géneros y 439 especies. De los cuales solo se analizaron 5 filos, 11 clases, 17 órdenes, 28 familias, 50 géneros y 167 especies (Hayes et al., 2018).

Se encontró que una edad y sexo similar en los pacientes de ambos estudios. En las dos cohortes se vio que los casos eran más propensos a tener antecedente de tabaquismo, consumo de alcohol y positividad para VPH-16 (Hayes et al., 2018).

En el análisis de la microbiota oral de las muestras se mostró que a mayor abundancia de *phylum Actinobacteria* se asoció con un mayor riesgo de CECC. Una mayor abundancia del orden *Corynebacteriales*, la familia *Corynebacteriaceae* y el género *Corynebacterium* se asociaron con un riesgo reducido de CECC. Además, la clase *Betaproteobacteria*, el orden *Neisseriales*, la familia *Neisseriaceae* y el género *Kingella* en el filo *Proteobacteria* se asociaron significativamente con un menor riesgo de CECC. Tres especies, *Prevotella nanceiensis*, *Capnocytophaga leadbetteri* y *Selenomonas sputigena*, también estaban inversamente relacionadas con CECC. Ninguna de las 4 bacterias asociadas con la enfermedad periodontal (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) y la caries dental (*Streptococcus mutans*) se asoció con el riesgo de CECC (Hayes et al., 2018).

Una mayor abundancia de los géneros *Corynebacterium* (orden *Corynebacteriales*), *Kingella* (orden *Neisseriales*), *Neisseria* (orden *Neisseriales*), *Abiotrophia* (orden *Lactobacillales*), *Capnocytophaga* (orden *Flavobacteriales*) y las especies *Kingella dentificans* y *Streptococcus sanguinis* se asociaron con un riesgo reducido de cáncer de laringe. A nivel de especie, *Actinomyces oris* y *Veillonella denticariosi* se asociaron con un riesgo reducido de cáncer de faringe. *Parvimonas micra* y *Neisseria sicca* se asociaron con

un riesgo reducido de cáncer de cavidad oral, mientras que *Actinomyces* sin nombre (oral-taxon_170) se asoció con un mayor riesgo (Hayes et al., 2018).

También Hanshew y col 2014 realizaron un estudio en el que se quería caracterizar y comparar las comunidades bacterianas presentes en lesiones benignas de las cuerdas vocales. Se escogieron 49 pacientes con diagnóstico de lesión benigna de cuerda vocal de la Universidad de Wisconsin – Madison, USA, y Universidad de Hamburgo, Alemania. De los cuales se recogieron 44 muestras, dentro de las que se encuentran 7 quistes, 5 nódulos, 18 pólipos y 14 edemas de Reinke. Se identificaron un total de 248.570 secuencias con una media de 5.650 por muestra. 334 OTUs estuvieron presente en el 97% de las muestras (Hanshew et al., 2014).

No se identificó una diferencia significativa entre los diferentes tipos de lesiones según la alfa diversidad por prueba de Chao o Simpson y Shannon. Cinco familiar fueron representativas, de las cuales se mencionan Firmicutes (73,8 %), Proteobacteria (12,7 %), Bacteroidetes (9,2 %), Actinobacteria (2,1 %) y Fusobacteria (1,9 %). Las secuencias identificadas como *Spirochaetes*, *Cyanobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Deinococcus-Thermus*, *Tenericutes* y sin clasificar también estuvieron presentes, pero de manera inconsistente y con abundancia menor a 0,2% (Hanshew et al., 2014).

Muchas de las secuencias identificadas como Bacilos pertenecían al género *Streptococcus*. Este género fue el más común y abundante, encontrado en cada lesión. En un promedio de 68,7% de todas las secuencias fue encontrado. Ninguna de las

comunidades tuvo agrupación significativa en el PCoA basado en el tipo de lesión, género, país de origen o edad (Hanshew et al., 2014).

Lim y col. 2018 llevaron a cabo un estudio de casos y controles junto con la universidad de Queensland, donde escogieron 20 pacientes sanos, 21 pacientes con cáncer oral u orofaríngeo y 11 pacientes con alto riesgo oral por presentar enfermedades como periodontitis o gingivitis. Dividieron el grupo de controles por edad, de 20 a 30 años y los mayores de 50 años. Se recogieron las muestras a través de enjuague bucal (Lim et al., 2018).

A través de la secuenciación masiva se identificaron 770.061 secuencias en total, con un promedio de 9.278 secuencias por muestra. 108 OTUs fueron detectados (Lim et al., 2018).

Se utilizó el índice de Shannon para calcular la diversidad de cada uno de los grupos, evidenciando que el grupo de casos presentaba una diversidad menor en comparación con el grupo de controles y el grupo de alto riesgo. Los gráficos PLS-DA y de redundancia muestran una estructura claramente diferenciada entre los controles sanos normales entre las edades de 20 y 30 años y otras categorías (controles sanos normales mayores de 50 años, individuos de alto riesgo y pacientes con cáncer oral (OCC) y cáncer orofaríngeo (OPC)) (Lim et al., 2018).

El estudio muestra que *Rothia* ($P < 0,0001$), *Haemophilus* ($P < 0,005$), *Corynebacterium* ($P < 0,01$), *Paludibacter* ($P < 0,01$), *Porphyromonas* ($P < 0,01$) y *Capnocytophaga* ($P < 0,05$) presentan una abundancia significativamente menor en muestras de enjuague bucal de pacientes del grupo de casos, mientras que *Oribacterium* ($P < 0,05$) es significativamente mayor. De igual forma expone que *Actinomyces* ($P < 0,05$), *Parvimonas* ($P < 0,05$), *Selenomonas* ($P < 0,05$) y *Prevotella* ($P < 0,05$) tienen una abundancia significativamente mayor en paciente con cáncer oral en comparación con el orofaríngeo (Lim et al., 2018).

En este estudio también se intentó encontrar un panel de bacterias que pudieran ayudar a realizar un diagnóstico precoz a través de las curvas ROC de Carstensen de los géneros de *Rothia*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Porphyromonas*, *Oribacterium* y *Capnocytophaga*. Con este enfoque, el panel tiene un área bajo la curva (AUC) de 0,98 y una sensibilidad y especificidad del 100% (Lim et al., 2018).

Schmidt y col. 2014 realizó un estudio con dos diferentes cohortes, una inicial llamada de descubrimiento, y la segunda de confirmación. Su objetivo principal era comenzar a sentar las bases que permitirían la explotación de la microbiota oral para el tratamiento y seguimiento del inicio, la progresión y la recurrencia del cáncer oral. La muestra de la cohorte 1 fue de 5 casos y 5 controles, la de la cohorte 2 fue de 83 pacientes, incluyendo los de la anterior cohorte y pacientes con lesiones precancerosas (Schmidt et al., 2014).

A través la secuenciación masiva de las muestras se identificaron en la cohorte 1 un total de 104.380 secuencias y 276 OTUs. En la cohorte 2 se identificaron 4.486.196 secuencias y 2107 OTUs (Schmidt et al., 2014).

En las dos cohortes se identificaron principalmente 5 familias, dentro de las que se encuentran Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria. De igual manera, se evidenció en ambas cohortes una disminución significativa de la familiar Firmicutes y Actinobacteria en el grupo de casos en comparación con los controles sanos. Estas dos familias también se encontraron disminuidas en pacientes con lesión precancerosa, significando que tal vez estas dos familias pueden tener una reducción en las etapas tempranas de la enfermedad. Se encontró, de igual manera, una reducción en los géneros de Streptococcus y Rothia en el grupo de casos (Schmidt et al., 2014).

Wang y col. 2017, realizó un estudio donde intentaba correlacionar las comunidades bacterianas de los tejidos de cabeza y cuello para relacionarlos con la aparición de carcinoma escamosos de cabeza y cuello. Se tomaron muestras de un banco de tejidos de 121 pacientes con carcinoma escamoso oral, orofaríngeo o laríngeo, y 121 muestras sanas a más de 2 cm de la lesión tumoral. El procesamiento de las muestras se realizó por secuenciación masiva para identificar las secuencias más frecuentes (H. Wang et al., 2017).

Dentro de los resultados encontraron que la familia más frecuente tanto en casos, como en controles, fue Firmicutes, seguido de Bacteroidetes y Proteobacteria, luego se

encontró *Fusobacteria* y *Actinobacteria*. Se evidencia una diferencia significativa entre casos y controles solamente en dos géneros, *Actynomices* y *Parvimonas*, estando el primero de estos disminuido en los casos y el segundo aumentado en comparación con el grupo control (H. Wang et al., 2017).

Al no presentar una diferencia significativa en la diversidad alfa de casos y controles, se decidió realizar un análisis estratificado de los dos grupos dependiendo del tamaño del tumor. Se evidenció que el género *Actynomices* estaba aumentado en los pacientes con tumores de bajos estadios comparados con los de alto estadio. Al contrario de la *Parvimonas* que estaba disminuido en los pacientes con bajos estadios. De igual manera, se realizó una estratificación según la localización del tumor, donde se vio que el género *Parvimonas* presento una disminución de su abundancia en la hipofaringe/laringe en comparación con la cavidad oral/orofaringe (H. Wang et al., 2017).

Por último, Jetté y col, 2016, realizó un estudio para identificar las comunidades bacterianas claves asociadas con el consumo de tabaco y presencia de ERGE que podrían causar la inflamación laríngea. Se tomó una muestra de tejido de cuerda vocal falsa de 97 pacientes. Un grupo de 77 pacientes eran no fumadores, de estos, 19 presentaban ERGE diagnosticada por phmetría, 28 presentaban reflujo faringo – laríngeo (RFL) diagnosticado por nasofibrolaringoscopia, y 30 pacientes sin enfermedad. Otro grupo de 20 fumadores, de los cuales, 10 presentaban ERGE diagnosticado por phmetría, 4 presentaban RFL diagnosticado por nasofibrolaringoscopia y 4 pacientes sin patología (Jetté et al., 2016).

Se realizó secuenciación masiva de las muestras, identificando 300.693 secuencias que correspondían a 1347 OTUs. Dentro de las familias encontradas se exponen Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria. De igual manera, los géneros con más abundantes fueron *Comamonadaceae*, *Streptococcus*, *Cloacibacterium*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Helicobacter*, *Veillonella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Jetté et al., 2016).

En el análisis estadístico no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio. Sin embargo, se encontró diferencia en la alfa diversidad con la prueba de Shannon, mostrando una disminución de la diversidad en fumadores. De igual manera, la prueba de CHAO1 mostró aumento de riqueza en paciente con ERGE (Jetté et al., 2016).

Saliva como Método de Estudio

La saliva se considera un fluido biológico clínicamente informativo por el uso que se le puede dar en las investigaciones de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y manejo de pacientes con enfermedades orofaríngeas y sistémicas. Su fácil método de recolección y almacenamiento es ideal para la detección temprana de enfermedades, dado que contine marcadores biológicos específicos. Los biomarcadores contenidos la hacen útil en ensayos clínicos que la utilizan como dispositivo de estudio, pruebas rápidas o formatos más estandarizados para operaciones de laboratorio clínico centralizado. El diagnóstico salival es un campo dinámico que se está incorporando como parte del diagnóstico de enfermedades, seguimiento clínico y para la toma de decisiones clínicas importantes para el cuidado del paciente (Malamud, 2011).

Las muestras orales que son útiles para el diagnóstico de enfermedades sistémicas incluyen saliva, fluido crevicular gingival (GCF), hisopos orales, placa dental y volátiles. De hecho, los datos publicados indican el uso exitoso de todos estos tipos de muestras orales para detectar o predecir la susceptibilidad a enfermedades sistémicas (Malamud, 2011).

La saliva ha tenido un papel importante en el descubrimientos de biomarcadores que sirven como diagnóstico temprano, ya que todos los marcadores presentes en sangre y en orina, también se presentan en esta (Lim et al., 2018). Un reciente estudio mostró la viabilidad en la detección de ADN tumoral en las muestras de saliva con una sensibilidad del 100%, en comparación con un 80% en plasma (Yuxuan Wang et al., 2015).

La capacidad que se tiene para determinar con precisión los biomarcadores en las muestras extraídas de la cavidad oral depende primeramente de la naturaleza bioquímica del marcador, la fuente, el tipo de muestra que se toma y el mecanismo por el que el marcador ingresa a la cavidad oral. El tipo de muestreo oral más comúnmente utilizado es el hisopo que recoge una muestra de ADN. Esto se ha empleado durante muchos años en estudios forenses, más recientemente, para análisis de polimorfismos de un solo nucleótido para mutaciones asociadas con enfermedades específicas. Si bien una muestra de ADN se puede recolectar de una amplia gama de sitios en el cuerpo humano, la muestra oral se ha utilizado con más frecuencia debido a la facilidad del procedimiento de muestreo, es decir, un cepillado bucal que se coloca en un medio de transporte estabilizador y se envía a un laboratorio para su evaluación (Malamud, 2011).

La búsqueda de biomarcadores para una variedad de tumores malignos ha estado en curso durante décadas. Una vez que dichos biomarcadores se detectan en el suero, es una progresión natural buscar estos mismos marcadores en la saliva. La capacidad de identificar marcadores específicos, con mayor importancia en tumores malignos con pocos síntomas tempranos, como el cáncer de ovario y páncreas, sería un gran impacto en las tasas de diagnóstico temprano y por consiguiente en la supervivencia. Se han publicado estudios de niveles elevados del antígeno del cáncer, CA15-3 y el oncogén c-erB2, en mujeres con cáncer de mama en comparación con los controles. Otros estudios han informado una regulación a la baja del supresor de tumores DMBT1 en tumores mamarios en ratones y humanos (Blackburn et al., 2007). También se han identificado

cuatro biomarcadores de ARNm que podrían distinguir a los sujetos con cáncer de páncreas de los sujetos con pancreatitis y de control (Zhang et al., 2009). Es probable que haya un mayor esfuerzo para corroborar y extender estos hallazgos en una variedad de tumores sólidos para desarrollar un perfil de diagnóstico temprano.

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello ha sido estudio en múltiples trabajos, para la detección de biomarcadores que puedan ayudar en el diagnóstico de sus etapas de desarrollo, incluido el proceso inicial, la invasión, la recurrencia y el tratamiento. Se han descrito un serie completa de biomarcadores que se relacionan con el cáncer de cabeza y cuello, incluyendo oncogenes (C-myc, c-Fos, C-Jun), antioncogenes (p53, p16), citocinas (TGF- β 1, IL-8 , e IL-1 β), factores de crecimiento (VEGF, EGF e IGF), proteinasas que degradan la matriz extracelular (MMP1, MMP2, MMP9), marcadores de hipoxia (HIF- α , CA-9), marcadores de transición epitelial-mesenquimatoso (E-cadherina, N-cadherina y β -catenina), factores tumorales epiteliales (CYFRA 21-1), citoqueratinas (CK13, 14 y 16), micromoléculas de ARN e hipermetilación de genes relacionados con el cáncer (p16 y DAP-K) (Bilodeau et al., 2010; Williams, 2010; Xie et al., 2008). Estos biomarcadores se han definido mediante técnicas moleculares, transcriptómicas, genómicas, proteómicas, metabolómicas y fenotípicas. Sin embargo, se necesita un mayor desarrollo y validación de estos biomarcadores para la implementación rutinaria en el diagnóstico clínico para ayudar con la detección temprana del cáncer, la evaluación del riesgo y la respuesta a las terapias. El refinamiento de un panel de biomarcadores salivales solubles dependerá de su estabilidad y precisión de detección, incorporación en ensayos sensibles y reproducibles, fáciles de realizar, alta sensibilidad y especificidad para indicar

enfermedades específicas y sus etapas de desarrollo, fácil cuantificación en el laboratorio clínico e integración de la rentabilidad en los algoritmos de diagnóstico clínico (Malamud, 2011).

CONSIDERACIONES ÉTICAS

En relación con los principios que se debe tener en la investigación médica que involucre seres humanos y como en el presente caso, la generación de nuevo conocimiento se tiene como prioridad los derechos de los sujetos de investigación. A continuación, se detallan cada uno de los principios que cumple la investigación aquí registrada.

Autonomía

Este estudio ha sido realizado bajo el consentimiento informado favorable de cada uno de los pacientes incluidos en él. Los investigadores se comprometieron a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los pacientes incluidos en el estudio, en conformidad con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones de materia de información y documentación clínica.

Se realizó la explicación de la recogida de muestras, y de igual forma, se indicó cual era la finalidad del estudio en el cual se iban a incluir. Una vez se tenía aprobación verbal, se realizaba la firma del consentimiento informado escrito, a lo que posteriormente se realizaba la toma de muestra salival y de sangre, luego en el procedimiento quirúrgico se recogían las muestras de tejido.

Beneficencia

Con este estudio se intenta definir cuál es la microbiota tanto de pacientes sanos como de pacientes enfermos de cáncer de laringe y de esta manera reconocer las diferencias significativas que a largo plazo puedan servir como marcador temprano de cáncer de laringe, dado que esta patología hasta el momento no cuenta con marcadores para el diagnóstico precoz y la mayoría de los pacientes se diagnostican en etapas moderadas o severas de la enfermedad.

No-Maleficencia

En ninguna de las fases del estudio (recogida de muestra, procesamiento o análisis) se ha realizado ningún daño sobre los pacientes que aceptaron ser parte del mismo. El principal objetivo ético del estudio ha sido buscar favorecer los pacientes con factores de riesgo para cáncer de laringe con una herramienta para el diagnóstico precoz de su patología y posterior tratamiento.

Justicia

Los pacientes incluidos en el estudio se escogieron de una amplia población, de los cuales los que cumplían los criterios de inclusión y no cumplían los de exclusión fueron incorporados, no excluyendo pacientes que estuvieran en esta categoría. El beneficio que pueda causar los resultados de este estudio puede ser de gran ayuda para el diagnóstico

precoz en pacientes con cáncer de laringe, sin importar sus diferencias socioeconómicas, étnicas o culturales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de Referencia y de Estudio

Población diana

Dentro de la realización de este estudio se ha tomado como población diana los pacientes con diagnóstico, tanto clínico, como anatomopatológico de carcinoma epidermoide con localización laríngea en la Comunidad Autónoma Región de Murcia, España. Esta región, según la Orden del 24 de abril de 2009 (BORN 7 de mayo del 2009), se divide a su vez en 9 áreas de salud (Figura 16). Esta investigación fue desarrollada en el hospital de referencia de la región y correspondiente al área I de salud, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA). Con una capacidad de 863 camas y 27 quirófanos activos, cubre una población de 252.861 habitantes.



Figura 16. Mapa de los hospitales de referencia de las áreas y zonas básicas de salud de la Región de Murcia (Mapa Sanitario 2015).

Población de Estudio

En esta investigación se estudiaron todos los pacientes con edad mayor a 18 años, que pertenecían al área I de salud (Murcia Oeste) o que habían sido derivados de otros centros hospitalarios con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide en localización laríngea y que han sido tratados de forma quirúrgica en el HCUVA.

Muestra

Por medio del servicio de Otorrinolaringología y Biología Molecular se reunieron muestras de saliva y tejidos, con previa firma de consentimiento informado (Anexo I) de los pacientes intervenidos de tumoraciones benignas y malignas de cabeza y cuello, en el HCUVA, durante el periodo comprendido entre enero de 2008 y diciembre de 2012. Obteniendo una muestra total de 179 pacientes. Se implementaron los siguientes criterios para definir la población del estudio:

Criterios de Inclusión

- Edad entre los 18 y 90 años.
- Localización del tumor primario de origen en laringe.
- Diagnóstico de anatomía patológica de carcinoma epidermoide.
- Tratamiento quirúrgico curativo o paliativo en Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

- Obtención de muestra biológica en el quirófano: sangre, saliva, tejido tumoral y sano.

Criterios de Exclusión

- Diagnóstico de anatomía patológica de adenocarcinoma, carcinoma papilar, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma anaplásico, melanoma, linfoepitelioma y paraganglioma.
- Diagnóstico sincrónico de tumor maligno en alguna otra localización del cuerpo.
- Tratamiento previo con quimioterapia o radioterapia.
- Enfermedad metastásica extraganglionar a distancia coexistente con el tumor primario.
- Muestras tumorales o salivares insuficientes, con incapacidad para el estudio microbiológico de microbiota.

Definición de Grupos de Trabajo

Para la selección de casos y controles se tuvo en cuenta que el grupo de casos se seleccionaran atendiendo a los criterios de inclusión y de exclusión establecidos, siendo 20 los pacientes que se incluyeron finalmente como grupo de estudio. En el grupo de control se seleccionaron pacientes que presentaban patología benigna de cuerdas vocales (pólipos o nódulos laríngeos) y que requerían tratamiento quirúrgico para su tratamiento.

VARIABLES DEL ESTUDIO

En cuanto a los datos necesarios para el desarrollo de la propuesta, la siguiente Tabla 12 describe cada una de las variables que se tendrán en cuenta en el presente estudio.

Sección	Nombre	Descripción	Tipo de variable	Valores
Identificación del paciente	Número de registro	Secuencia numérica asignada que cumple criterios de inclusión y no de exclusión	Cuantitativa continua	
Clasificación	Clasificación	Clasificación según criterios de inclusión y exclusión como caso o como control.	Cualitativa	Caso Control
Edad	Edad	Tiempo de vida en años	Cuantitativa Razón Continua	
Sexo	Género	Clasificación genotípica	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = Hombre 1 = Mujer

Sección	Nombre	Descripción	Tipo de variable	Valores
Alcoholismo	Alcoholismo	Consumo \geq 5-6 bebidas alcohólicas/día	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si
Tabaquismo	Tabaquismo	Fumar \geq 15 cig/día	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si
Año de diagnóstico	Año del diagnóstico	En qué año fue diagnosticado el tumor.	Cuantitativa Razón Continua	
Estadio	Estadio del tumor	ESTADIFICACIÓN TNM AJCC UICC 8ª edición.	Cualitativa Nominal	
Patología	Anatomía patológica	Estirpe anatomopatológica del tumor	Cualitativa Nominal Dicotómica	0=No epidermoide 1=Epidermoide
Tratamiento	Laringectomía	Resección quirúrgica de la laringe	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si
	Corpectomía	Resección quirúrgica de cuerda vocal	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si

Sección	Nombre	Descripción	Tipo de variable	Valores
	Vaciamiento cervical	Resección quirúrgica de cadenas ganglionares cervicales y yugulodigástricas.	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si
	Quimioterapia +Radioterapia	Tratamiento conservador de órgano o terapia coadyuvante	Cualitativa Nominal Dicotómica	0 = No 1 = Si
Anatomía	Localización anatómica	Topografía anatómica del tumor	Cualitativa Nominal Dicotómica	Supraglotis Glottis
Microbiota	<i>Rothia</i>	Actinobacteria, grampositiva, no esporulada.	Cuantitativa	OTU
	<i>Porphyromonas</i>	Bacteria gramnegativa, no formadora de esporas, anaerobia, móvil.	Cuantitativa	OTU

Sección	Nombre	Descripción	Tipo de variable	Valores
	<i>Alloprevotella</i>	Bacteria gramnegativa anaerobia.	Cuantitativa	OTU
	<i>Prevotella</i>	Bacteria gramnegativa anaerobia.	Cuantitativa	OTU
	<i>Campylobacter</i>	Bacilos gramnegativos móviles.	Cuantitativa	OTU
	<i>Catonella</i>	Bacteria gramnegativa, anaeróbico no formador de esporas.	Cuantitativa	OTU
	<i>Fretibacterium</i>	Bacteria gramnegativa anaerobia.	Cuantitativa	OTU

Tabla 12. Variables del estudio donde se evidencia la descripción, tipo de variable y valores.

Recogida de Datos

Las fuentes en las cuales se realizó la recolección de datos de los pacientes fueron las siguientes: libro de procedimientos quirúrgicos del servicio de Otorrinolaringología, servicio de codificación clínica del HCUVA y listado de pacientes con muestras biológicas por parte del servicio de Biología Molecular.

Se diseñó un formato de recogida de datos (Anexo III), tomando en cuenta las variables que podrían ser necesarias y fundamentales para la realización del estudio y descritas anteriormente (Pelegrín Hernandez, 2015).

Los datos para la cumplimentación de estos formatos se obtuvieron de la historia clínica de cada uno de los pacientes, recogida en el servicio de documentación y a través del programa informático de información sanitaria "Selene" que se maneja en el HCUVA (Anexo III). Los datos se comenzaron a recopilar desde mayo de 2012 y se terminó en enero de 2013, de manera retrospectiva.

Obtención y Preparación de las Muestras Biológicas

Todas las muestras (saliva, sangre y tejido sano/tumoral) de los pacientes incluidos en el estudio fueron recogidas en el quirófano de Otorrinolaringología, teniendo en cuenta que la saliva y la sangre, se recogieron en la sala de antequirófano, con el paciente en ayunas,

mientras las muestras de tejido (tanto tumoral como sano) se recogieron dentro del procedimiento quirúrgico.

Dentro de los líquidos biológicos del cuerpo humano, la saliva, es uno a los que más fácil acceso se tiene, siendo un compuesto dinámico y complejo que contiene un alto número de componentes. La gran capacidad que tiene la saliva para la detección de situaciones fisiológicas y patologías del cuerpo humano, de igual manera como la relación bien documentada que presenta con bacterias, virus y enfermedad sistemas, hacen de ella el líquido biológico de la elección en nuestro estudio.

La recogida de saliva se realizó por medio de la utilización de lentinis, que se colocaron en la región sublingual durante 10 minutos mientras el paciente se encontraba en la sala de antequirófano. Estas fueron preparadas por el mismo investigador. Debemos aclarar que no se utilizó ningún método para la estimulación de la producción de la saliva previo a la recogida de la misma.

Las muestras de sangre fueron extraídas por el personal de enfermería del hospital. Las muestras de tejido sano y tumoral se recogieron de forma independiente tras la resección quirúrgica de la pieza quirúrgica.

Materiales

Los elementos que se utilizaron en la recogida de muestras de saliva fueron los siguientes:

- Guantes estériles.

- Envase con tapa estéril y hermético.
- Lentinas estériles.
- Pinza de bayoneta estéril.

Obtención De La Muestra

- Como condición, el paciente debía estar en ayunas.
- Colocación de la lentina con la pinza de bayoneta en el espacio sublingual durante 10 minutos.
- Retirar la lentina del espacio sublingual.
- Realizar compresión de la lentina para extraer la saliva de esta sobre el envase estéril (Figura 17).
- Sellar el envase con su tapa.

Transporte y/o Conservación

Luego de recopilación de la muestra para estudio, esta debió ser dirigida al lugar de análisis, siguiendo las siguientes indicaciones:

- Enviar al laboratorio en < 2 horas.
- Sí se prolonga, pueden transcurrir más de 2 horas guardadas en frigorífico a 4°C.

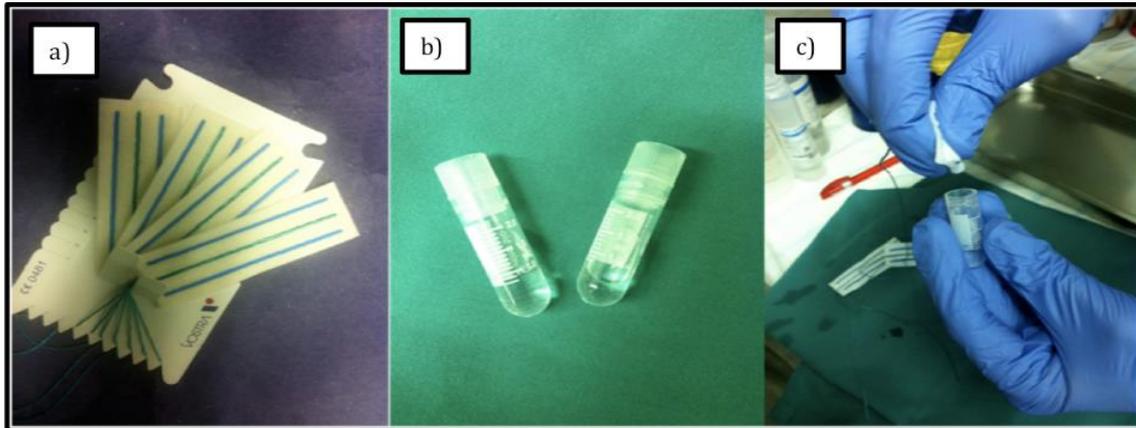


Figura 17. Imagen correspondiente a: a) lentinas para toma de muestra de saliva. b) recipiente para el almacenamiento de la muestra. c) recogida de la muestra y envase de esta.

Después de realizar la toma de muestras, se realizó la identificación de cada una de ellas con la información personal y sanitaria de los pacientes; de igual manera, se asignó un número de paciente para el ingreso a la investigación (Anexo II). Fueron enviadas a la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínico (Laboratorio de Terapia Molecular y Biomarcadores de Cáncer). Allí la muestra fue centrifugada a 2500 rpm, durante 5 minutos, el sobrenadante fue alicuotado, congelado y almacenado a -80°C para su posterior utilización.

Finalmente, para su preparación, las muestras se descongelaron lentamente hasta alcanzar temperatura óptima para análisis de 4°C .

Determinación Metataxonómica de la Composición del Microbiota Salival

En este apartado se describe la metodología usada para determinar la composición de la microbiota salival mediante la amplificación del gen que codifica la subunidad 16S del ribosoma bacteriano, su secuenciación masiva y como se realizó la asignación taxonómica de las secuencias obtenidas.

El gen bacteriano ARNr 16S tiene un tamaño aproximado de 1500 pb y presenta estructura muy conservada. Este gen es utilizado de forma universal para la identificación taxonómica debido a que presenta regiones variables que han acumulado cambios genéticos que nos permite diferenciar bacterias filogenéticamente próximas.

En el presente estudio, se realizó la determinación metataxonómica de la composición de la microbiota salival en los grupos de paciente con carcinoma epidermoide faringolaríngeo, así como de los controles con patología laríngea benigna, en el servicio de Otorrinolaringología del HCUVA.

Extracción del ARN

Para la extracción del ARN se utilizó el robot *MagNA Pure 2.0 LC* (Código 0519768600) y el kit *MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit – Large Volume* (Código 03264793001), ambos de la casa comercial ROCHE (Mannheim, Alemania). A las muestras de saliva se le añadieron tampón PBS 1.5 veces en volumen y se vortearon hasta conseguir una solución homogénea. A continuación, se centrifugaron a 2000 rpm 5 minutos y se recogió el sobrenadante. 500 µl de este sobrenadante fue sometido a la

extracción automática del ADN siguiendo las instrucciones del fabricante de acuerdo con el *protocol total NA external lysis*.

Para valorar una correcta extracción de la muestra, la cuantificación del ADN obtenido de cada muestra se realizó mediante el lector *Qubit Fluorometric Quantitation* (Código Q33226) de la casa comercial ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) mediante el kit *Qubit 1x dsDNA HS Assay* (Código Q33231). La medición de la concentración mediante este lector está basada en emisión de fluorescencia a diferencia de la lectura de la absorbancia ultravioleta que se ha venido utilizando en los últimos tiempos. Con esto se consigue una mayor especificidad de lectura de ADN sobre ARN. La concentración mínima aceptable fue de 5 ng/dL.

Amplificación y Secuenciación del ARN

Los amplicones del gen ARNr 16S bacteriano fueron obtenidos siguiendo el protocolo *16S rDNA gene Megenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol* (Código 15044223 Revisión A), de la casa comercial Illumina (San Diego, California, Estados Unidos). Las secuencias específicas amplificadas están en la región V3 y V4 (459 bp) del gen ARNr 16S. Los *primers* específicos fueron seleccionados a partir de bibliografía vigente al resto (Figura 18) (Klindworth et al., 2013).

16S rDNA gene Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S rDNA gene Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

Figura 18. Nomenclatura IUPAC del Forward primer y Reverse primer utilizados en la secuenciación del gen ARNr 16S bacteriano.

En cada pocillo (96 pocillos por plato) de reacción de PCR se puso el ADN extraído de la saliva a concentración de 5 ng/dL, los *reverse y forward primers* y la ADN polimerada del kit *KAPA HiFi HotStart ReadyMixPCR* (Código KK2602) de la casa comercial Kapa Biosystems (Wilmington, Massachusetts, Estados Unidos), siguiendo el protocolo mencionado. A continuación, se introdujo el plato de muestras en el termociclador y se procedió a realizar el siguiente ciclo de temperaturas:

- Desnaturalización inicial: 3 minutos a 95°C.
- 25 ciclos: 30 segundos a 95°C + 30 segundos a 55°C + 30 segundos a 72°C.
- 5 minutos a 72 °C.
- Fin de la reacción mediante enfriamiento a 4 °C.

Mediante fragmentación enzimática se tuvo que preparar, adaptar, purificar y normalizar los amplicones al modelo de secuenciación Illumina. Se utilizó *Nextera XT index kit v2* (Código FC-131-2001). Para asegurar la normalización del tamaño se procesó 1 μ L del producto de la PCR en un 2100 *Bioanalyzer instrument* usando un *Bioanalyzer DNA 1000 chip* de la casa comercial Agilent (Santa Clara, Estados Unidos). El tamaño esperado debe ser sobre 550 bp.

Las librerías de amplicones han sido secuenciadas en un *MiSeq Sequencer* de la marca Illumina (San Diego, California, Estados Unidos) tomando en cuenta y siguiendo las especificaciones dadas por el fabricante, usando el *MiSeq Reagen kit v3* (Código MS-10223001). Este sistema Illumina funciona con un método de secuenciación basado en la polimerización del ADN, donde la incorporación de un nucleótido marcado con fluorescencia y protegido en la cadena naciente impide que siga creciendo. Luego de detectar la señal fluorescente se elimina el grupo protector pudiéndose incorporar otro nucleótido marcado e iniciar un nuevo ciclo. Esto se realiza por medio de un cartucho de un solo uso que contiene reservorio con sello metálico prerrellenados con los reactivos de secuenciación y clustering, junto con una *Flow cell* que consiste en una placa con carriles hechos de vidrio donde las reacciones de secuenciación se producen. La secuenciación se realizó usando un ciclo 2x300pb *paired-end*, como recomienda el fabricante. La mezcla de amplicones fue reforzado con *PhiX control* (código F-110-3001) con el fin de mejorar la incorporación de bases durante la secuenciación como recomienda el fabricante.

Análisis Bioinformático de las Secuencias de Amplicones del Gen Bacteriano ARNr 16S y

Asignación Taxonómica

El análisis bioinformático fue llevado a cabo en diferentes etapas. Primero, se ejecutó un control de calidad de las secuencias obtenidas y una eliminación de las secuencias quiméricas, entre otros procesos de filtrado posteriormente se realizó la asignación taxonómica. El formato de los archivos de las secuencias obtenidas en bruto fue FASTQ, que suele ser el estándar actual y es el que proporciona el sistema de secuenciación Illumina.

Para realizar un control de calidad se realizó un filtrado y recorte (*trimming*) de las secuencias con el objetivo de eliminar aquellas cortas o de baja calidad. De esta manera aseguramos una buena asignación taxonómica (Schmieder & Edwards, 2011). Este proceso fue realizado mediante el programa prinseq-lite (<http://prinseq.sourceforge.net>). Se utilizó una longitud mínima de 50 nucleótidos (*min_length:50*). De la misma forma se aplicó un recorte de base por base desde la derecha, midiéndose que la calidad no bajara del umbral de 30 en una ventana de 20 nucleótidos usando la media (*trim_qual_right:30, trim_qual_type: mean, trim_qual_window:20*). Se debe saber que los sistemas Illumina proveen las secuencias desaparejadas R1 y R2 (*forward/reverse*), y estas deben ser aparejadas para obtener un amplicón completo.

Posteriormente se realizó otro control de calidad, mediante el *pipeline* DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/index.html>), para la corrección de errores que puede

producir Illumina durante la amplificación. Se hizo un *trimming* a 280 y 2010 bp en R1 y R2, se unieron y luego se buscaron las secuencias quiméricas para eliminarlas. Se reconoce como una secuencia quimérica a los productos erróneos de una amplificación, siendo detectados por que los extremos difieren mucho en cuanto a su asignación taxonómica. El pipeline DADA2 utiliza un método novedoso de corrección de errores dado que es capaz de discriminar con mejor exactitud los errores de amplificación de secuencias biológicas variantes (Callahan et al., 2016).

Para el análisis metataxonómico de las secuencias genéticas se empleó el programa QIIME 2 (<http://qiime.org>), por medio del cual, y utilizando *plugins*, se pudo realizar la amplia mayoría de los análisis necesarios para el estudio de la microbiota, estadísticas y obtención de gráficas. Mediante un *pipeline* diseñado específicamente a tal efecto, escrito en entorno RStatistics (<https://cran.rproject.org/index.html>) se concatenan todos los pasos y se reproduce el flujo de trabajo desde que obtenemos las secuencias hasta el informe final.

La asignación de la clasificación taxonómica fue realizada utilizando la base de datos SILVA_release_132 (<https://www.arb-silva.de>) (Quast et al., 2013). Para realizar las afiliaciones taxonómicas se utilizó un clasificador bayesiano *naive* (<http://github.com/qiime2/q2-feature-classifier>) integrado en QIIME 2. Cada unidad taxonómica operativa (OTU) correlacionó por definición en un 97% con la secuencia que se reconozca de la base de datos.

Los estudios ecológicos de diversidad y riqueza fueron realizados mediante el *plugin* *Communitu* *Ecology* *Packager* (<https://cran.r-project.org/web/package/vegan/index.html>).

Expresión de Resultados

Los resultados que se han obtenido en el estudio se expresan de forma original como abundancia relativa en porcentajes de los phylum, clase, orden, familia y género. De esta manera, para poder comparar la microbiota salival entre los dos grupos de estudio, tanto patológicos como sanos, se implementó los conceptos de diversidad y riqueza.

Estructura de las Comunidades Microbianas

Cuando se habla de los ecosistemas microbianos se puede observar que tienden a tener pocas especies con muchos individuos o, al contrario, muchas especies con pocos individuos. Sí se quiere definir la diversidad específica del nivel trófico y en general del nicho ecológico, se debe tener en cuenta fundamentalmente las especies menos abundantes. Cuando alguna de las poblaciones del nicho ecológico aumenta su densidad debido a que supera la competencia y domina el ecosistema, se dice que la diversidad disminuye. Estudiar la diversidad de especies nos permite identificar una gran variedad de respuestas secundaria a los cambios dinámicos que puede sufrir el ecosistema. Tomando como ejemplo el ecosistema de este estudio, con la microbiota salival, regida

por factores biológicos, la estabilidad se puede asociar a una elevada diversidad, sin embargo, no es posible definir una causa – efecto determinada.

Las poblaciones ecológicas, como la microbiota salival, con elevada diversidad, no presentan una única población, por lo tanto, si se elimina alguna de esas poblaciones, no se alteraría la estabilidad de la misma, aunque hasta el momento no se sabe que tanto debe ser la disminución en la diversidad, para alterar la estabilidad de ese ecosistema.

El hecho de que los ecosistemas diversos puedan aguantar fluctuaciones y agresiones de los factores biológicos que los modifican, no quiere decir que al tener un estímulo constante de los mismos no puedan llegar a cambiar, dando como resultado la disbiosis del nicho. (Atlas RM, 2002)

Diversidad y Riqueza de la Microbiota

La manera más sencilla para hablar de la riqueza de la microbiota de un ecosistema es el número de OTUs diferentes que presenta, sin tener en cuenta que tan abundantes con cada una. Se utilizan algunos índices estadísticos para evitar el error de muestreo y la realización de curvas de rarefacción.

El concepto de diversidad fue introducido por Whittaker en 1972, refiriéndose a la medida de la heterogeneidad de una comunidad en función de la riqueza y la abundancia de las especies. La diversidad permite distinguir entre dos comunidades con idéntica

riqueza, en la cual las especies difieren en cuanto a su abundancia relativa (Whittaker & Whittaker, 1972).

La diversidad tiene dos componentes importantes que permiten una mejor caracterización, la diversidad alfa y beta.

Diversidad Alfa (α)

La diversidad alfa se define como la riqueza de especies de una comunidad particular a la que se considera homogénea, cuyo tamaño determina el número de especies por la relación área-especies, en la cual a mayor área mayor cantidad de especies. (C. E. Moreno, 2001).

Teniendo en cuenta nuestro estudio, la diversidad alfa es vista como el número de OTUs diferentes en un grupo de pacientes, teniendo en cuenta la riqueza de OTUs y la abundancia relativa de ellas. Se considera un concepto importante dentro de esta área, dado que las enfermedades, tanto inflamatorias, como infecciosas o tumorales que afectan el área de cabeza y cuello se han correlacionado con la disminución de la diversidad de la microbiota salival, probablemente por el sobrecrecimiento de otras poblaciones que terminan causando una disbiosis de la microbiota habitual. (Morgan XC, 2012).

Para entender los resultados de los índices de alfa diversidad hay que partir de dos premisas: A igualdad de OTUs, la alfa diversidad es máxima cuando todas las OTUs están

en igual proporción, y a igualdad de uniformidad, la alfa diversidad es mayor cuanto mayor sea el número de OTUs diferentes (Atlas RM, 2002).

Índice para Cuantificar la Diversidad Alfa y Riqueza

Índice de Shannon – Wiener

El índice de Sharon es un instrumento que combina la información de la riqueza de especies y la equidad en lo que se llama diversidad o heterogeneidad. Una herramienta útil a la hora de cuantificar la alfa diversidad de una comunidad microbiana como la salival (Magurran, 2004; C. Moreno, 2006). Este índice hace parte de los índices estadísticos basados en las estructuras de las comunidades, expresando la uniformidad de los valores de importancia de todas las especies de la muestra. Dentro de este índice se tiene en cuenta la abundancia de cada OTUs y cuanto de uniformemente se encuentra distribuida en la comunidad. Además, mide el grado promedio de incertidumbre, es decir, predice a que OTUs pertenece un individuo escogido al azar dentro de la comunidad. (BAEV PV, 1995; Magurran, 2004; Peet, 1974).

La fórmula matemática por la cual se expresa es (Oksanen et al., 2022):

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log_b p_i$$

Donde:

H' = Índice de Shannon-Wiener.

\ln = Logaritmo natural (\log_e).

P_i = Abundancia proporcional de especie i , es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra = Abundancia relativa.

Este índice toma valores entre 0, cuando hay una sola OTU, y de logaritmo de S cuando todas las OTUs están representadas por el mismo número de individuos. En la práctica suele tomar un valor máximo de 5 cuando se implementa en comunidades biológicas.

Existen dos maneras para que el índice de Shannon aumente. La primera, cuando aumenta la riqueza de la comunidad, y la segunda, cuando se produce un aumento en la equitatividad de la representación en la abundancia relativa de cada OTU.

Se considera que las microbiotas de diversidad media sitúan el valor del índice de Shannon entre 1.5 y 3, siendo consideradas microbiotas con baja diversidad las que se encuentran por debajo de 1,5 y microbiotas muy diversas las que están por encima de 3.

Índice de Dominancia de Simpson

El índice de Simpson es otro método utilizado para determinar la diversidad de una comunidad basado en la estructura de la misma; este se centra en la dominancia. Este índice es inverso al concepto de equidad de la comunidad, porque toma en cuenta las OTUs con mayor importancia sin considerar al resto de OTUs, siendo menos sensible con

la riqueza de las especies. (Anne E. Magurran, 1988; FEINSINGER, 2003; Krebs & Price, 1973). Esta influenciado por los OTUs más comunes, como consecuencias son más sensibles a los cambios en la igualdad (C. E. Moreno, 2001).

Para calcular el índice de Simpson se utiliza la fórmula (Oksanen et al., 2022):

$$D_1 = 1 - \sum_{i=1}^S p_i^2$$

Donde P_i es la abundancia relativa de cada OTU.

Otra manera de expresarlo es como índice de Simpson invertido (Oksanen et al., 2022):

$$D_2 = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2}$$

Si el valor del índice de Simpson se acerca a 1 existirá una mayor diversidad alfa, y si el valor se acerca a 0, habrá una mayor dominancia por parte de una OTU y una menor heterogeneidad de OTUs. De forma pragmática podríamos considerar a una microbiota como poco diversa en base a este índice si su valor está por debajo de 0.35.

Estimador CHAO1

Este estimador muestra la riqueza mediante un modelo no paramétrico, basado en el número de OTUs *raras* (Chao, 1978). Estima el número de OTUs esperadas teniendo en cuenta la relación entre el número de OTUs representadas por un individuo (*singlentions*) y el número de OTUs representadas por 2 individuos (*doubletons*). Por medio de este estimador podemos saber si el muestro ha sido adecuado, puesto que, si el valor CHAO1 es mayor al total de observaciones, el muestreo habrá sido insuficiente.

La fórmula por la cual se determina es (Oksanen et al., 2022):

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2F_2}$$

S = número total de OTUs.

F1 = *singlentions*.

F2 = *doubletons*.

Estimador ACE (Abundance – Based Coverege Estimator)

Al igual que el anterior, es un estimador no paramétrico, pero estima la riqueza en base a OTUs abundantes y raras, tomando un valor umbral para separar ambos grupos (Chiu et al., 2014).

La fórmula para calcularlo es (Oksanen et al., 2022):

$$S_P = S_{abund} + \frac{S_{rare}}{C_{ace}} + \frac{a_1}{C_{ace}} \gamma_{ace}^2$$

$$C_{ace} = 1 - \frac{a_1}{N_{rare}}$$

$$\gamma_{ace}^2 = \max \left[\frac{S_{rare} \sum_{i=1}^{10} i(i-1)a_i}{C_{ace} N_{rare} (N_{rare} - 1)} - 1, 0 \right]$$

a_i = número de OTUs con abundancia i .

S_{rare} = número de OTUs raras.

S_{abund} = número de OTUs abundante.

N_{rare} = número de individuos que hay con OTUs raras.

La interpretación es la misma que con el estimador CHAO1 y se acompaña de un error estándar.

Representación Gráfica de los Índices de Alfa Diversidad y Estudio de Diferencias

Estadísticamente Significativas entre los Grupos

La representación gráfica de estas variables fue realizada por medio de un boxplot o diagrama de cajas. Para valorar si existieron diferencias estadísticamente significativas a nivel de cualquiera clasificación taxonómica de los índices estadísticos medios de alfa diversidad de los dos grupos de estudio, se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon (Hollander et al., 2013). El valor de $P < 0.05$ se estimó como nivel de diferencia estadísticamente significativa.

Curvas de rarefacción

Esta técnica desarrollada por Sanders (1968) y corregida por Hulbert en 1971 compara el número de OTUs entre comunidades cuando el tamaño de la muestra no es igual. Se basa en calcular el número esperado de OTUs si todas las muestras fueran reducidas a un tamaño estándar, es decir, reduce el tamaño de la muestra mayor para equipararla con la muestra menor, puesto que sabe que la riqueza va a aumentar con el tamaño muestral y se debe descartar que las diferencias de riqueza obtenidas no se deban a ello. Se muestra el número de OTUs estadísticamente esperado según se incrementa el esfuerzo de muestreo (Gotelli & Colwell, 2011).

Las curvas de rarefacción estiman el número medio de OTUs a través de submuestras repetidas al azar de “ n ” individuos a partir de la muestra original más grande. Nos permite construir una curva entera en la cual el número de individuos submuestreados al azar se

encuentran en un rango que va de 1 a N. Esta curva se espera llegue a ser asintótica para asegurar que se realizó un buen muestreo de acuerdo con el número de OTUs identificados (Gotelli & Colwell, 2011).

La fórmula matemática para calcular el número de OTUs esperada en una microbiota rarificada desde N a n ($N < n$) individuos es (Oksanen et al., 2022).

$$\hat{S}_n = \sum_{i=1}^S (1 - q_i) \quad q_i = \frac{\binom{N-x_i}{n}}{\binom{N}{n}}$$

X_i = es el total de OTUs i .

q_i = probabilidad de que la OTU i no aparezca en una muestra de tamaño n . Sólo será de valor positivo si $N - x_i \geq n$.

Diversidad Beta (β)

La diversidad beta o diversidad entre hábitats es el grado de reemplazamiento de especies o cambio biótico a través de gradientes ambientales. (Whittaker & Whittaker, 1972). Aplicado a nuestro estudio se puede definir como las diferencias que existen en cuanto a la composición de dos muestras diferentes. Esta diversidad está basada en proporciones y no tiene un valor máximo, entre más alto sea el valor del índice beta, menor será el número de especies compartidas entre las comunidades.

Índices para Cuantificar la Beta Diversidad

Índice de Similitud De Jaccard

Este índice expresa el grado en que dos muestras son semejantes por la composición de sus OTUs de forma cualitativa.

La fórmula que la representa es:

$$I_j = C / (a + b + c)$$

a = número de OTUs de la muestra A.

b = número de OTUs de la muestra B.

c = número de OTUs compartidas entre ambas muestras.

Los valores de este índice pueden ir desde 0 cuando no existe ninguna OTU compartidas, hasta 1 cuando todas las OTUs estudiadas están compartidas por igual en ambas muestras.

Tanto para el grupo de casos como de controles, se calculó el índice de Jaccard. Los datos que fueron obtenidos se representaron mediante un *boxplot*. Para observar si existían diferencias estadísticamente significativas a nivel de cualquiera clasificación taxonómica de los grupos de estudio se realizó el test no paramétrico de Wilcoxon (Hollander et al., 2013). Se estimó como nivel de diferencia estadísticamente significativa un valor de $P < 0.05$.

Análisis Principal de Componentes (PCoA, Principal Component Analysis)

El análisis principal de componentes (PCoA) se define como una técnica estadística multivariante de reducción de dimensiones (número de variables). Pretende sintetizar en un espacio de 2 dimensiones, representado por un *biplot*, la varianza en una nube de puntos multivariada, que serían las diferentes muestras. Nos muestra una visión general de la relación linear que existe entre nuestras muestras y las variables, en este caso las abundancias relativas en los diferentes rangos taxonómicos. Con esto podemos transformar un amplio conjunto de variables correlacionadas en un conjunto reducido de nuevas variables, que explica mejor la variación de los datos. (Buttigieg & Ramette, 2014).

Se usan combinaciones lineales de las variables originales para construir y obtener los PCs (*Principal Component*). Basándose en la matriz ($n \times p$) siendo n el número de muestras y p el número de variables, rotándose el espacio teórico p -dimensional para obtener una representación bidimensional que mostrará la mayor variabilidad posible. El primer PC es el eje que pasa por el centroide la nube de puntos y minimiza la distancia de cada punto a ese mismo eje, por tanto, ese eje maximiza la variabilidad de la nube de puntos. El segundo PC se construye de igual forma, pero ha de ser independiente del primer eje, por tanto, ha de ser ortogonal y también pasar por el centroide. Con el segundo PC se explica la mayor variabilidad no explicada por primer PC.

Si se representa la ubicación de los objetos en un *biplot* con nuestros PC como ejes podemos deducir si hay grupos de estudio similares o diferentes.

En el *biplot* las muestras agrupadas estarán correlacionados, si estas se representan en zonas opuestas, tendrán correlación negativa y si es en ángulo recto no existiría correlación (Figura 19).

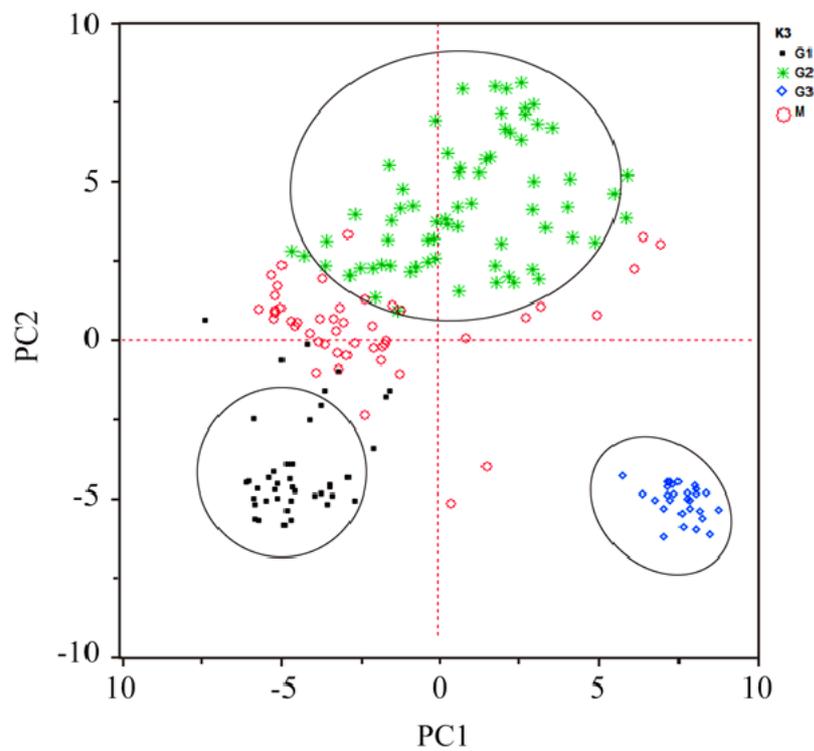


Figura 19. Ejemplo de *biplot* construido mediante PCoA de dos dimensiones que permite visualizar 3 subgrupos (P. et al., 2015).

Los gráficos se construyeron mediante el plugin para Qiime2 *qiime2-qiime-diversity-core-metrics-phylogenetic*.

Análisis UniFrac

Este método nos muestra un análisis de comparación de comunidades microbianas, por ejemplo, la de microbiota salival en nuestro estudio. Es una medida de distancia que incorpora información de proximidad filogenética entre las secuencias estudiadas. Se calcula un índice para cada par de muestras. Todas las secuencias encontradas en cada par de muestras se estructuran en un árbol filogenético, pudiendo aparecer cada secuencia en la muestra A, en la muestra B o en ambas muestras (se descartan las ramas cuyas secuencias no aparecen ni en A ni en B).

Se calcula como la suma de la longitud de las ramas cuyas secuencias aparecen en una sola muestra (A o B) dividido entre la suma de las longitudes de todas las ramas del árbol.

Este método explora el grado de divergencia entre las diferentes secuencias que hemos obtenido, dejando ver la distancia métrica entre muestras. De igual manera, podemos comparar muchas muestras simultáneamente utilizando un análisis de coordenadas principales, al igual que con el análisis PCoA, porque podemos obtener una matriz de distancias (Figura 20).

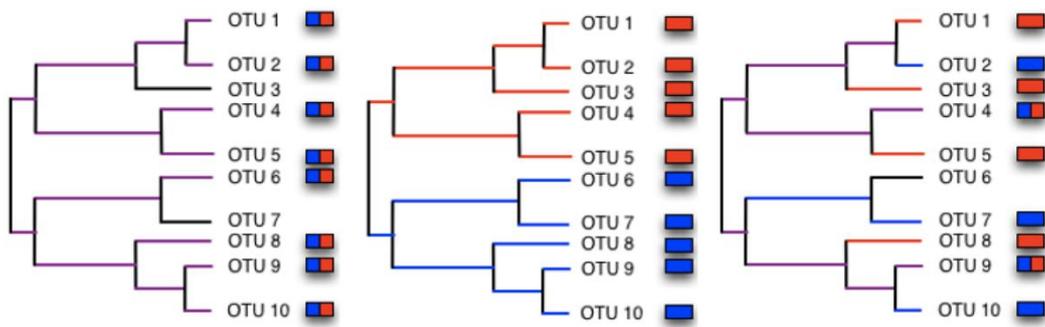


Figura 20. Representación hipotética de una comunidad bacteriana. 10 OTUS en dos muestras (azul y rojo).

El concepto UniFrac hace referencia al porcentaje de longitud de las ramas filogenéticas únicas para cada muestra a estudio. Si se presenta una comparación de comunidades idénticas el valor será cero, y cuando sean totalmente diferentes será de 1. El método UniFrac balanceado o weighted tiene en cuenta las abundancias relativas que existen en los rangos taxonómicos, por tanto, enfatiza en los grupos dominantes. Por otra parte, el método UniFrac desbalanceado o unweighted solo tiene en cuenta la presencia o ausencia, enfatizando más en los grupos menos comunes, de forma general.

De esta manera este método mide la disimilitud entre dos colecciones de secuencias como la cantidad de secuencias que son únicas para cada una de las colecciones, medida como la fracción del brazo filogenético que conduce a brazos descendentes de una de las dos muestras.

Las distancias UniFrac fueron calculadas mediante el plugin para Qiime2 *qiime2-qiime-diversity-tare-metrics-phylogenetic*. Se utilizó el visualizador Emperor (<https://emperor.microbio.me>) para obtener los gráficos en 2 dimensiones del análisis principal de componentes, correspondiente a cada eje la varianza asignada.

Estudio de la Composición de la Microbiota Salival

Para poder valorar las diferencias en la composición de la microbiota salival de los casos y controles de este estudio se analizará la media de las abundancias relativas a nivel de *phylum* y género, y aplicaremos el test de Wilcoxon para valorar diferencias estadísticamente significativas.

Curvas de eficacia diagnóstica (Curvas ROC)

Se considera un método estadístico para evaluar la exactitud de los exámenes diagnósticos que utilizan escalas continuas para tres propósitos específicos: determinar el punto de corte en el que se alcanza la sensibilidad y especificidad más altas, evaluar la capacidad discriminativa del exámenes diagnóstico y comparar la capacidad discriminativa de dos o más exámenes diagnósticos que expresan sus resultados como escalas continuas (López & Pita, 1998; Martínez Pérez & Pérez Martin, 2023).

Para desarrollar estas curvas es necesario calcular la sensibilidad y la especificidad para todos los posibles puntos de corte. La sensibilidad o proporción de verdades positivos se ubica en el eje de ordenadas y el complemento de la especificidad ($1 - \text{especificidad}$) o

proporción de falsos positivos, en las abscisas. Los dos ejes pueden tomar valores en 0 y 1 (0 a 100%). La curva ROC se dibuja uniendo los par de valores correspondientes a cada punto de corte (Figura 21) (Martínez Pérez & Pérez Martín, 2023).

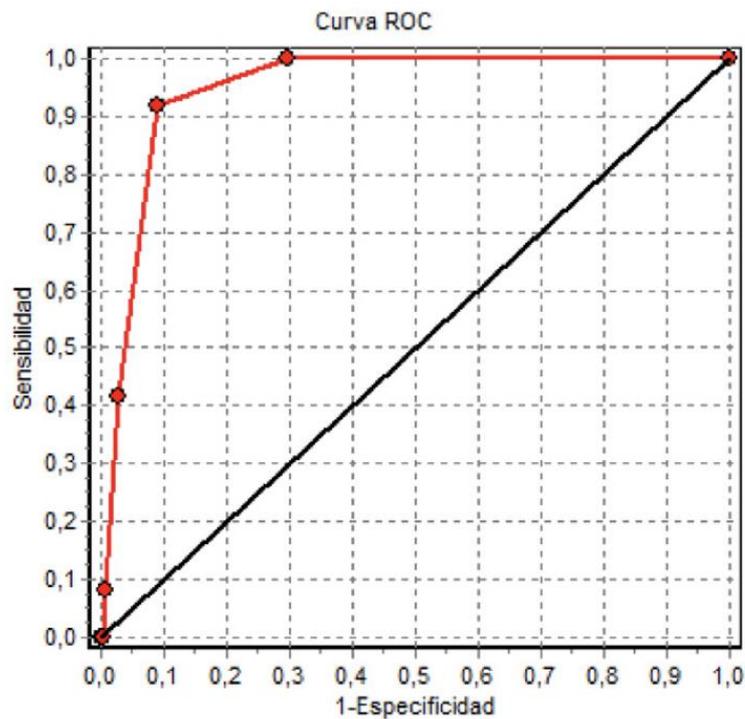


Figura 21. Ejemplo que representa curva ROC con la sensibilidad en el eje de la Y y 1 – Especificidad en el eje de las X.

Punto de Youden

Se considera como el punto de corte que determina la sensibilidad y especificidad más alta a través de la suma de la sensibilidad y especificidad - 1. Gráficamente corresponde al punto de la curva ROC más cercano al ángulo superior – izquierdo del gráfico, es decir, donde se presenta una sensibilidad y especificidad del 100%. Sin embargo, no siempre

este punto de corte determina la sensibilidad ni la especificidad más alta del test. Por lo general, la sensibilidad más alta indica un punto de corte, mientras que la especificidad más alta indica otro, y en ocasiones es importante tener un examen diagnóstico muy sensible o específico. La mejor opción en este caso es elegir el punto de corte con la mayor sensibilidad o especificidad, dependiendo del objetivo (Díez Herranz & Tobal González, 1997; Martínez Pérez & Pérez Martín, 2023).

Área bajo la curva (AUC)

Se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano y uno enfermo seleccionados al azar al aplicarse la prueba. Mide la capacidad discriminativa de la prueba. La AUC refleja que tan bueno es la prueba que queremos utilizar para discriminar los pacientes que en realidad presentan enfermedad y los sanos a lo largo de todo el rango de puntos de corte posibles (Martínez Pérez & Pérez Martín, 2023).

Una prueba con discriminación perfecta (sensibilidad igual a 1 y especificidad igual a 1) se puede representar como una curva ROC situada en el lado izquierdo – superior del gráfico. Si la curva no fuera discriminativa, se representaría como una diagonal que atraviesa el gráfico (López & Pita, 1998).

Según el área que se obtiene, se puede definir el grado de discriminación de la prueba. Cuando se acerque a 1, más discriminativa será, y cuando se aproxime a 0,5, menos

discriminativa será. Una curva con un valor de 0.75 la consideramos como una prueba de discriminación media (Figura 22) (Martínez Pérez & Pérez Martin, 2023).

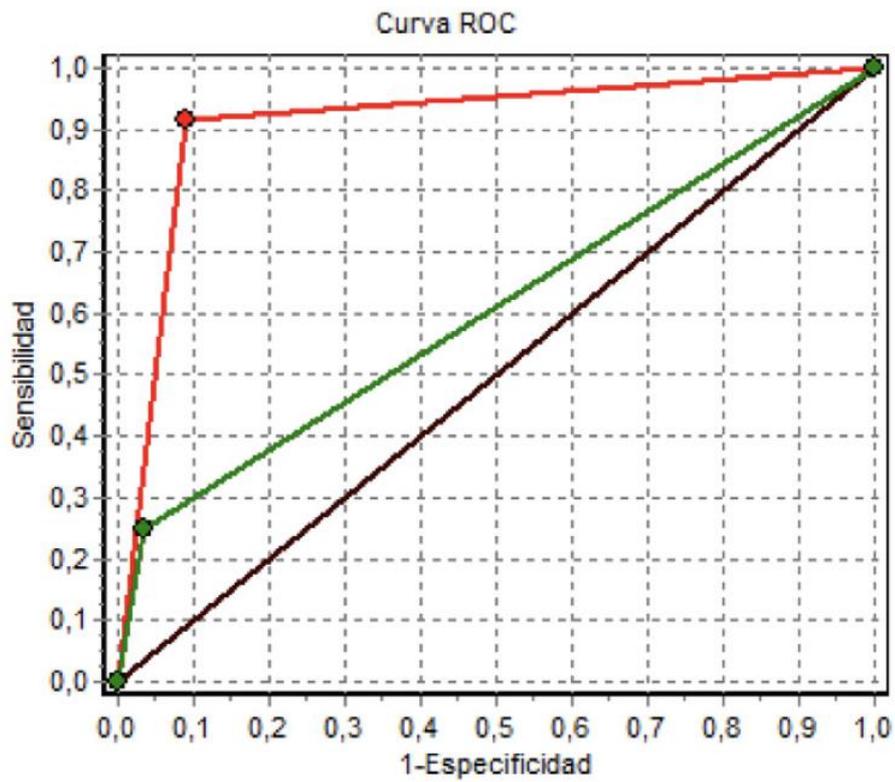


Figura 22. Representación de la discriminación de 1 (línea roja), 0,5 (línea negra) y 0,75 (línea verde).

RESULTADOS

Características Clínico – Patológicas de los Pacientes a Estudio

Se evidencia una población homogénea en cuanto a la edad en los dos grupos. Se incluyeron 8 pacientes menores de 60 años tanto en casos como en controles, correspondiendo al 40% en cada grupo respectivamente. Entre 60 y 69 años se encuentran 8 pacientes en grupo de casos y 9 en controles, representando 40% y 45% respectivamente. Pacientes mayores de 70 años correspondieron a 4 en casos y 3 en controles, 20% y 15% respectivamente. El 85% de los casos fueron hombres y 15% mujeres, parecido a los controles donde también se mostró una predominancia del género masculino con 70%. Los características de los pacientes incluidos en el estudio y de su patología están resumidas en la Tabla 13.

Dentro de los factores de riesgo se encontró que el 100% de los casos presentaban tabaquismo y solo el 70% de los controles. En cuanto al alcoholismo se presentaba en el 50% de los casos y 45% de los controles.

La localización más frecuente del tumor fue en la glotis con 14 pacientes y supraglotis con 6 pacientes, correspondiendo al 70% y 30% respectivamente. La mayoría de los pacientes del estudio se presentaron en un tamaño tumoral según la clasificación TNM, en T3 con un 60%, seguido de un T2 con 20% y luego T1 y T4 con 10% en cada uno de ellos. En cuanto a las adenopatías metastásicas regionales se encontraron un 85% en N0 y un 5% en N1, N2 y N3, sin ningún caso en N4. El principal estadio de presentación ha sido III con el 50% de los casos. Con respecto a la estirpe de los tumores diagnosticados,

en su totalidad fueron carcinoma epidermoide. El tratamiento que se realizó a los casos fue predominantemente la laringectomía, ya sea total o parcial, en el 75% de los pacientes, el 50% del total necesitó vaciamiento cervical y un 25% radio – quimioterapia coadyuvante.

Características		Casos (%)	Controles (%)
Edad	< 60 años	8 (40)	8 (40)
	60 – 69 años	8 (40)	9 (45)
	> 70 años	4 (20)	3 (15)
Género	Hombre	17 (85)	14 (70)
	Mujer	3 (15)	6 (30)
Tabaquismo	Si	20 (100)	14 (70)
	No	0 (0)	6 (30)
Alcoholismo	Si	10 (50)	9 (45)
	No	10 (50)	11 (55)
Localización	Supraglotis	6 (30)	--
	Glottis	14 (70)	--
Clasificación tamaño (T)	T1	2 (10)	--
	T2	4 (20)	--
	T3	12 (60)	--
	T4	2 (10)	--
	N0	17 (85)	--

Adenopatías cervicales (N)	N1	1 (5)	--
	N2	1 (5)	--
	N3	1 (5)	--
	N4	0	--
Estadio	I	2 (10)	--
	II	4 (20)	--
	III	10 (50)	--
	IV	4 (20)	--
Estirpe	Epidermoide	20 (100)	--
	Otros tipos	0 (0)	--
Tratamiento	Laringectomía	15 (75)	--
	Corpectomía	5 (25)	--
	Vaciamiento cervical	10 (50)	--
	Quimio - radioterapia	5 (25)	--

Tabla 13. Descripción de las características sociológicas y clínico – patologías de los grupos de casos y controles.

Análisis de la Composición de la Microbiota Salival

Descripción y Comparación del Rango Taxonómico Familia de los Grupos de Casos y Controles

Dentro de los resultados, en cuanto al rango taxonómico familia (Tabla 14), la familia más frecuentemente encontrada, teniendo en cuenta la media de secuencias en la secuenciación masiva son la familia de Micrococcaceae, con una media de 18878,95 y una desviación estándar de 15862,185 en los casos y 6067,65 con DS de 4019,541 en los controles (Figura 23). Seguido de la Familia XIII que muestra una media de 1562,05 en los controles y de 801,15 en los casos. La familia Campylobacteraceae muestra una media de secuencias en el grupo de control de 1473,05 y de 179,65 en el grupo de casos estudiado. Las secuencias de la familia Peptostreptococcaceae tienen una media en los controles de 1419 y de 1244,40 en los caso. La familia Ruminococcaceae presenta una media de secuencias de 975,85 en el grupo control y de 930,40 en el grupo de casos. Por último, entre las familias con más secuencias identificadas, la Familia XI con una media de 751,05 en los controles y una media de 598,95 en los casos. (Figura 24).

Identificación de gérmenes en rango taxonómico de familia en grupo de casos y controles								
FAMILIA	CONTROLES n = 20				CASOS n = 20			
	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Micrococcaceae	6067,65	4019,541	1301	15668	18878,05	15862,185	3325	55007
Bacteroidales Incertae Sedis	72,10	137,926	0	570	2,95	8,319	0	36
Porphyromonadaceae	9,45	13,679	0	56	0,00	0,000	0	0
Prevotellaceae	627,70	636,808	6	2666	9,60	14,365	0	60
Flavobacteriaceae	1,45	2,564	0	9	0,00	0,000	0	0
Campylobacteraceae	1473,05	1861,362	67	7062	179,65	607,109	0	2737
Family XI	11,25	14,563	0	44	48,15	79,582	0	294
Clostridiales vadinBB60 group	12,70	30,548	0	135	,45	2,012	0	9
Defluviitaleaceae	20,65	36,289	0	151	,35	1,565	0	7
Eubacteriaceae	13,60	38,963	0	170	10,30	27,517	0	122
Family XI	751,05	567,655	54	1813	598,85	1115,895	0	5005
Family XIII	1562,05	1591,720	350	6951	801,15	924,561	0	2704
Peptostreptococcaceae	1419,00	1163,761	129	4070	1244,40	1748,966	0	6302
Ruminococcaceae	975,85	1130,250	36	3718	930,40	2195,926	0	9823
Candidate division SR1 bacterium MGEHA	186,80	448,605	0	1998	24,65	62,697	0	272
—	447,60	844,877	0	3606	47,65	151,044	0	678
Gracilibacteria bacterium oral taxon 872	237,25	798,742	0	3587	1,10	3,478	0	15
Xanthobacteraceae	5,80	10,486	0	36	12,70	14,045	0	63
Pasteurellaceae	5,70	8,355	0	29	10,40	41,491	0	186
Synergistaceae	102,45	128,181	0	401	1,85	3,897	0	11

Tabla 14. Identificación de gérmenes en rango taxonómico de familia en grupo de casos y controles.

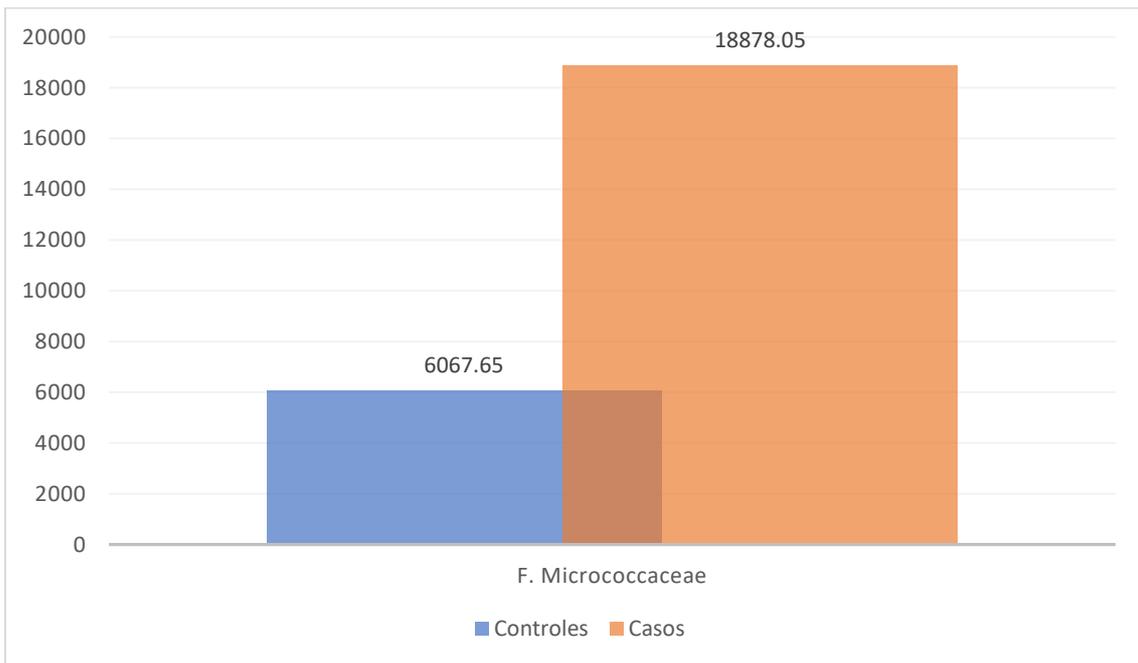


Figura 23. Diferencia presentada en el familia Micrococcaceae entre las muestras de casos y controles.

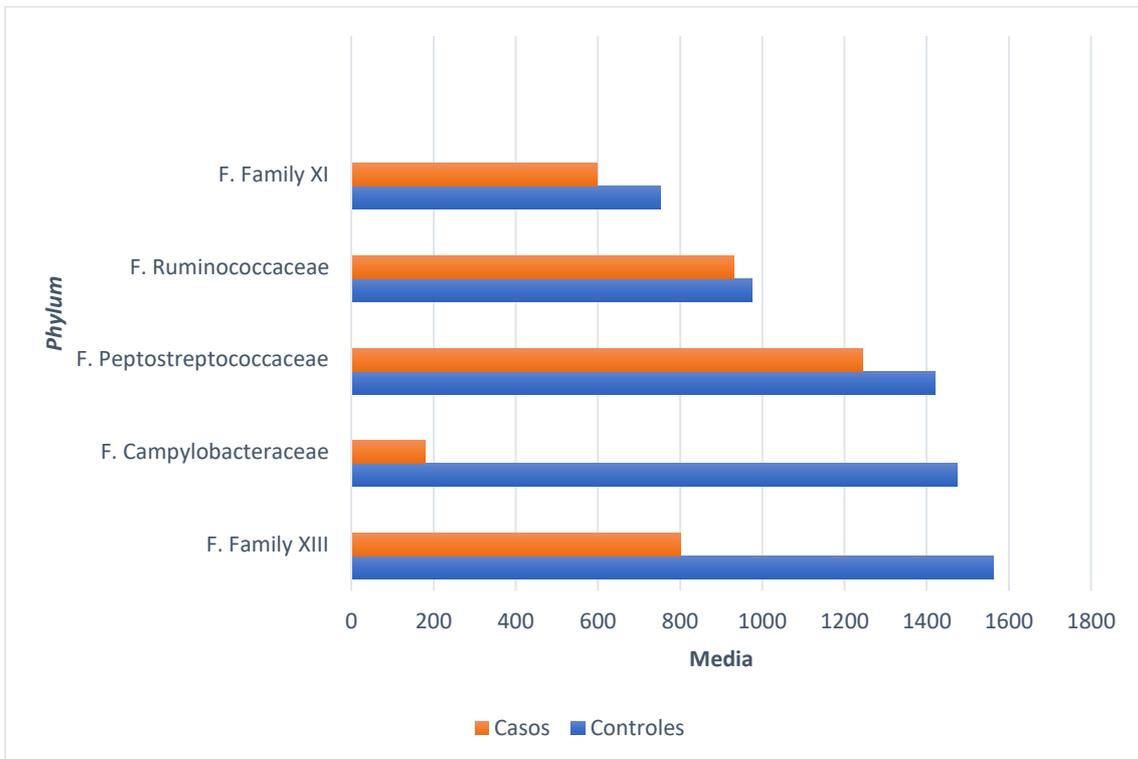


Figura 24. Diferencia entre la media de cadenas más frecuentemente identificadas en grupo de casos y controles a nivel familia.

Otras familias que también fueron identificadas son Prevotellaceae con una media de secuencias de 627,70 en controles y 9,6 en casos, y Gracilibacteria bacterium oral taxon 872 que muestra una media de 237,25 en el grupo de controles y 1,10 en el de casos. Porphyromonadaceae presenta una media de 9,45 en el grupo control y ausencia en el grupo de casos; Clostridiales vadinBB60 group tiene media de 0,45 en casos y 12,70 en controles. Eubacteriaceae en el grupo de casos tiene una media de 10,30 y en controles 13,60. Xanthobacteraceae tiene media en controles de 5,80 y 12,70 en casos. Por último, Pasteurellaceae presenta una media de 5,70 en controles y de 10,40 en casos.

En la Figura 25 y 26 se expone gráficamente la comparación de las familias encontradas en los controles y en los casos por separado.

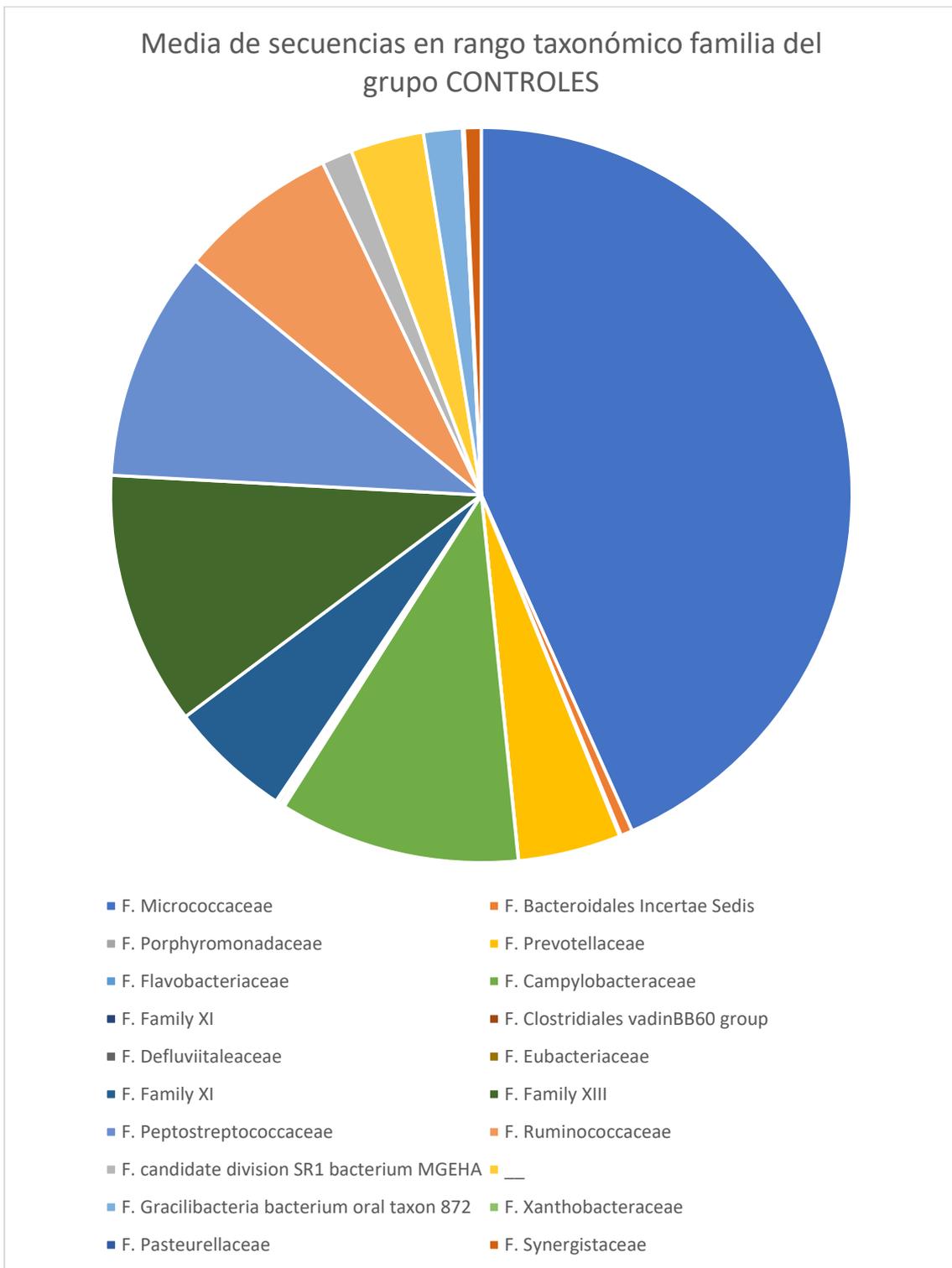


Figura 25. Media de secuencias de familia encontradas en el grupo de controles.

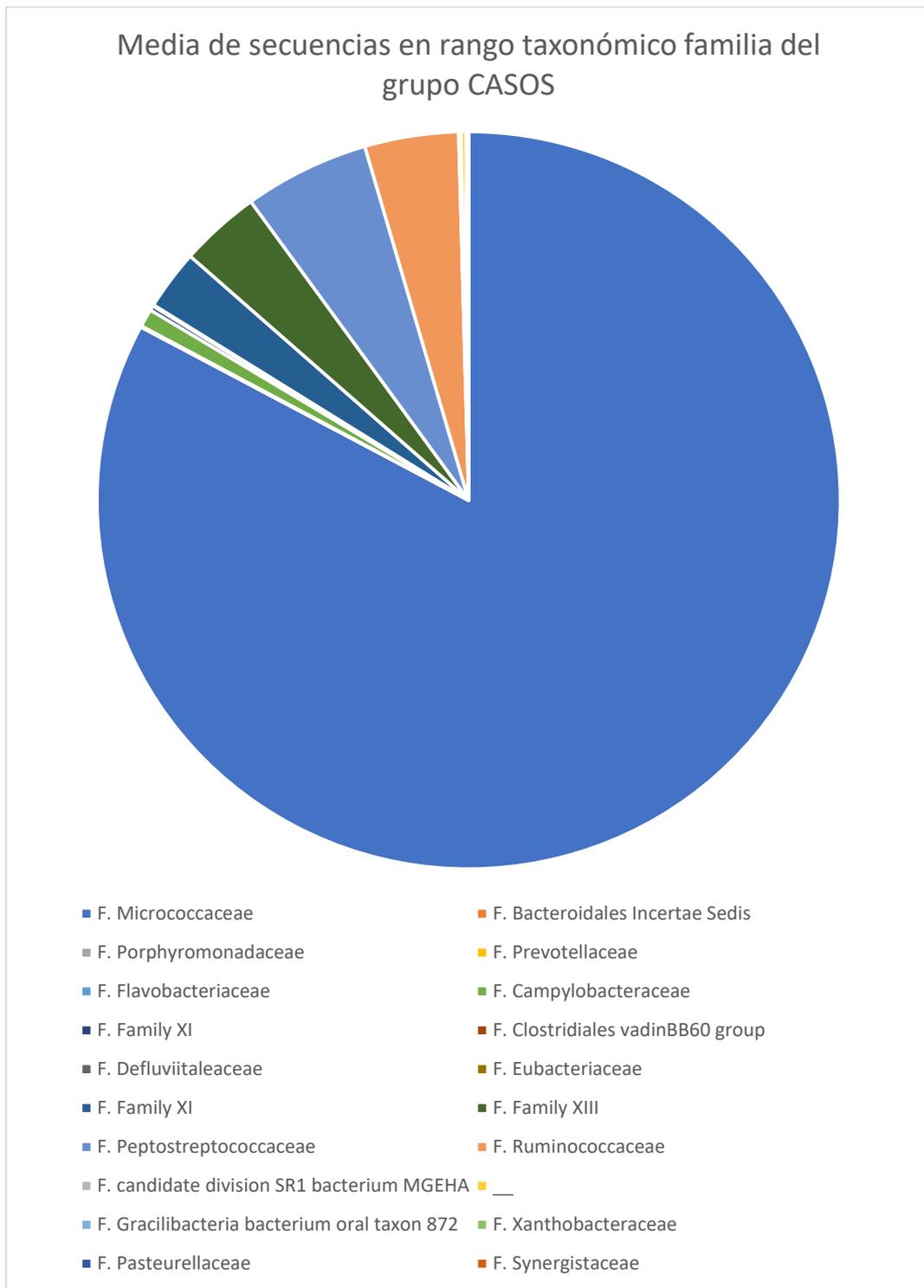


Figura 26. Media de secuencias de familia encontradas en el grupo de controles.

Análisis Estadístico entre el Grupo de Casos y Controles en Rango Taxonómico Familia

Para saber la significancia estadística de cada una de las secuencias de familia encontradas tanto en el muestras del grupo de casos como de los controles se utilizó la prueba de Mann-Whitney y Wilcoxon W (Tabla 15).

Como se expone en la Tabla 15 se encontró una $p < 0,05$ en los cambios producidos al comparar el grupo de controles con los de casos a nivel d familia Micrococcaceae, Family XI, Xanthobacteraceae y Pasteurellaceae. Así mismo, también se encontró un $p < 0,05$ en la familias Bacteroidales Incertae Sedis, Porphyromonadaceae, Flavobacteriaceae, Prevotellaceae, Campylobacteraceae, Clostridiales vadinBB60 group, Defluviitaleaceae, Eubacteriaceae, Family XI, Ruminococcaceae, Candidate división SR1 bacterium MGEHA, Gracilibacteria bacterium oral taxon 872, Xanthobacteraceae y Pasturellaceae.

Las únicas dos familias que la p es $< 0,05$ fue en Family XIII y Peptostreptococcaceae.

Bacterias en rango taxonómico de familia				
Familia	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
Micrococcaceae	72,000	282,000	-3,462	,001
Bacteroidales Incertae Sedis	113,000	323,000	-2,707	,007
Porphyromonadaceae	70,000	280,000	-4,228	,000
Prevotellaceae	14,500	224,500	-5,038	,000
Flavobacteriaceae	130,000	340,000	-2,860	,004
Campylobacteraceae	31,000	241,000	-4,573	,000
Family XI	124,500	334,500	-2,072	,038
Clostridiales vadinBB60 group	118,500	328,500	-2,899	,004
Defluviitaleaceae	96,500	306,500	-3,454	,001
Eubacteriaceae	122,000	332,000	-2,110	,035
Family XI	117,000	327,000	-2,246	,025
Family XIII	131,000	341,000	-1,867	,062
Peptostreptococcaceae	129,000	339,000	-1,921	,055
Ruminococcaceae	104,000	314,000	-2,702	,007
Candidate division SR1 bacterium MGEHA	68,500	278,500	-3,676	,000
—	96,000	306,000	-3,235	,001
Gracilibacteria bacterium oral taxon 872	116,000	326,000	-2,385	,017
Xanthobacteraceae	131,500	341,500	-2,133	,033
Pasteurellaceae	52,500	262,500	-4,267	,000

Tabla 15. Identificación de gérmenes en rango taxonómico de familia en grupo de casos y controles.

Descripción y Comparación del Rango Taxonómico Género de los Grupos de Casos y Controles

Los resultados identifican 21 géneros de bacterias frecuentes en las muestras de los grupos de casos y controles (Tabla 16). Dentro de ellos se encuentra el género *Corynebacterium* con una media de 176,50 en los controles y 432,65 en los casos; *Rothia* tiene una media de 6067 en grupo control y 18877,30 en el grupo de casos (Figura 27). *Alloprevotella* en el grupo de control muestra una media de 604,50 y en los casos de 8,40. Otro género es *Campylobacter* que presenta una media de 1473 y 179,65 en el grupo de controles y casos respectivamente. El género *Gracilibacteria bacterim oral taxon 872* cambia de una media en los controles de 237, 25 a 1,10 en los casos. *Eubacterium nodatum group* muestra una media de 746,50 y 377,20 en controles y casos respectivamente. *Catonella* tiene una media de 540,25 en controles y 250,60 en casos. Por último, *Parvimonas* tiene media de 556,50 en el grupo de casos y 705,10 en el de controles (Figura 28).

Identificación de gérmenes en rango taxonómico de género en grupo de casos y controles								
Género	Controles n = 20				Casos n = 20			
	Media	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Media	Minimum	Maximum	Std. Deviation
<i>Corynebacterium 1</i>	0,00	0	0	0,000	9,70	0	54	16,480
<i>Corynebacterium **</i>	176,50	0	1308	374,392	432,65	0	2993	779,278
<i>Rothia **</i>	6067,00	1301	15668	4019,224	18877,30	3325	55002	15861,124
<i>Porphyromonadaceae bacterium C941</i>	1,90	0	38	8,497	0,00	0	0	0,000
<i>Alloprevotella **</i>	604,50	4	2617	628,703	8,40	0	51	12,931
<i>Prevotella</i>	9,25	0	33	8,807	,20	0	2	,616
<i>Prevotella 2</i>	1,15	0	8	2,183	0,00	0	0	0,000
<i>Prevotella 6</i>	1,05	0	8	2,114	0,00	0	0	0,000
<i>Prevotella 7</i>	11,50	0	27	9,434	1,00	0	11	2,847
<i>Campylobacter **</i>	1473,05	67	7062	1861,362	179,65	0	2737	607,109
<i>Gemella</i>	11,25	0	44	14,563	48,15	0	294	79,582
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	20,65	0	151	36,289	,35	0	7	1,565
<i>Parvimonas</i>	705,10	54	1783	567,052	556,50	0	5005	1108,967
<i>Family XIII UCG-001</i>	26,40	0	213	52,204	21,60	0	341	77,586
<i>[Eubacterium] nodatum group</i>	746,50	65	3253	795,009	377,20	0	2300	637,129
<i>Catonella</i>	540,25	12	2885	744,729	250,60	0	2396	613,472

Identificación de gérmenes en rango taxonómico de género en grupo de casos y controles								
Género	Controles n = 20				Casos n = 20			
	Media	Minimum	Maximum	Std. Deviation	Media	Minimum	Maximum	Std. Deviation
<i>Shuttleworthia</i>	94,35	0	844	190,847	18,45	0	243	54,049
<i>Peptoanaerobacter</i>	52,50	0	397	118,550	4,25	0	85	19,007
<i>[Eubacterium] yurii group</i>	67,10	0	542	129,986	1,40	0	18	4,248
<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	947,10	33	3718	1111,855	929,40	0	9823	2196,367
<i>Gracilibacteria bacterium oral taxon 872 **</i>	237,25	0	3587	798,742	1,10	0	15	3,478

Tabla 16. Identificación de gérmenes en rango taxonómico de familia en grupo de casos y controles

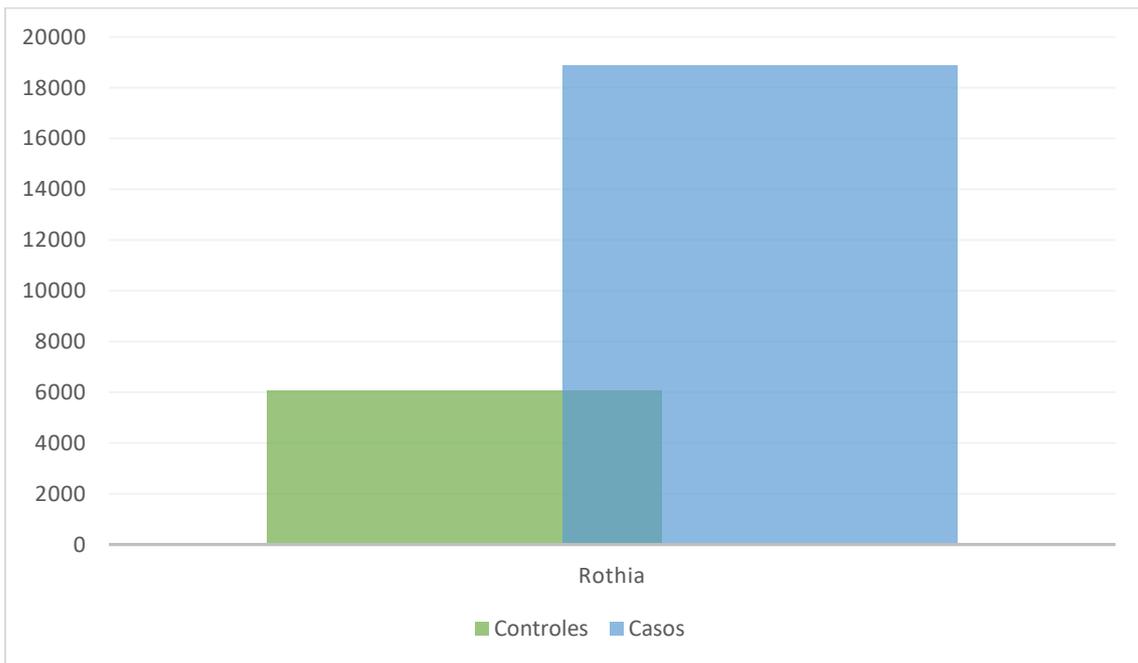


Figura 27. Diferencia a nivel del género *Rothia* en el grupo de controles y de casos estudiado.

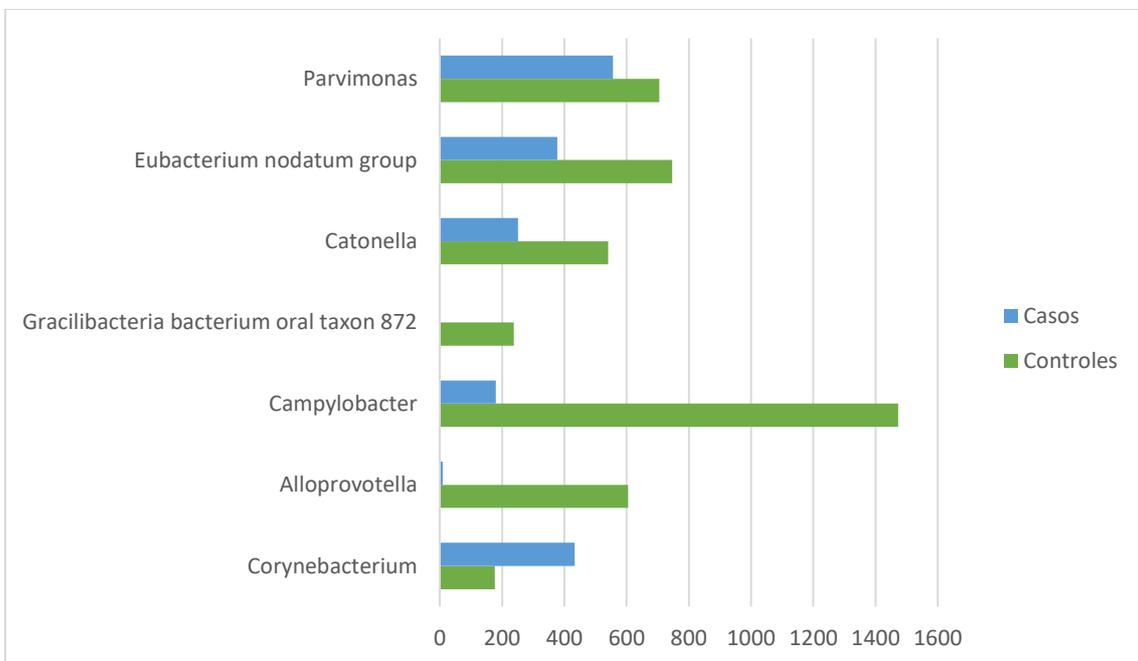


Figura 28. Diferencia entre la media de cadenas más frecuentemente identificadas en grupo de casos y controles a nivel género.

Otros géneros encontrados entre los dos grupos de estudio fueron *Prevotella* con media en controles de 9,25 y en casos de 0,20, con DS 7,679. *Gemella* muestra media en el grupo de control de 11,25 y de 48,15 en el de casos, con DS 59,480. *Defluviitaleaceae* tiene media de 0,35 en casos y 20,65 en controles, con DS de 27,357. *Peptoanaerobacter*, *Eubacterim yurii group* muestra media de 67,10 y 1,40 en grupo de controles y casos, respectivamente, con DS de 96,681.

La Figura 29 y Figura 30 representa gráficamente por separado cada uno de los grupos estudios y los géneros identificados en ellos.

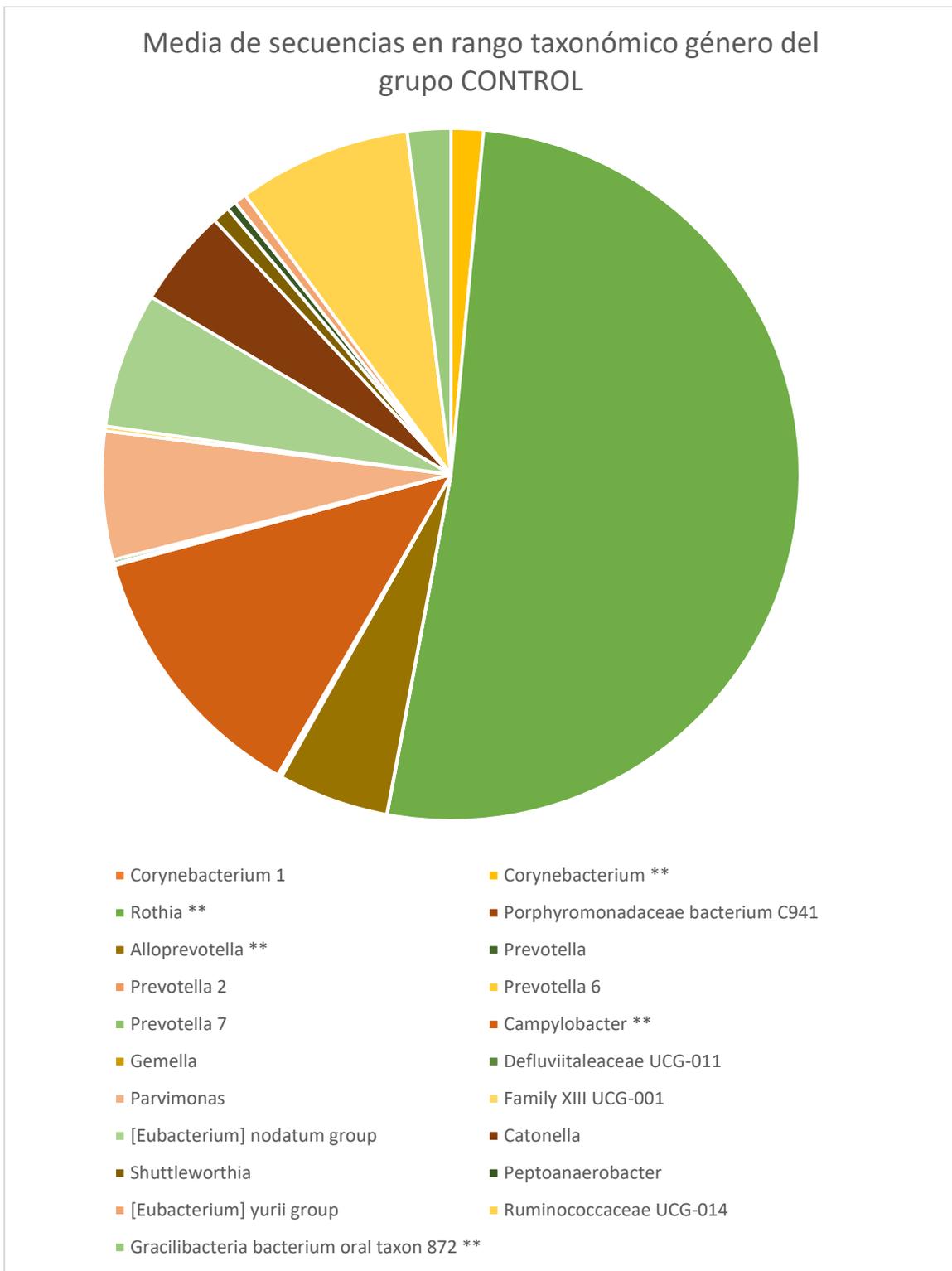


Figura 29. Media de secuencias de bacterias en rango taxonómico género encontradas en el grupo de controles.

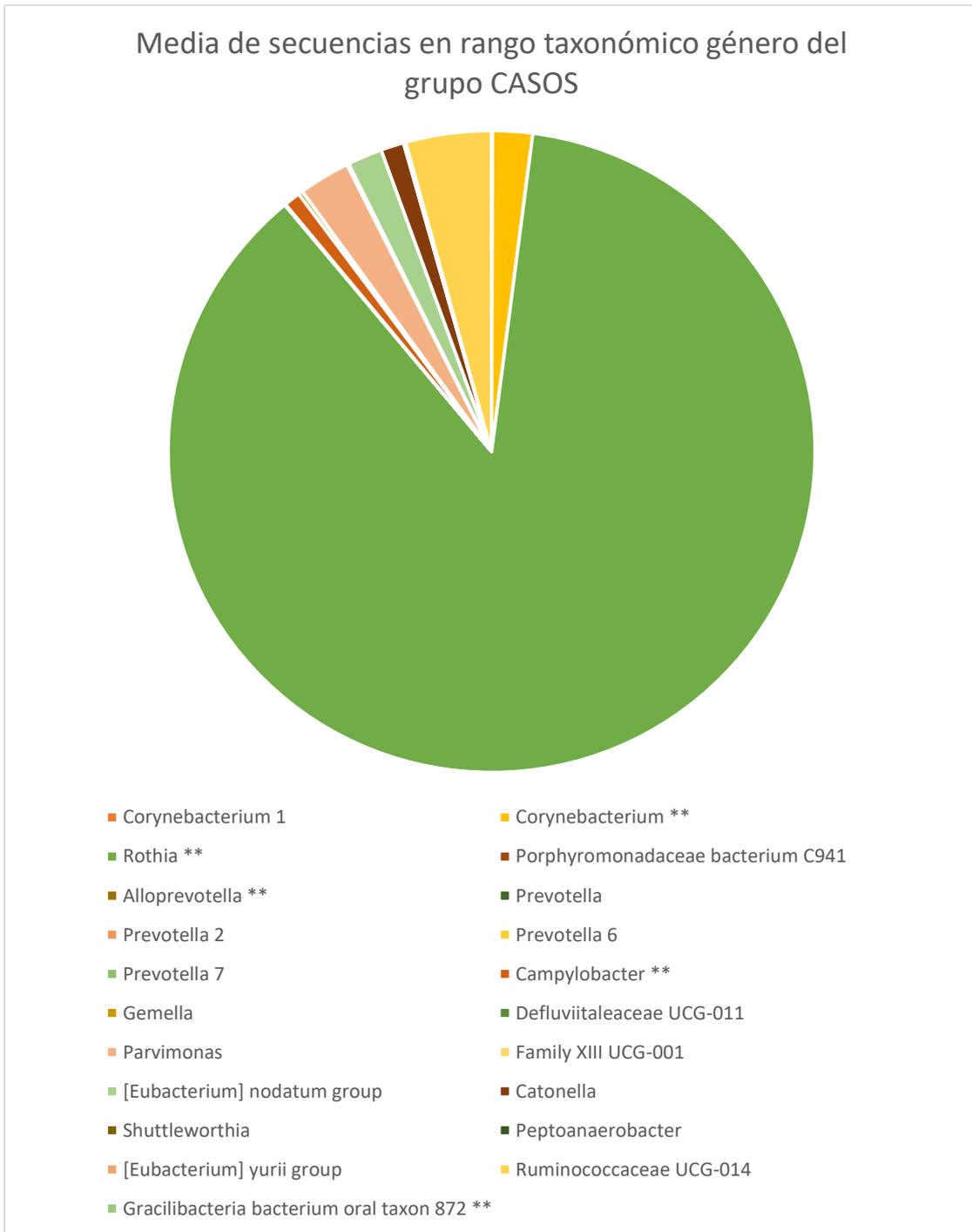


Figura 30. Media de secuencias de bacterias en rango taxonómico género encontradas en el grupo de casos.

Análisis Estadístico entre Grupo de Casos y Controles en Rango Taxonómico Genero

Para realizar la comparación estadística de los géneros encontrados en el grupo de casos y de controles se utilizó la prueba de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon (Tabla 17).

Se puede ver como existe una $p < 0,05$ en casi todos los grupos de géneros encontrados, excepto en *Prevotella 2* y *Prevotella 6*, así mismo como en *Ruminococcaceae*. Existe un aumento estadísticamente significativo de los casos en comparación con los controles en los géneros *Corynebacterium*, *Rothia* y *Gemella*. Por el contrario, se muestra una disminución en los géneros *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Prevotella*, *Prevotella 7*, *Campylobacter*, *Defluviitaleaceae*, *Parvimonas*, *Family XIII*, *Eubacterium nodatum group*, *Cantonella*, *Shuttleworthia*, *Peptoanaerobacter*, *Eubacterium yurii group* y *Gracilibacteria*.

Género	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Exact Sig. [2*(1- tailed Sig.)]
<i>Corynebacterium 1</i>	120,000	330,000	-3,097	,030 ^b
<i>Rothia</i>	72,000	282,000	-3,462	,000 ^b
<i>Porphyromonas</i>	70,000	280,000	-4,228	,000 ^b
<i>Alloprevotella</i>	13,500	223,500	-5,085	,000 ^b
<i>Prevotella</i>	66,000	276,000	-4,094	,000 ^b
<i>Prevotella 2</i>	140,000	350,000	-2,614	,108 ^b
<i>Prevotella 6</i>	140,000	350,000	-2,613	,108 ^b
<i>Prevotella 7</i>	56,000	266,000	-4,214	,000 ^b
<i>Campylobacter</i>	31,000	241,000	-4,573	,000 ^b
<i>Gemella</i>	124,500	334,500	-2,072	,040 ^b
<i>Defluviitaleaceae UCG-011</i>	96,500	306,500	-3,454	,004 ^b
<i>Parvimonas</i>	116,000	326,000	-2,273	,023 ^b
<i>Family XIII UCG-001</i>	87,500	297,500	-3,333	,002 ^b
<i>[Eubacterium] nodatum group</i>	96,000	306,000	-2,815	,004 ^b
<i>Catonella</i>	74,500	284,500	-3,422	,000 ^b
<i>Shuttleworthia</i>	99,500	309,500	-2,829	,006 ^b
<i>Peptoanaerobacter</i>	102,500	312,500	-3,253	,007 ^b
<i>[Eubacterium] yurii group</i>	87,500	297,500	-3,437	,002 ^b
<i>Ruminococcaceae UCG-014</i>	130,000	340,000	-1,894	,060 ^b
<i>Veillonella</i>	126,500	336,500	-2,005	,046 ^b
<i>Candidate division SR1 bacterium MGEHA</i>	104,000	314,000	-2,702	,009 ^b
<i>Gracilibacteria bacterium oral taxon 872</i>	96,000	306,000	-3,235	,004 ^b
<i>Neisseria</i>	87,000	297,000	-3,673	,002 ^b
<i>Fretibacterium</i>	53,000	263,000	-4,255	,000 ^b

Tabla 17. Identificación de gérmenes en rango taxonómico de género en grupo de casos y controles.

Estudio de la diversidad y riqueza de la microbiota salival de los grupos a estudio

Índices de la Alfa Diversidad de Shannon y Simpson

Los índices medios de alfa diversidad según los índices de Shannon y Simpson en el rango taxonómico de genero de los dos grupos de casos y controles, así mismo como la comparación entre ellos para saber la significancia estadística que presentan esta expuestos en la Tabla 18.

Grupo de Estudio 1	Grupo de Estudio 2	Índice de Alfa Diversidad	Media Grupo 1	Media Grupo 2	Test de Wilcoxon
CONTROL	CASO	Shannon	2.704	1.7085	0
CONTROL	CASO	Simpson	887	0.6245	0

Tabla 18. Diversidad alfa expresada en índices de Shannon y Simpson del grupo de casos y controles.

Se puede ver como existe una prueba de Wilcoxon, que hace referencia al valor de $p < 0,05$, en ambos índices de Shannon y Simpson, haciéndolos estadísticamente significativos. De esta manera se puede decir que existe una disminución de la diversidad alfa en el rango taxonómico género del grupo de casos en comparación a los controles.

En las Figura 31 y 32 se representan los diagramas de cuadros de los índices de Shannon y Simpson en los grupos de casos y controles previamente explicados.

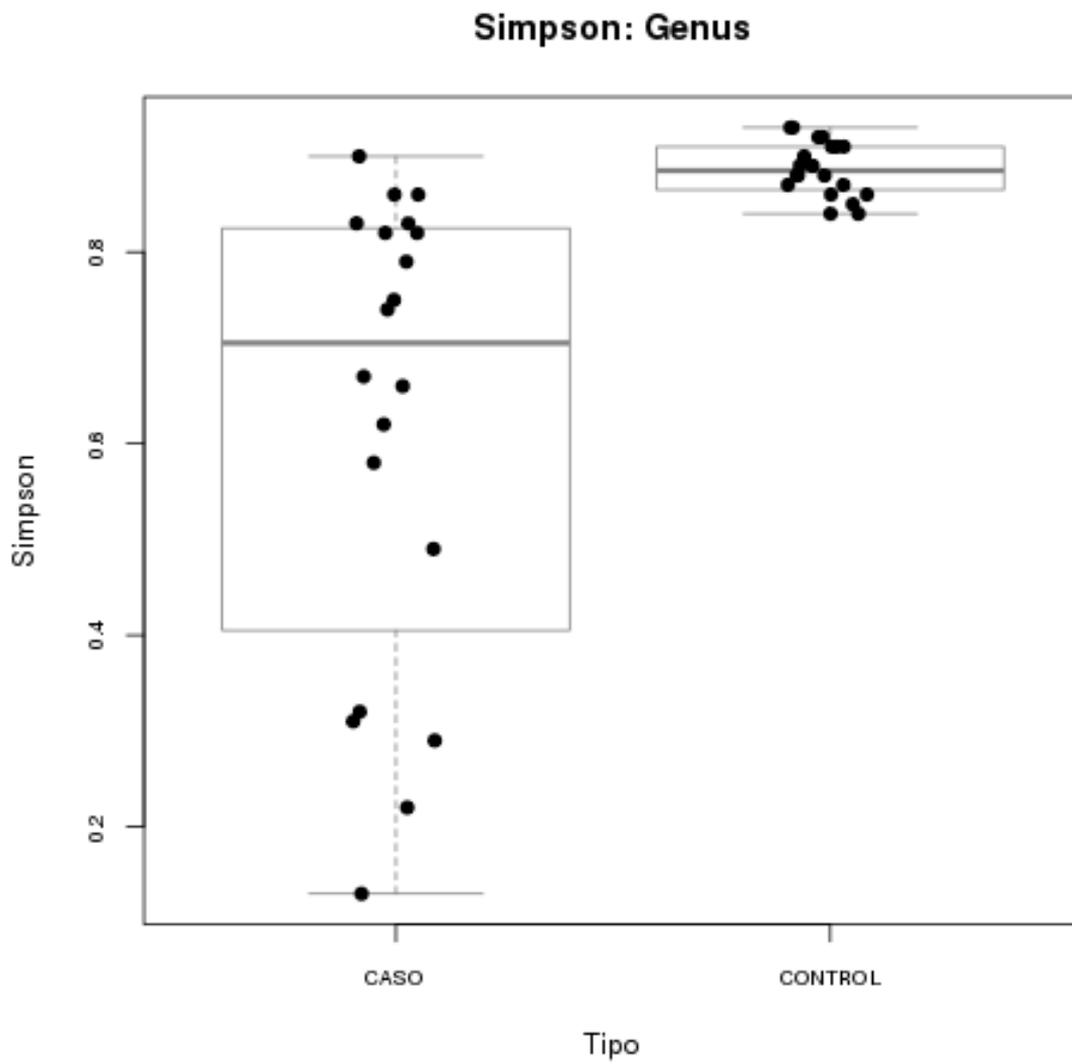


Figura 32. Diagrama de cuadros de alfa diversidad expresada en Índice de Shannon de casos y controles en el rango taxonómico de género.

Estimadores de Riqueza

Los estimadores de riqueza en rango taxonómico género se hicieron a partir de CHAO1 y ACE. CHAO1 mostró una media de 452 en el grupo de controles y 623965 en el grupo de casos con una prueba de Wilcoxon de 0,0006. En ACE se encontró una media de 45228 en el grupo de controles y 625245 en los casos con una prueba de Wilcoxon de 0,0006 (Tabla 19).

Grupo de Estudio 1	Grupo de Estudio 2	Índice de Alfa Diversidad	Media Grupo 1	Media Grupo 2	Test de Wilcoxon
CONTROL	CASO	CHAO1	623965	452	0,0006
CONTROL	CASO	ACE	625245	45228	0,0006

Tabla 19. Estimadores de riqueza CHAO1 y ACE en el rango taxonómico de genero de las muestras analizadas.

Como se muestra en la Tabla 19, ambos estimadores de riqueza presentan un $p < 0,05$, haciendo la diferencia de medias entre ambos grupos estadísticamente significativa. Se puede estimar que la riqueza de la microbiota encontrada en el grupo de casos se encuentra disminuida en comparación con los controles sanos.

Se puede expresar de una mejora manera a través de los diagramas de cajas representados en las Figuras 33 y 34.

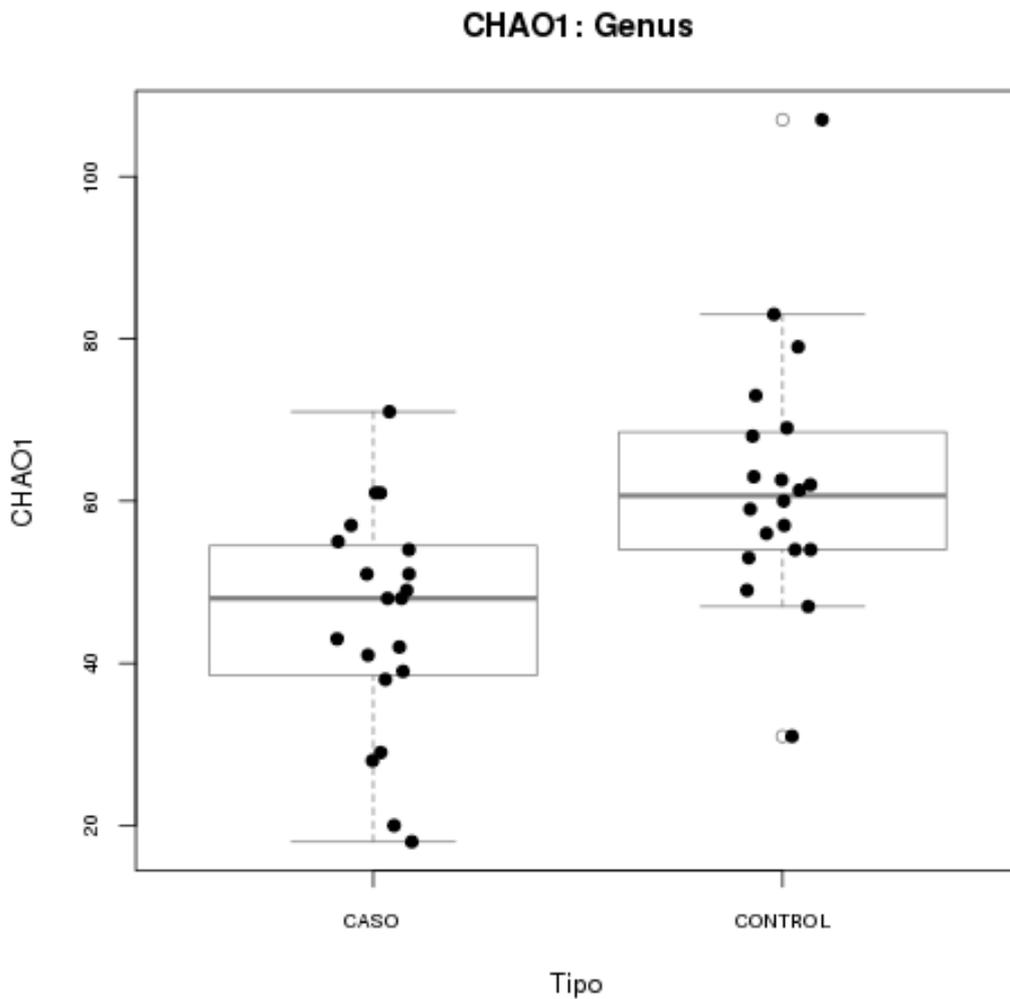


Figura 34. Diagrama de cajas del estimador de riqueza CHAO1 en el grupo taxonómico género de ambos grupos de estudio.

De esta manera, con base a los índices de diversidad alfa estudiados y los estimadores de riqueza calculados se puede establecer que existe una pérdida de la diversidad y riqueza estadísticamente significativa del grupo de casos en comparación con el grupo de controles estudiados.

Curvas de Rarefacción

A continuación, se muestran las curvas de rarefacción del grupo de controles (Figura 35) y de casos (Figura 36) por separado y una última figura con los dos juntos (Figura 37). Todas las curvas de rarefacción están dadas a nivel del rango taxonómico de género.

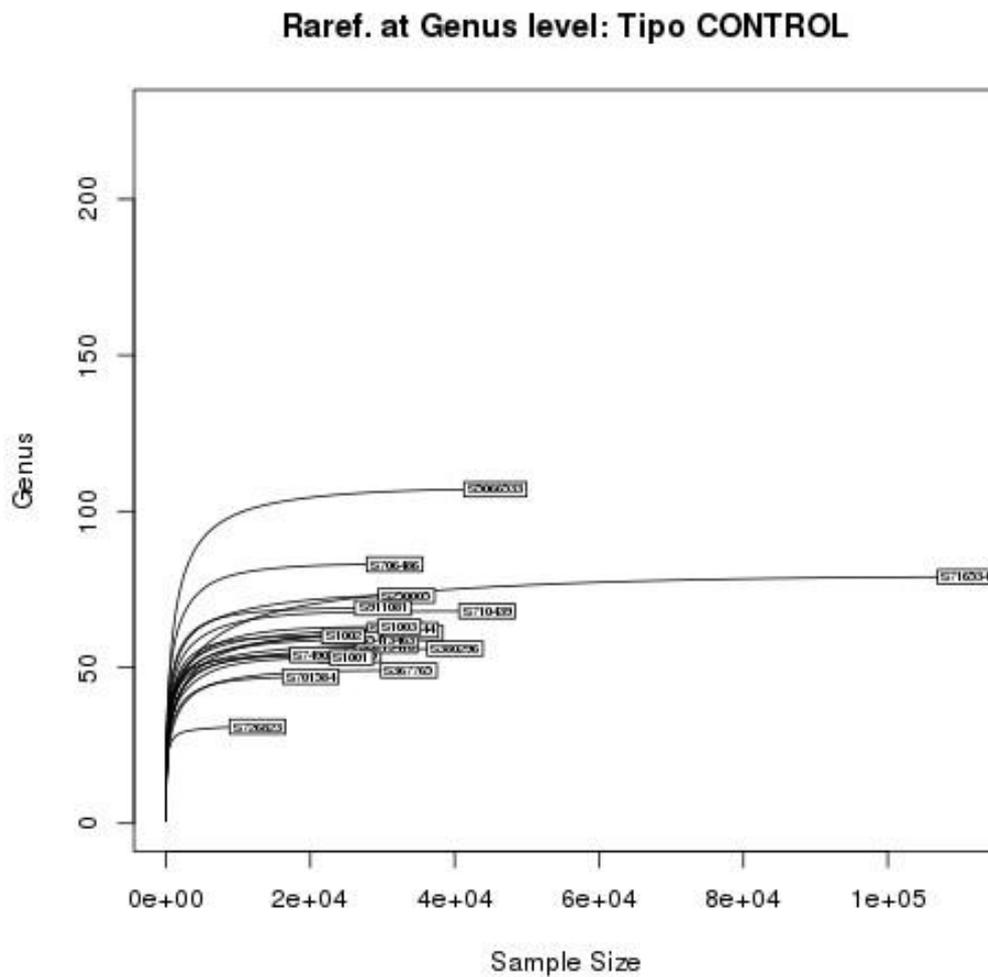


Figura 35. Curva de rarefacción a nivel de género del grupo de controles.

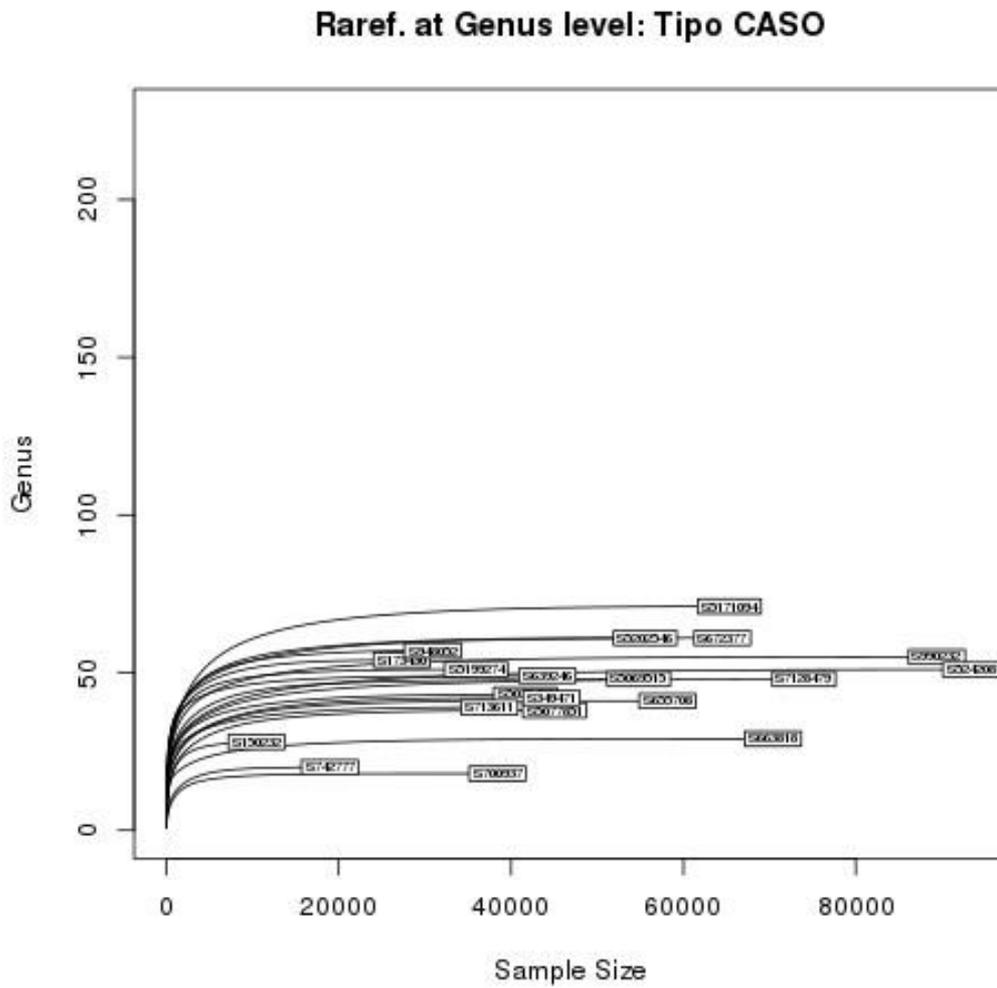


Figura 36. Curva de rarefacción a nivel de género del grupo de casos.

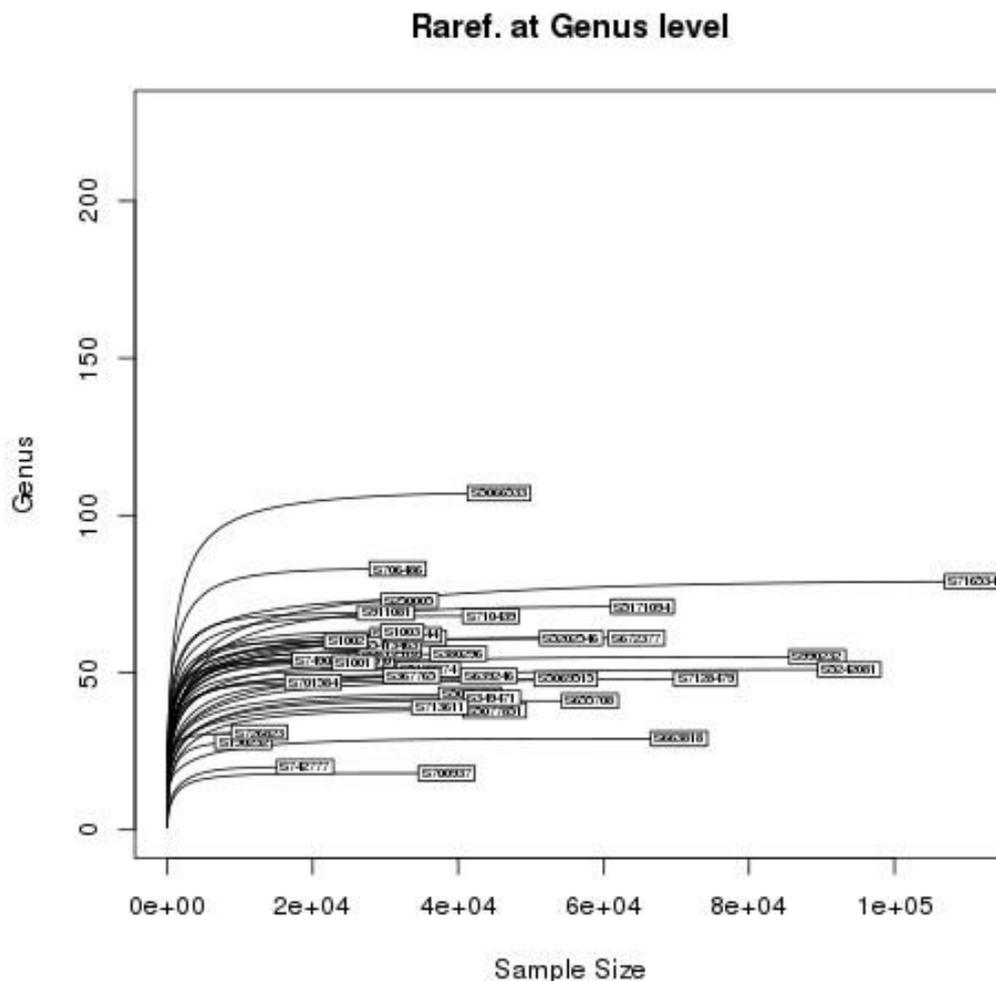


Figura 37. Curva de rarefacción a nivel de género de los dos grupos juntos.

De las curvas de rarefacción podemos confirmar que el grupo de controles presenta un riqueza superior al grupo de casos, dado que sus muestras presentan un mayor número de géneros cuando se alcanza la fase asintótica. De igual manera, se puede afirmar que el muestreo es adecuado, es decir, la secuenciación tiene suficiente profundidad para decir que se ha obtenido un numero de OTUs representativo del rango taxonómico de género, al haber alcanzado todas las curvas de rarefacción la fase asintótica.

Beta Diversidad Mediante Índice de Jaccard

Para definir la beta diversidad de los dos grupos de estudio a nivel del rango taxonómico de género se utilizó el índice de Jaccard, de igual forma, se usó la prueba de Wilcoxon para definir la significancia estadística (Tabla 20).

Grupo de Estudio 1	Grupo de Estudio 2	Índice de Beta Diversidad	Media Grupo 1	Media Grupo 2	Test de Wilcoxon
CONTROL	CASO	Jaccard	0.46	0.35	< 0,0001

Tabla 20. Tabla de comparación en rango taxonómico género de la beta diversidad expresada en índice Jaccard del grupo de estudio 1 (controles) y grupo de estudio 2 (casos).

El grupo de estudio 1 que corresponde a los controles muestra una media de 0.46. El grupo de estudio dos que corresponde a los casos, y muestra una media de 0.35564827018385. Se puede ver como el índice de diversidad beta de Jaccard de la media del grupo de casos comparada con el de controles es $p < 0,05$, siendo así, estadísticamente significativo.

Se aprecia una disminución de la media de los casos en comparación con el grupo de los controles. No obstante, podemos considerar todos los valores como bajos, por tanto, la

variabilidad intraindividual es bastante elevada, sobre todo en el grupo de casos. Se puede ver representado gráficamente en el diagrama de cajas de la Figura 38.

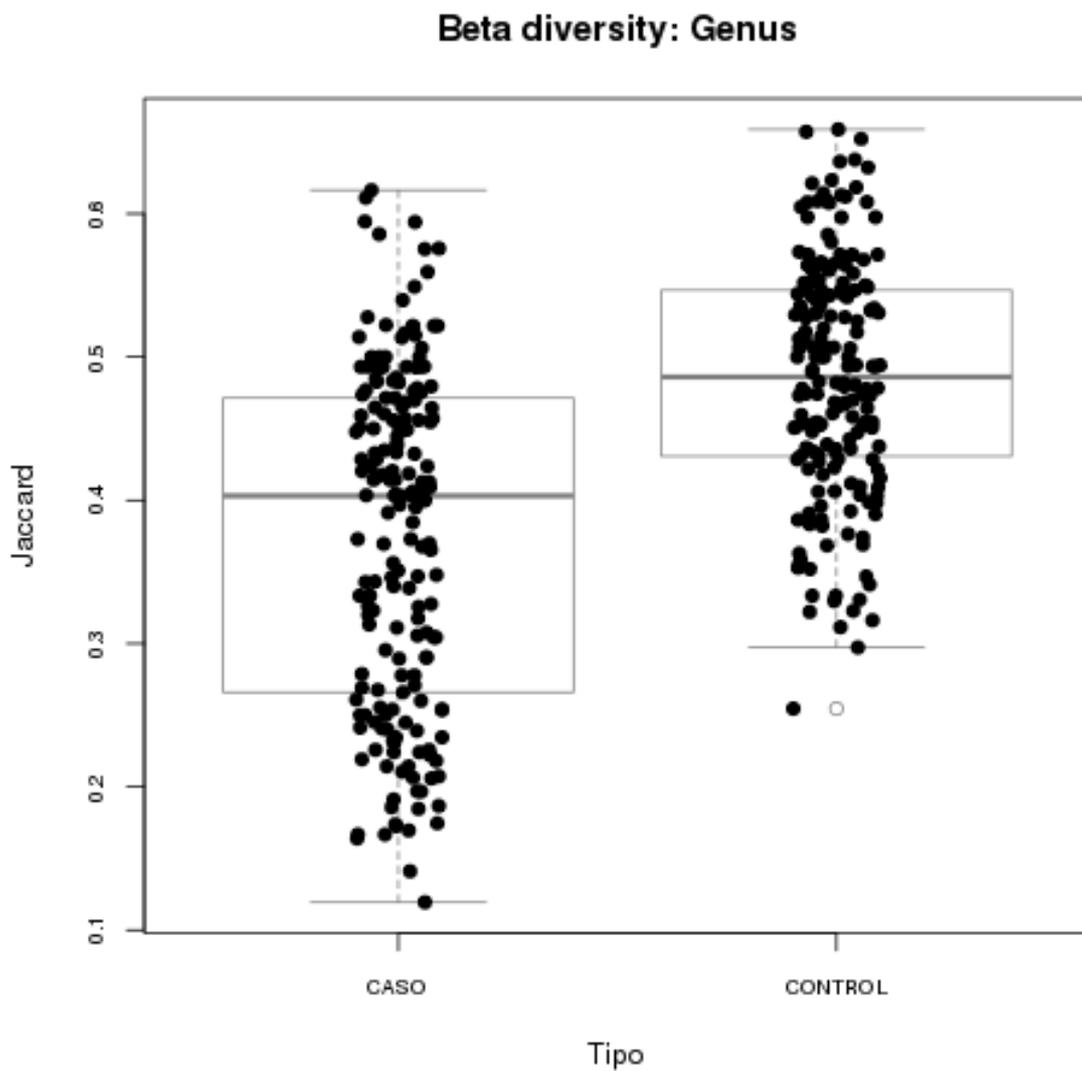


Figura 38. Diagrama de cajas de la beta diversidad de Jaccard a nivel del rango taxonómico de género de los grupos estudiados.

Es destacable como el valor de la media según el índice de Jaccard para cada grupo no es alto, mostrando de esta manera que el número de especies similares entre el grupo de paciente enfermos y de controles sanos es alta.

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) de los grupos de casos y controles***Método UniFrac Weighted***

Se reproduce en el Eje 1 la variabilidad del 14.31% y en el Eje 2 de 19.50%. Se puede ver en la Figura 41 como se representan las muestras de los controles juntas en un lado de la gráfica, a diferencia de las muestras de los casos que presenta un pequeño grupo junto y aislado, con otras muestras dispersas y más contiguas de los controles.

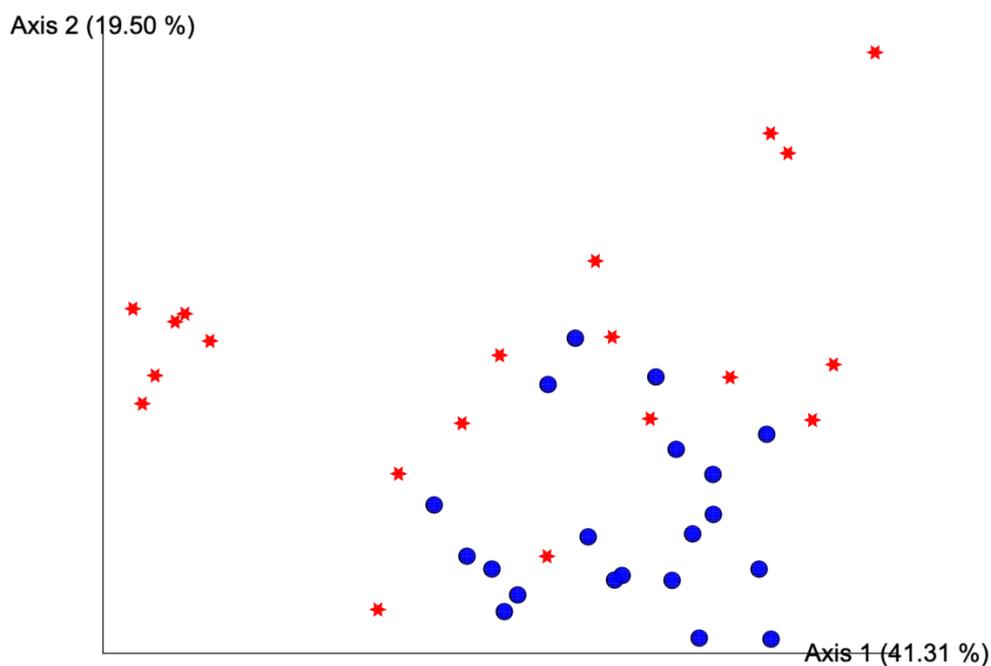


Figura 39. Método UniFrac Unweighted en dos ejes. Esferas azules = Controles.

Estrellar rojas = Casos.

El análisis UniFrac Weighted nos muestra como existe similitud entre las ramas filogenéticas de los controles y algunos casos, de igual manera también se ve que existe

un pequeño grupo de casos que es completamente diferente en comparación con los controles.

Método UniFrac Unweighted

En el eje 1 se representa la variabilidad del 24,14% y en el eje 2 de 13,20%. Así se puede visualizar que, excepto uno, todos los controles se encuentran agrupados en una parte de la gráfica, lo mismo que sucede con los casos en la otra parte de la tabla (Figura 42).

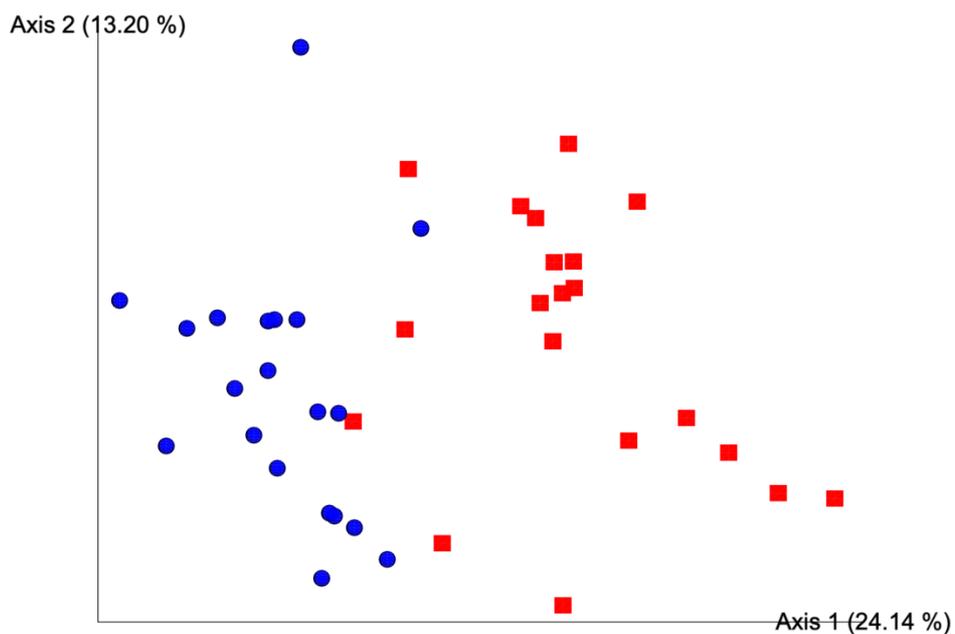


Figura 40. Método de UniFrac balanceado o weighted en dos ejes. Esferas azules = Controles. Cuadros rojos = Casos.

El análisis UniFrac Unweighted nos muestra como existe una diferencia significativa en cuanto a los géneros que se encuentran en cada una de las muestras de los casos en comparación de los controles.

Descripción de Área Bajo la Curva en Curvas ROC

Alloprevotella

Se realizó la determinación de las coordenadas (Tabla 21) para poder graficar las curvas de eficacia diagnóstica o curvas ROC para el género *Alloprevotella*. En la Tabla 21 se expresa cada uno de los puntos de corte de identificación de secuencias de *Alloprevotella* para las cuales se considera positiva la prueba y junto con ellos vemos la sensibilidad y 1 – especificidad que corresponde. Se resaltan dos puntos, el primero son 19 secuencias identificadas que corresponden a una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%, la segunda son 55 secuencias identificadas que muestra un 85% de sensibilidad y 100% de especificidad.

Positivo es mayor o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
1,50	1,000	,500
3,50	1,000	,450
6,00	,950	,450
8,50	,950	,400
9,50	,950	,300
11,00	,950	,250
15,00	,950	,200
19,00	,950	,150
21,50	,900	,100
25,50	,850	,100
39,50	,850	,050
55,00	,850	0,000
67,50	,800	0,000
135,50	,750	0,000
225,00	,700	0,000
282,50	,650	0,000
370,50	,600	0,000
448,00	,550	0,000
481,00	,500	0,000
504,00	,450	0,000

512,50	,400	0,000
639,50	,350	0,000
795,50	,300	0,000
863,00	,250	0,000
939,50	,200	0,000
1065,50	,150	0,000
1321,50	,100	0,000
2054,00	,050	0,000
2618,00	0,000	0,000

Tabla 21. Coordenadas de la curva ROC para el género *Alloprevotella*.

Se realizó el gráfico de la curva ROC para el género *Alloprevotella* (Figura 43), según la coordenadas previamente descritas. Se observa la curva construida está por encima de la línea verde que representan las discriminación media de una prueba. El área bajo la curva que se calculó para esta gráfica fue de 0.966

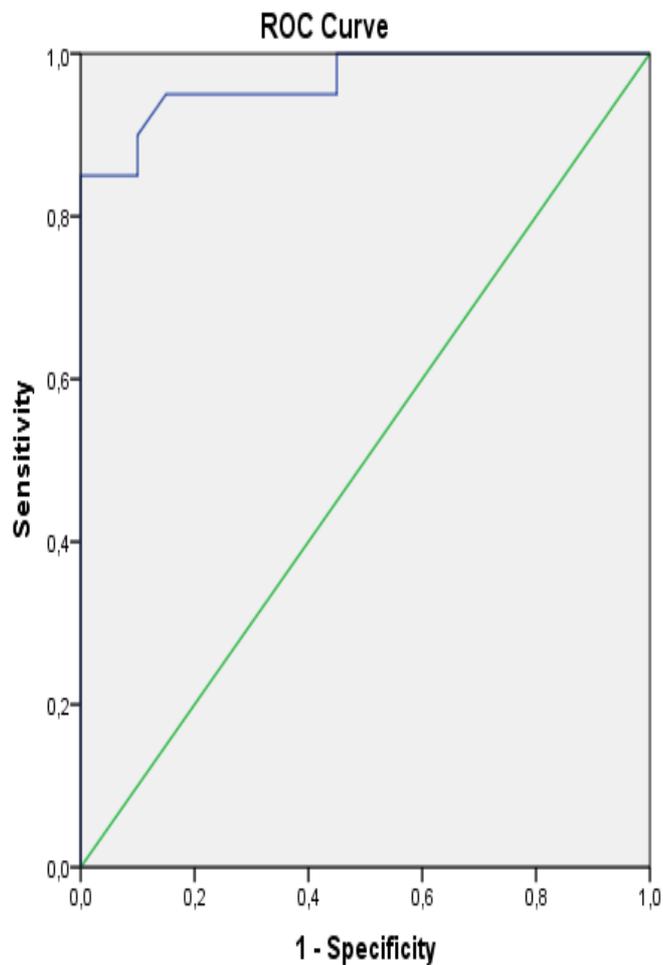


Figura 41. Gráfico de curva ROC y AUC para el género *Alloprevotella*.

Campylobacter

Para graficar las curvas ROC para el género *Campylobacter*, se realizó la determinación de coordenadas (Tabla 22). Cada uno de los puntos de corte de identificación de secuencias de *Campylobacter* para los cuales la prueba se considera positiva se muestra en la Tabla 22, junto con la sensibilidad y 1 - especificidad correspondientes. Se resalta el punto de corte de 80,50 secuencias, donde la pruebas adquiere una sensibilidad del 95% y especificidad del 85%.

Positivo si mayor o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-1,00	1,000	1,000
1,50	1,000	,900
3,50	1,000	,850
4,50	1,000	,800
5,50	1,000	,650
7,00	1,000	,550
12,50	1,000	,500
19,50	1,000	,450
24,50	1,000	,400
30,00	1,000	,350
40,50	1,000	,300
52,00	1,000	,250
61,50	1,000	,200
72,00	,950	,200
80,50	,950	,150
86,00	,900	,150
102,00	,850	,150
144,50	,800	,150
175,50	,750	,150
180,50	,700	,150
216,50	,650	,150
267,00	,650	,100
346,50	,650	,050
432,00	,600	,050
522,50	,550	,050
823,50	,500	,050
1088,50	,450	,050
1241,00	,400	,050
1383,00	,350	,050
1506,50	,300	,050
1942,50	,250	,050
2506,50	,200	,050
2812,00	,200	0,000
3108,00	,150	0,000
4170,50	,100	0,000
6037,00	,050	0,000
7063,00	0,000	0,000

Tabla 22. Coordenadas de la curva ROC para el género *Campylobacter*.

Se realizó la representación de la curva ROC y el área bajo la curva (Figura 44). Se puede ver como el área se encuentra por encima de la línea verde que marca la discriminación media de una prueba. El área bajo la curva de la gráfica corresponde a 0,923.

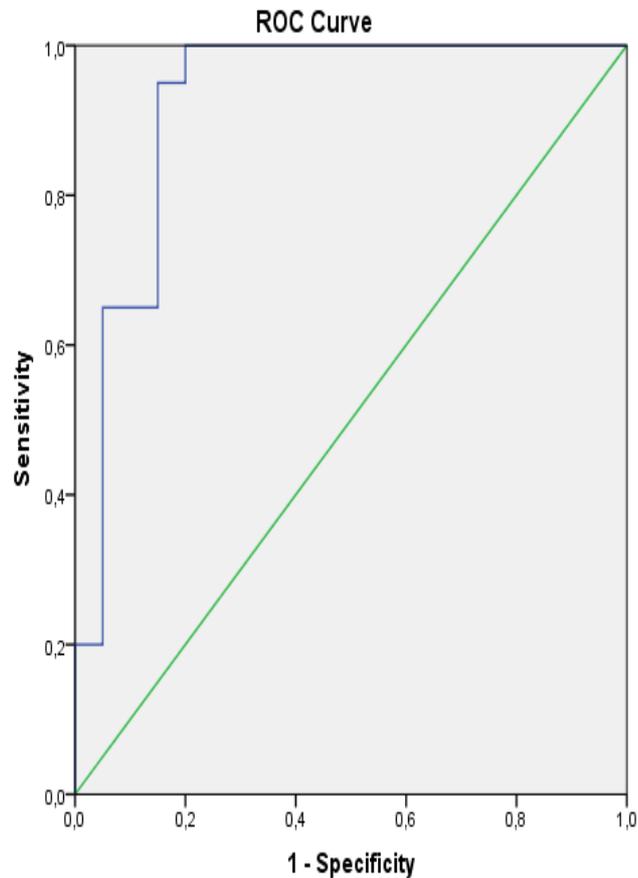


Figura 42. Gráfico de curva ROC y AUC para el género *Campylobacter*.

Rothia

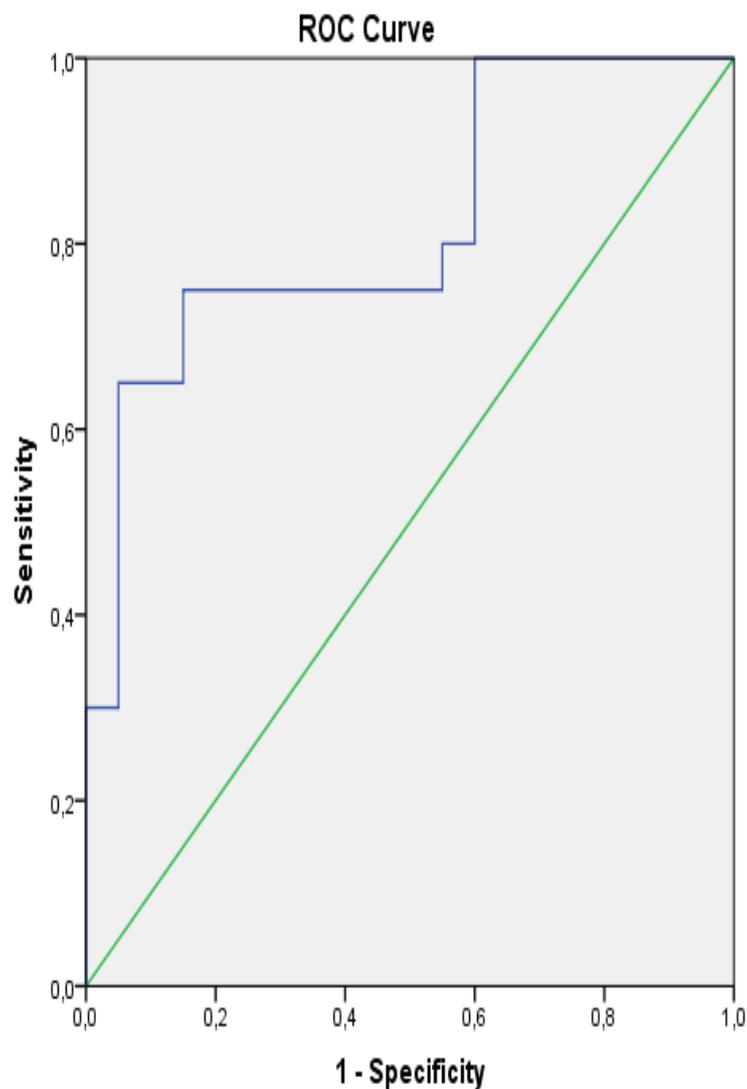
En la Tabla 23 se muestran los puntos de las coordenadas de la curva ROC para el género *Rothia* junto con la sensibilidad que se le asigna a cada punto de corte, así mismo como 1 – especificidad del mismo punto. Se resaltan los puntos de 2992,50 secuencias identificadas que corresponden al 100% de la sensibilidad y 40% de la especificidad. El

otro punto que se resalta es 9563 secuencias identificadas que corresponde al 75% de la sensibilidad y al 85% de la especificidad.

Positivo si mayor o igual a	Sensibilidad	1 - Especificidad
1300,00	1,000	1,000
1372,50	1,000	,950
1445,00	1,000	,900
1492,00	1,000	,850
1911,00	1,000	,800
2416,50	1,000	,750
2597,00	1,000	,700
2652,50	1,000	,650
2992,50	1,000	,600
3704,50	,950	,600
4102,00	,900	,600
4602,00	,850	,600
5535,00	,800	,600
6251,00	,800	,550
6562,50	,750	,550
6839,00	,750	,500
7130,50	,750	,450
7243,50	,750	,400
7531,50	,750	,350
7843,50	,750	,300
8099,00	,750	,250
8732,00	,750	,200
9563,00	,750	,150
10141,50	,700	,150
10749,00	,650	,150
11251,50	,650	,100
11441,50	,650	,050
11841,00	,600	,050
12753,00	,550	,050
13570,00	,500	,050
14557,00	,450	,050
15351,50	,400	,050
15371,00	,350	,050
15520,50	,300	,050
16234,00	,300	0,000
26331,50	,250	0,000
37740,00	,200	0,000
40618,00	,150	0,000
44977,00	,100	0,000
51668,50	,050	0,000
55003,00	0,000	0,000

Tabla 23. Coordenadas de la curva ROC para el género *Rothia*.

Se muestra la gráfica que se ha construido a partir de los puntos de corte previamente expuestos. La Gráfica 45 muestra la curva ROC y el área bajo la curva para el género *Rothia*. Se puede evidenciar que la curva se encuentra por encima de la línea media que representa la discriminación media de una prueba. El área bajo la curva se encontró de 0,820.

Figura 43. Gráfico de curva ROC y AUC para el género *Rothia*.

DISCUSIÓN

El cáncer de laringe es la séptima tumoración maligna más frecuente, con una incidencia que ha aumentado del 12% al 23,8% en las últimas décadas. Europa es el continente con mayor incidente de cáncer de laringe, en comparación con los otros continentes, con una incidencia, prevalencia y mortalidad mayor en hombre que en mujeres. En España el cáncer de laringe representa el 1,16% de total de los tumores.

Los principales factores de riesgo del cáncer de laringe son el tabaquismo, el consumo de alcohol y la infección por VPH, que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad entre 10 – 30 veces y que la combinación de ellos forma un efecto sinérgico.

EL 98% de los tumores de laringe pertenecen a la estirpe de carcinoma epidermoide bien o moderadamente diferenciado, con un 2% que corresponden a adenocarcinoma, condromas, linfomas y tumores neuroendocrinos. Es fundamental el diagnóstico anatomopatológico para realizar un adecuado tratamiento terapéutico. Al igual que el diagnóstico histológico, la localización del tumor es importante en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Su localización puede ser a nivel de supraglotis, glotis o subglotis.

La principal manifestación clínica de los tumores glóticos inicialmente es la disfonía, conforme existe un avance en la progresión del tumor se puede encontrar síntomas como disfagia, odinofagia, estridor, disnea o incluso otalgia refleja. Por el contrario, en los tumores supraglóticos la disfonía es indicación de enfermedad avanzada. En fases

avanzadas todos los tumores presentan frecuentemente síntomas constitucionales como astenia, anorexia y pérdida de peso.

El diagnóstico inicial del cáncer de laringe se basa en la historia clínica y la exploración física a través de valoración oral directa y nasofibrolaringoscopia, complementada con la palpación cervical para descartar enfermedad localmente metastásica. Como previamente se comentó, el diagnóstico definitivo se realiza a través de biopsia y análisis anatomopatológico.

Las pruebas complementarias que son útiles para determinar la extensión, el tamaño y la localización del tumor son principalmente radiológicas. Dentro de ellas encontramos la ecografía, para el diagnóstico de enfermedad cervical localmente metastásica, y la PAAF para su diagnóstico histológico. La TC define con precisión la extensión del tumor, identificando la invasión del cartílago laríngeo o expansión extralaríngea, de igual manera, también realiza un diagnóstico de enfermedad cervical localmente metastásica. Otras de las pruebas radiológicas complementarias que también se usan en el diagnóstico del cáncer de laringe son la resonancia magnética, tomografía computarizada por emisión de positrones, resonancia magnética funcional y resonancia magnética mejorada con contraste dinámico, estas últimas con usos emergentes en los últimos años, pero con dificultad para el acceso en los hospitales.

La clasificación de los tumores de laringe se realiza a través del TNM creado por la AJCC, basado en el tamaño del tumor, presencia de ganglios linfáticos afectados y metástasis a

distancia. La estadificación se realiza teniendo en cuenta la combinación de las tres anteriores variables y la localización del tumor en estadio I, II, III y IV.

El tratamiento de la enfermedad se basa en su localización, estadio, estado clínico del paciente y experiencia del centro hospitalario. La evaluación y tratamiento multidisciplinar de este tipo de pacientes es fundamental para obtener un buen resultado.

Las posibilidades de tratamiento van desde cirugía abierta, cirugía transoral, hasta conservación de órgano con radioterapia y quimioterapia. Teniendo en cuenta que los principales objetivos del tratamiento son la resección del tumor con la menos morbilidad posible, preservación y/o restauración de la función del órgano y la mejoría en la calidad de vida del paciente.

Cuando se habla del diagnóstico precoz del cáncer de laringe, no existen métodos por los cuales se pueda realizar una identificación temprana de la enfermedad para mejorar el tratamiento y pronóstico del mismo. Por esto, la mayoría de los tumores se diagnostican en estadios moderados o avanzados de la enfermedad. Con el surgimiento de las técnicas de secuenciación masiva para identificación de secuencias de ADN que ayudan a reconocer microorganismos presentes en los diferentes ecosistemas del cuerpo humano, se puede saber que bacterias pueden estar asociadas a diferentes enfermedades (entre ellas el carcinoma epidermoide de laringe y faringe) y con ello ayudar a su diagnóstico precoz.

La microbiota humano es definido como la agrupación de microorganismos constituidos por bacterias, virus y demás eucariotas que se comportan como un órgano funcional y coexisten con el individuo. Se considera un genoma en constante interacción con el medio ambiente, por lo que, una disbiosis de este puede tener un papel importante en el estado de salud y enfermedad del organismo.

Cada microambiente creado en los sistemas que componen el ser humano tiene una microbiota característica. Dentro de los más importantes se encuentra la vía aérea superior donde se encuentra *Staphylococcus spp*, *Corynebacterium spp* y *Moraxilla spp*; la cavidad oral presenta predominio de *Streptococcus spp* y *Porphyromona gingivalis spp*; uno de los más estudiados es la microbiota intestinal, que se caracteriza por la presencia de *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria*.

La relación entre la microbiota y el cáncer esta poco clara y aún por definir. Algunos estudios recientes han demostrado que los microorganismos cumplen un papel importante en la carcinogénesis, como la genética y los factores medioambientales. Algunos de los canceres relacionados con disbiosis de la microbiota son el cáncer gástrico, páncreas, próstata, pulmón, mama, entre otros.

Nuestra estudio se realizó con la población del Área I de salud del Hospital Virgen de la Arrixaca con diagnostico histopatológico de carcinoma escamoso de laringe como grupo de casos y pacientes sanos del mismo área como grupo de control. Tras recolectar las

muestras de saliva mediante el protocolo previamente descrito se realizó una secuenciación masiva de las muestras, con la posterior identificación de microorganismos en cada uno de los dos grupos. Se realizó un análisis estadístico de las muestras y una comparación de las mismas a través de la alfa y la betadiversidad, análisis de componentes, análisis UniFrac, áreas bajo la curva y curvas ROC.

Comparación de Características Clínico – Patológicas de los Pacientes del Estudio

En el estudio se incluyeron 40 pacientes, de los cuales 20 pertenecían al grupo de casos y 20 al grupo de controles. En cuanto a los grupos etarios se encuentra que tanto en el grupo de casos como en controles existe una distribución de edad bastante parecida, teniendo igual cantidad de pacientes menores de 60 años en ambos grupos, y una distribución compensada en los grupos de 60 a 69 años y mayores de 70 años. El género predominante es el masculino, representando el 77,5% de los paciente, teniendo en cuanta los dos grupos.

Los factores de riesgo estudiados fueron tabaquismo y alcoholismo, el primero presente en el 100% de los casos y el 70% de los controles, el segundo con una distribución similar en ambos grupos, siendo la mitad de los pacientes quienes lo presentaban. La localización más frecuente fue de glotis con un 70% de los paciente en el grupo de casos. En cuanto a la clasificación TNM, la mayoría de los casos (60%) se encontraban catalogados como T3 y con ninguna adenopatía (N0) que presentara metástasis locorregional cervical. El estadio del 50% de los pacientes del grupo de casos fue III.

La estirpe de carcinomas que se encontró en todos los pacientes fue la epidermoide. De igual manera, el tratamiento más frecuentemente usado fue la laringectomía.

Comparación de la Composición de la Microbiota Salival en Rango Taxonómico *Familia* en Grupos de Casos y Controles

En el rango taxonómico familia, tanto en el grupo de los casos como el de los controles, la familia más frecuentemente identificada es Micrococcaceae, seguida de la Familia XIII, Campylobacteraceae, Peptostreptococcaceae, Ruminococcaceae y Familia XI. A diferencia de Gong y col. 2013 quien en su primer estudio las familias más frecuentemente identificadas fueron Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria. De igual manera en sus estudios complementarios realizados posteriormente en 2014 y 2017 se identificó con frecuencia significativa, aunque con diferente porcentaje, las mismas familias inicialmente descritas. Hanshew y col. 2014, encontraron predominantemente familias de Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Fusobacteria. Al igual que los anteriores autores, Whang y col. 2017, describe en su estudio las familias más frecuentemente encontradas, siendo estas Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria tanto en muestras tumorales como en muestras de tejido normal adyacente de pacientes con carcinoma escamoso de laringe.

Otras familias frecuentemente encontradas en nuestro grupo de controles fue Prevotellaceae, Gracilibacteria bacterium oral taxon 872, Porphyromonadaceae, Clostridiales vadinBB60 group, Eubacteriaceae, Xanthobacteraceae y Pasteurellaceae. A diferencia del grupo de casos, donde otras familias que también fueron encontradas, pero con menos frecuencia, fueron Familia XI, Candidate división SR1 bacterium MGEHA, Xanthobacteraceae, Pasteurellaceae y Eubacteriaceae. De igual manera, Henshaw y col. 2014, encontró en su estudio de manera inconsistente y con poca abundancia familias como Spirochaetes, Cyanobacteria, Verrucomicrobia, Deinococcus-Thermus y Tenericutes.

Como se puede observar en la comparación de los dos grupos (Figura 29 y 30) se evidencia una disminución de la diversidad de familias bacterianas en el microbiota salival de los casos, con predominancia significativa de la familia Micrococcaceae.

En nuestro estudio se destaca de forma estadísticamente significativa que existe un aumento en los casos comparado con los controles en la familia Micrococcaceae, Family XI, Xanthobacteraceae y Pasteurellaceae. Gong y col. 2014 se plantearon como objetivo identificar las comunidades microbianas en la faringe humana e identificar las comunidades específicas que se pueden asociar con carcinoma escamosos de laringe. Los autores describen un aumento estadísticamente significativo en los casos comparado con los controles en las familias de Fusobacterias, Spirochaetes, Prevotella, Parvimonas, Peptostreptococcus, Dialister, Catonella, Selenomonas, Peptostreptococcaceae incertae sedis, Treponema y Burkholderia. Posteriormente, Gong y col. 2017 realizó otro estudio

con el mismo objetivo, donde describe como resultados que la abundancia relativa de la familia Firmicutes era inversamente relacionada con la abundancia de Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroides. Así mismo, Hayes y col. 2018, describen en su estudio un aumento de la abundancia relativa en casos de Actinobacteria y Actinomycetaceae sin nombre (oral-taxon_170), quienes lo relacionan con aumento del riesgo de presentar carcinoma escamosos de cabeza y cuello.

Por el contrario, existe una disminución estadísticamente significativa de los casos comparados con los controles en las familias Bacteroidales Incertae Sedis, Porphyromonadaceae, Flavobacteriaceae, Prevotellaceae, Campylobacteraceae, Clostridiales vadinBB60 group, Defluviitaleaceae, Eubacteriaceae, Family XI, Ruminococcaceae, Candidate división SR1 bacterium MGEHA, Gracilibacteria bacterium oral taxon 872, Xanthobacteraceae y Pasturellaceae. De igual manera, Hayes y col. 2018 describen en su estudio una disminución en los casos de familias como Corynebacteriaceae y Neisseriaceae, que se asociaron significativamente con menor riesgo de carcinoma escamosos de cabeza y cuello. Schmidt y col. 2014 realizaron un estudio en dos fases donde pretendían comenzar a sentar las bases que permitirían la exploración de la microbiota oral para el tratamiento y seguimiento del inicio, la progresión y la recurrencia del cáncer oral, aquí encontraron que en el estudio I se presentaba una reducción significativa en la abundancia de Firmicutes y Actinobacteria en los casos, que se repite de igual forma en el estudio II realizado con mayor número de muestra.

Las únicas dos familias no estadísticamente significativas de nuestro estudio fueron Family XIII y Peptostreptococcaceae.

Comparación de la Composición de la Microbiota Salival en Rango Taxonómico Género en los Grupos de Casos y Controles

Hablando de rango taxonómico *género*, en nuestro estudio se pudo identificar 21 géneros de bacterias diferentes, la más abundante en el grupo de controles fue *Rothia*, *Campylobacter*, *Parvimonas*, *Eubacterium nodatum group*, *Alloprevotella* y *Corynebacterium*. En el grupo de casos las más abundantes que se identificaron fueron, *Rothia*, *Parvimonas*, *Corynebacterium*, *Eubacterium nodatum group*, *Campylobacter* y *Gemella*.

Gong y col. 2017 describe que en su estudio identificó, en las muestra de frotis oral y tejido tumoral, con una frecuencia relativamente alta, los géneros de *Streptococcus*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Leptotrichia*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Rothia*, *Fusobacterium* y *Gemella*. En sus estudios de 2013, 2014 y otro en el 2017, describe prácticamente los mismos grupos de géneros bacterianos, aunque con unas frecuencias variables.

Hanshaw y col. 2014 describe en su estudio el género *Streptococcus* como el más frecuentemente identificado en sus muestras de tejido de lesión benigna de cuerda vocal.

Jetté y col. 2016 en su estudio para identificar el efecto del reflujo y el tabaquismo, dos de los factores de riesgo para el carcinoma de laringe, sobre la microbiota del tejido laríngeo describe una frecuencia significativa en los géneros de *Comamonadaceae*,

Streptococcus, Cloacibacterium, Prevotella, Propionibacterium, Helicobacter, Veillonella, Acinetobacter, Pseudomonas y Bacillus.

Otros géneros encontrados en nuestro estudio con menos frecuencia y con menos variabilidad entre los dos grupos de estudio fueron *Prevotella, Gemella, Defluviitaleaceae, Peptoanaerobacter, Eubacterium yurii group*, entre otros. Gong y col. 2017 también encontró géneros poco frecuentes como *Granulicatella, Megasphaera, Porphyromonas, Capnocytophaga, Solobacterium*. Jetté y col. 2016 describe cambios a nivel de géneros como *Streptococcus, Commamonadaceae y Cloacibacterium*, sin especificar si aumentaron o disminuyeron en controles con respecto a los casos.

Se evidencia una disminución de la diversidad de los géneros bacterianos del grupo de casos comparado con los controles, principalmente a expensas de *Rothia y Corinebacterium*.

Los análisis estadísticos se realizaron a través de las pruebas de Mann-Whitney y la prueba de Wilcoxon. Se puede ver como existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de control y casos en casi todos los géneros encontrados, excepto en *Prevotella 2, Prevotella 6 y Ruminococcaceae*.

En comparación con los controles, en los casos de nuestro estudio aumentaron significativamente los géneros de *Corynebacterium, Rothia y Gemella*. De igual manera, Gong y col. 2013 describen en su estudio un aumento de los géneros *Fusobacterium,*

Prevotella y *Gemeella*. En su estudio posterior en 2014 describe aumento en los casos de los géneros *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium sp. oral taxon*, *Prevotella intermedia* *Prevotella tanneriae*, *Prevotella oris*, *Prevotella nigrescens*, con sus respectivas especies descritas. Posteriormente en el 2018 describe como resultado que la abundancia relativa de *Streptococcus* es negativamente asociado a *Fusobacteria*, *Leptotrichia*, *Neisseria*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Campylobacter*, *Megasphaera*, *Eubacterium*, *Solobacterium*, *Mogibacterium*, *TM7_genera_incertae_sedis* y *SR1_genera_incertae_sedis*. Lim y col. 2018 en su estudio donde intentaba caracterizar las diferentes microbiotas con enjuagues orales de pacientes sanos y casos de cáncer oral y orofaríngeo describe aumento estadísticamente significativo de géneros como *Oribacterium*, *Actinomyces*, *Parvimonas*, *Selenomonas* y *Prevotella* mayor en casos de carcinoma escamoso oral comparado con los casos de carcinomas orofaríngeo. De igual manera Wang y col 2017, describe aumento de *Parvimonas* en los casos comparando con los controles, al hacer un estudio estratificado por el estadio del tumor se vio que *Actinomyces* estaba aumentado en los pacientes con tumores de bajos estadios comparado con los de alto, al contrario de *Parvimonas* que estaba disminuido en pacientes con bajos estadios. Schmidt y col. 2014 describe también aumento de *Fusobacterium* en su grupo de casos.

Así mismo, en nuestro estudio se muestra una disminución en los casos en comparación con los controles de los géneros *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Prevotella*, *Prevotella 7*, *Campylobacter*, *Defluviitaleaceae*, *Parvimonas*, *Family XIII*, *Eubacterium nodatum group*, *Cantonella*, *Shuttleworthia*, *Peptoanaerobacter*, *Eubacterium yurii group* y

Gracilibacteria. Gong y col. 2013 y 2014, así como Schmidt y col. 2014 describen descenso en el grupo de casos de géneros como *Streptococcus* y *Rothia*. De igual manera Hayes y col. 2018 describe disminución de *Corynebacterium*, *Kingella*, *Neisseria*, *Abiotrophia*, *Capnocytophaga* y las especies *Kingella dentificans* y *Streptococcus sanguinis* en el grupo de casos. Así mismo también describe que *Prevotella nanceiensis*, *Capnocytophaga leadbetteri*, *Selenomonas sputigena especie*, *Actinomyces oris* y *Veillonella denticariosi* se asociaron con un riesgo reducido de cáncer de faringe. *Parvimonas micra* y *Neisseria sicca* se asociaron con un riesgo reducido de cáncer de cavidad oral. Lim y col. 2018 describe un descenso estadísticamente significativo en los casos de géneros como *Rothia*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Capnocytophaga* y *Porphyromonas*, este último igual a lo descrito en nuestro estudio. Wang y col. 2017 es su estudio describe, al igual que todos los anteriores, una disminución en el grupo de casos del género *Actinomices*. En este mismo estudio se hizo estratificación por localización del tumor: *Parvimonas* fueron consistentemente más bajas en las ubicaciones hipofaringe/laringe en relación con la cavidad oral/orofaringe.

Alfa Diversidad y Riqueza Del Rango Taxonómico Género en el Grupo de Casos de Pacientes con Carcinoma Escamoso de Laringe en Comparación con Controles

Se evidencia una pérdida de alfa diversidad y riqueza en los grupos de pacientes casos con cáncer epidermoide de laringe con respecto al grupo de controles sanos. Queda demostrado en los resultados de los test de Wilcoxon de los índices de alfa diversidad de Shannon y Simpson presentan una significancia estadística (Tabla 18), calculados todos

ellos para el rango taxonómico de género. Estos resultados quedan reflejados en los respectivos diagramas de cuadros (Figura 31 y 32). AL igual que en nuestro estudio, Lim y col. 2018 en su estudio donde compara enjuague bucal de pacientes sanos y pacientes con alto riesgo, definiéndose alto riesgo como paciente con enfermedades orales como gingivitis o periodontitis, encuentra una diversidad de microorganismos, según el índice de Shannon, significativamente menor en casos comparados con los controles sanos. Hanshew y col. 2014 inicialmente analizaron muestras de tejido de lesión benigna de cuerda vocal, al no encontrar ninguna diferencia estadísticamente significativa, tuvieron que recolectar muestras de saliva para complementar los resultados de su estudio, dentro de estas últimas muestras se encontró una diferencia significativa según los índices de Shannon y Simpson.

Los estimadores de riqueza CHAO1 y ACE presentan una diferencia estadísticamente significativa que refleja, al igual que los anteriores, que la riqueza de la microbiota encontrada en el grupo de casos se encuentra disminuida en comparación con el grupo de controles sanos. Esto se puede ver también en los diagramas de cuadros correspondientes (Figura 33 y 34). Jetté y col. 2016 describe una reducción de la alfa diversidad en los microorganismos de los pacientes fumadores, comparados con los no fumadores. Así mismo, describe que CHAO1 muestra un aumento de riqueza en pacientes con ERGE.

Basándose en lo anterior se puede decir que, en comparación con el grupo de controles examinado, el grupo de casos experimentó una disminución estadísticamente

significativa en la diversidad y la riqueza, según los índices de diversidad alfa y los estimadores de riqueza calculados.

Las curvas de rarefacción muestran como en el grupo de controles (Figura 35) se puede ver un mayor número de diversidad en la microbiota de las muestras, representado por la mayor altura en el eje de las Y, interpretándose como que se necesitaron muchas más lecturas de pares de bases en la secuenciación masiva para encontrar un fase asintótica, esto causado porque conforme avanzaba la secuenciación se encontraban secuencias compatibles con algunos géneros de microorganismo diferentes.

Al comparar con la gráfica de los casos (Figura 36) se muestra como la mayoría de las muestras alcanzan una línea de meseta muy poco después de comenzar la secuenciación, ya que no se necesitaron muchas más lecturas de pares de bases para evidenciar que los géneros de los microorganismos eran los mismos. Esto evidencia la pobre diversidad de microbiota presente en este grupo.

Podemos confirmar a través de las curvas de rarefacción que el grupo de controles presenta una riqueza mayor que el grupo de casos, ya que sus muestras presentan un mayor número de géneros cuando se alcanza la fase asintótica. Además, se puede afirmar que el muestreo es adecuado, es decir, la secuenciación tiene suficiente profundidad para afirmar que se ha obtenido un número suficiente de OTUs representativos del rango taxonómico de género, ya que se ha alcanzado la fase asintótica en todas las curvas de rarefacción.

Beta Diversidad y Riqueza en el Grupo de Casos de Paciente con Carcinoma Escamoso de Laringe en Comparación con Controles

Para el estudio de la beta diversidad de la microbiota salival del grupos de casos en estudio hemos utilizado dos herramientas estadísticas que con el índice de Jaccard y el análisis de agrupamiento basado en el análisis principal de componentes o PCoA. Al igual que la alfa diversidad, el rango taxonómico utilizado fue el género. Con esta información describimos disimilitudes en la estructura de la microbiota salival de los grupos de una forma global.

Se aprecia un índice de Jaccard bajo para ambos grupos. Esto hace referencia que el número de especies similares entre el grupo de pacientes enfermos y controles es alto. Sin embargo, la media es menor en el grupo de casos, con un test de Wilcoxon estadísticamente significativo, lo que lleva a pensar que la variabilidad interindividual del grupo de casos es menor que el de controles.

Ciertamente pocos estudios han utilizado el índice de Jaccard para valorar la beta diversidad de la microbiota salival existente entre sus cohortes de estudio. No obstante, es una herramienta estadística sencilla que nos indica que las muestras de los grupos de casos y controles presentan una elevada variabilidad interindividual. Este hecho es en parte compatible con que la estructura de la microbiota salival es cambiante.

La segunda herramienta que utilizamos para valorar la beta diversidad de la microbiota salival en nuestros grupos de estudio es el PCoA, principalmente para valorar si existe diferencia en su estructura. El objetivo es determinar si existe algún factor que explique la mayor parte de la variabilidad de los datos, ya que en este caso los datos pueden interpretarse de manera visual y sencilla sin perder información importante. En el Biplot mostrado en la Figura 39 se puede observar que muchas de las muestras del grupos de casos se encuentran tan juntas que incluso se solapan, mostrando así similitud entre ellas. De igual manera, en el grupo de controles las muestras también se encuentran bastante juntas, incluso solapadas, sin embargo, hay un número mayor de ellas que se dispersan, dándole mayor variabilidad a este grupo. Al tener mayor cantidad de muestras juntas en ambos grupos de estudio, se puede pensar que la microbiota salival de los pacientes en el grupo de casos y en el grupo de controles no es muy diferente entre ellas.

Gong y col. 2013 en su primer estudio realizó un análisis de PCoA donde confirmó que los hallazgos de la estructura de microbiotas de la población de casos (paciente con carcinoma escamoso de laringe) y controles eran significativamente diferentes (Figura 46).

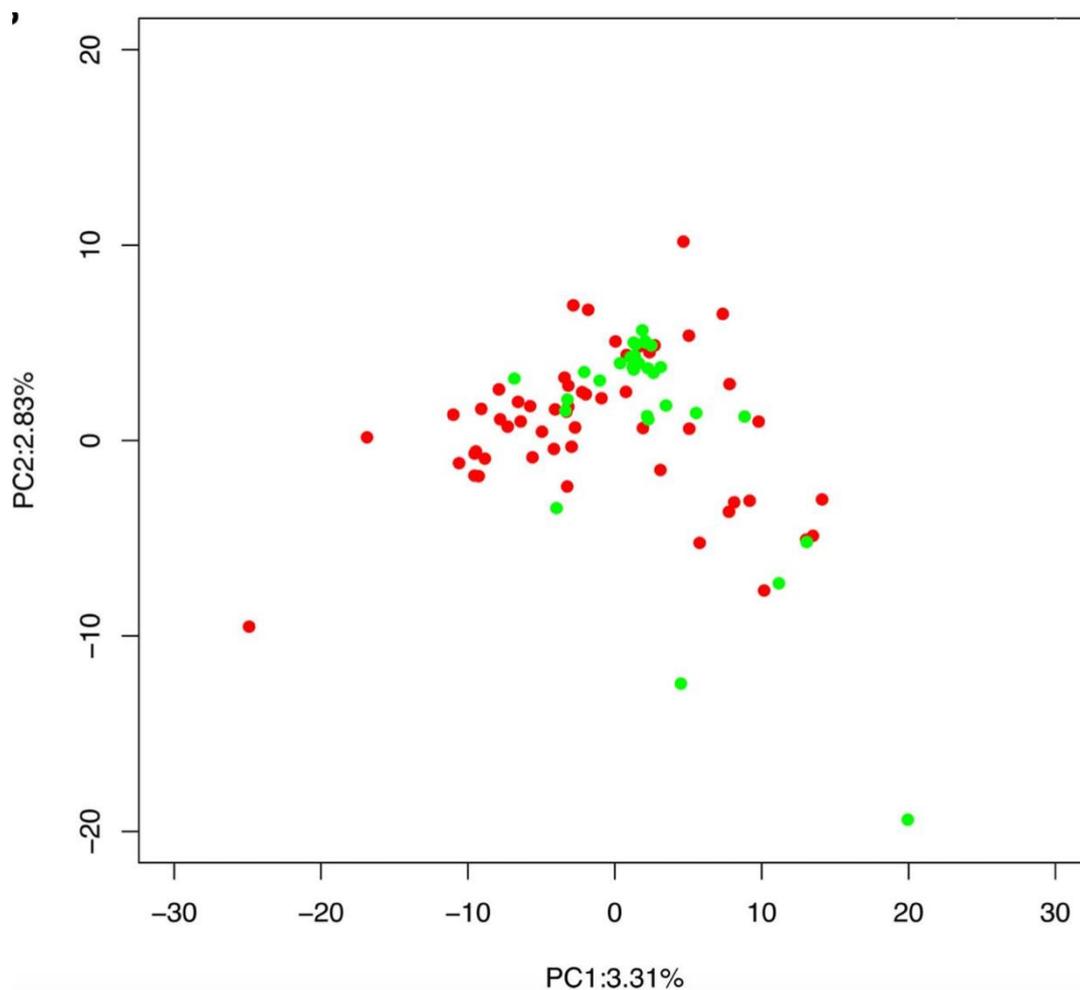


Figura 44. Análisis de componentes principales de la población de casos con carcinoma escamoso de laringe (rojo) y sujetos de control (verde) en función de la composición y abundancia de la comunidad. Cada símbolo representa una muestra (H. L. Gong et al., 2013).

Posteriormente, Gong y col. 2017 describió en su estudio que al comparar la diversidad espacial entre los pacientes con cáncer de laringe y los pacientes con pólipos en las cuerdas vocales a través del análisis PCoA, no se observó diferencias entre estos dos grupos. En su mismo estudio, se estratificaron dos grupos según la edad: los menores de

60 años y los de 60 años o más, sin encontrarse diferencias en la estructura microbiana mediante el análisis PCoA y no hubo diferencia en la abundancia relativa entre estos dos grupos. Al realizar una segunda estratificación del estudio basado en el género, no se reconoció ninguna discordancia entre los grupos de pacientes masculinos y femeninos a través del análisis PCoA.

Método Unifrac para el Análisis de las Muestras de los Grupos de Casos y Controles del Estudio

En análisis del método UniFrac en nuestro estudio se realizó tanto Weighted como Unweighted para los dos grupos de estudio. Se intenta obtener información sobre la relación relativa de los miembros de la comunidad de estudio mediante la incorporación de distancia filogenéticas entre los organismos observados en el cálculo.

El análisis UniFrac Weighted nos muestra como existe similitud entre las ramas filogenéticas de los controles y algunos casos, de igual manera también se ve que existe un pequeño grupo de casos que es completamente diferente en comparación con los controles.

El análisis UniFrac Unweighted nos muestra como existe una diferencia significativa en cuanto a los géneros que se encuentran en cada una de las muestras de los casos en comparación de los controles.

Análisis del Área Bajo la Curva en Curvas ROC a partir de los Casos y Controles Estudiados

El área bajo la curva, como previamente lo definimos en el apartado del materiales y métodos, es una herramienta estadística que se utiliza para medir el acierto de la predicción de eventos binarios, es decir, eventos que bien ocurren o no ocurren. En nuestro estudio lo utilizamos para crear un grupo de bacterias que nos puedan ser útiles a la hora de su identificación en pacientes con factores de riesgo o sin ellos, para la detección de carcinoma escamoso de laringe.

Para realizar el análisis del área bajo la curva se tuvieron en cuenta tres géneros que fueron los que de una manera estadísticamente significativa y más marcada se encontró una diferencia entre el grupo de controles y de casos. Los géneros utilizados fueron *Alloprevotella*, *Campylobacter* y *Rothia*.

En cuanto a al género *Alloprevotella* en la Tabla 21 se puede ver como se expresa el número de secuencias que se deben encontrar en la secuenciación masiva de la muestra y que sensibilidad y especificidad representan en la prueba. El cálculo del área bajo la curva de este género fue de 0,966.

Dentro de los puntos de corte más representativos se encuentran la identificación de 19 secuencias que aportan una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%. Así mismo la identificación de 55 secuencias aporta una sensibilidad de 85% y especificidad del 100%. Al tratarse de una enfermedad potencialmente mortal, como lo es el cáncer,

necesitamos una sensibilidad muchas más alta que la especificidad, y esto nos lo da el punto de corte de 19 secuencias identificadas en secuenciación masiva de la muestra.

Al igual que con el género anterior, con el *Campylobacter* podemos ver los diferentes puntos de corte en la Tabla 22 que se utilizaron para realizar la Figura 44 representando el área bajo la curva. Podemos ver que el área bajo la curva se ubica por encima de la línea de 0,75, dando a entender que la prueba se encuentra por encima de una discriminación media. El dato estadístico encontrado como área bajo la curva fue de 0,923. El punto de corte más representativo de este género es de 80,50 secuencias encontradas. Con un valor igual o mayor a este en una muestra podremos decir que tenemos una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%. En este caso también necesitamos un cifra de corte que cuente con la mayor sensibilidad y especificidad, siempre priorizando la primera de ellas. Por esto encontramos el punto de Youden en 80,50 secuencias.

En la literatura existen poco estudios que hayan implementado los análisis estadísticos de curvas ROC y áreas bajo la curva. Lim y col. 2018 describe que intentó desarrollar un biomarcador microbiótico para predecir el cáncer oral y orofaríngeo. Por ello, generó la curva ROC para *Rothia*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Porphyromonas*, *Oribacterium* y *Capnocytophaga*. Con este enfoque, el panel utilizando el análisis de estos microorganismos, tiene un área bajo la curva de 0,98 y una sensibilidad y especificidad del 100 y 90%, respectivamente (Figura 47).

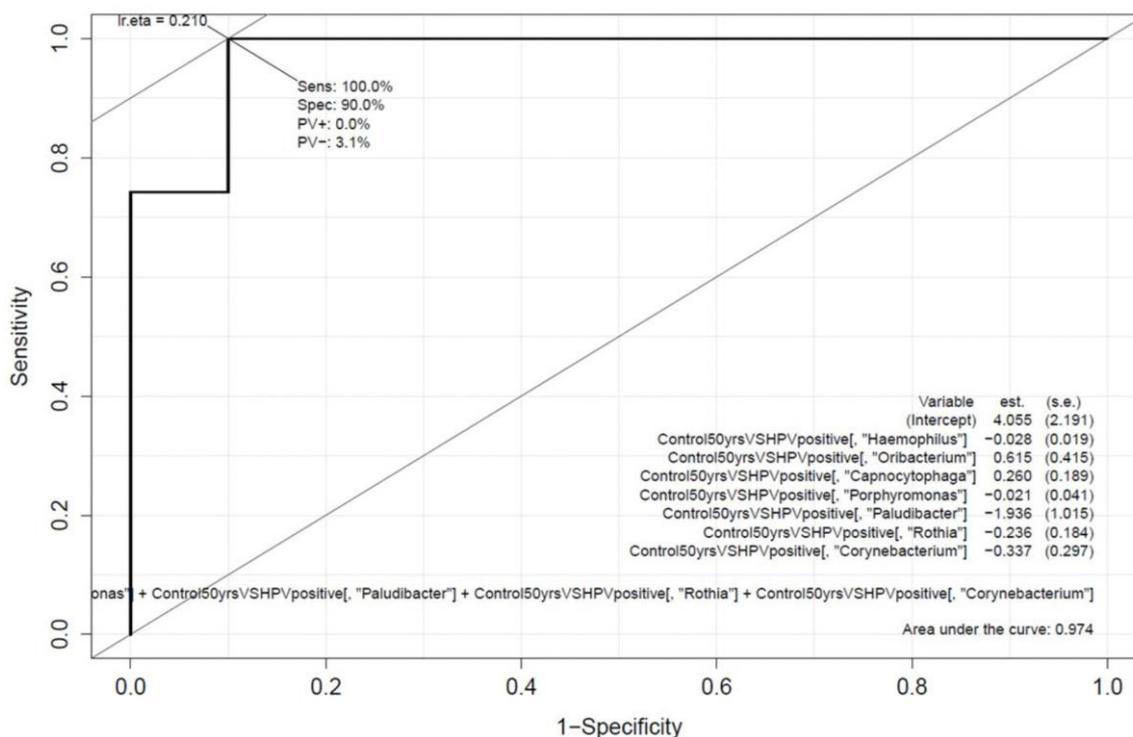


Figura 45. Área bajo la curva del panel de microbiota oral basada en la abundancia de *Rothia*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Porphyromonas*, *Oribacterium* y *Capnocytophaga* para la predicción de cáncer de cavidad oral y orofaringe.

Por último, en el género *Rothia*, como podemos ver en la Tabla 23, se muestran los puntos de corte que se utilizaron para llevar a cabo la Figura 45 que representa el área bajo la curva. El área bajo la curva se encuentra en 0,820, lo que indica podría ser una buena prueba discriminativa diagnóstica de la enfermedad. Dentro de los puntos de corte más representativos se nos muestra el de 2992,50 secuencias encontradas que cuenta con una sensibilidad del 100% y especificidad del 40%. Otro punto de corte relevante es el de 9563 que cuenta con 75% de sensibilidad y 85% de especificidad. En nuestro caso, donde necesitamos una prueba con alta sensibilidad, sin importar que la especificidad no

sea la mayor, encontramos el Punto de Youden en 2992,50 como el de mayor poder discriminativo entre casos y controles.

Este estudio, así como muchos de los citados, abren una gran puerta para el desarrollo de nuevas investigaciones dentro del campo de la microbiota, para la identificación y reconocimiento no solo de la microbiota normal de cada ecosistema que compone el ser humano, si no también, de la presente en el momento de la disbiosis que se asocia con una enfermedad específica, y que esta misma nos ayude en el diagnóstico temprano de dicha enfermedad. Dentro de los sesgos que se pudieron tener en el estudio, se encuentra que la mayoría de los pacientes presentaron cáncer glótico y la muestra pequeña con la que se trabajó. Se obtuvieron resultados que nos dan más información acerca de los cambios de la microbiota en los pacientes con cáncer de laringe y abre algunas líneas de trabajo para continuar con la investigación del tema.

CONCLUSIONES

- En el rango taxonómico *familia* el grupo más frecuentemente identificado fue Micrococcacea, con una frecuencia mucho mayor que las otras familias.
- Existe una disminución de la diversidad del rango taxonómico familia en el grupo de los casos con cáncer epidermoide de laringe comparado con los controles.
- Las familias Micrococcacea, Family XI, Xanthobacteraceae y Pasteurellaceae presentan un aumento estadísticamente significativo en el grupo de los casos comparado con los controles.
- Los géneros más abundantes tanto en el grupo de casos como de controles fueron *Rothia*, *Campylobacter* y *Parvimonas*, similares a los encontrados en otros estudios.
- Existe una disminución de la diversidad en el rango taxonómico *género* en el grupo de los casos con cáncer de laringe comparado con los controles.
- Existe un aumento estadísticamente significativo en el grupo de los casos de géneros como *Corynebacterium*, *Rothia* y *Gamella*. De igual manera se describe una disminución estadísticamente significativa en *Porphyromonas*, *Alloprevetella* y *Provetella*, también de acuerdo con los descrito en otros estudios.
- EL grupo de casos comparado con los controles presenta una disminución estadísticamente significativa en la diversidad y la riqueza según los índices de diversidad alfa, beta y los estimadores de riqueza.
- Existe un numero de géneros similares entre el grupo de casos y el de controles, sin embargo, existe la variabilidad interindividual es menor en el grupo de casos.

- Se encontraron 3 bacterias estadísticamente significativas, *Alloprevotella*, *Campylobacter* y *Rothia*, en quienes se realizó el área bajo la curva y el punto de Youden.
- *Allprovotella* mostró una área bajo la curva de 0,966, en donde identificando 19 secuencias por secuenciación masiva en la muestra se tenía una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%.
- *Campylobacter* mostró una área bajo la curva de 0,923, en donde identificando 80,50 secuencias por secuenciación masiva en la muestra se tenía una sensibilidad del 95% y una especificidad del 85%.
- *Rothia* mostró una área bajo la curva de 0,820, en donde identificando 2992,50 secuencias por secuenciación masiva en la muestra se tenía una sensibilidad del 100% y una especificidad del 40%.

BIBLIOGRAFÍA

Anne E. Magurran. (1988). *Ecology Diversity and Its Measurement*.

<https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

Atlas RM, B. R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental* (4 Edición).

Avilés-Jiménez, F., Guitron, A., Segura-López, F., Méndez-Tenorio, A., Iwai, S.,

Hernández-Guerrero, A., & Torres, J. (2016). Microbiota studies in the bile duct strongly suggest a role for *Helicobacter pylori* in extrahepatic cholangiocarcinoma.

Clinical Microbiology and Infection, 22(2), 178.e11-178.e22.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.008>

BAEV PV, P. L. (1995). *Program for calculating biological diversity parameters, similarity, niche overlap and cluster analysis*. 57.

Baird, B. J., Sung, C. K., Beadle, B. M., & Divi, V. (2018). Treatment of early-stage

laryngeal cancer: A comparison of treatment options. *Oral Oncology*,

87(September), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.09.012>

Ballesteros, A. (2023). *Tumores de cabeza y cuello*. Médica, SEOM: Sociedad Española

de Oncología. <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/orl?showall=1&start=0>

Banerjee, S., Tian, T., Wei, Z., Shih, N., Feldman, M. D., Alwine, J. C., Coukos, G., &

Robertson, E. S. (2017). The ovarian cancer oncobiome. *Oncotarget*, 8(22), 36225–

36245. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16717>

Baquero, F., & Nombela, C. (2012). The microbiome as a human organ. In *Clinical*

Microbiology and Infection (Vol. 18, Issue SUPPL. 4, pp. 2–4). European Society of

Clinical Infectious Diseases. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>

Bilodeau, E., Alawi, F., Costello, B. J., & Prasad, J. L. (2010). Molecular Diagnostics for

Head and Neck Pathology. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*,

22(1), 183–194. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2009.10.006>

Blackburn, A. C., Hill, L. Z., Roberts, A. L., Wang, J., Aud, D., Jung, J., Nikolcheva, T., Allard, J., Peltz, G., Otis, C. N., Cao, Q. J., Ricketts, R. S. J., Naber, S. P., Mollenhauer, J., Poustka, A., Malamud, D., & Jerry, D. J. (2007). Genetic mapping in mice identifies DMBT1 as a candidate modifier of mammary tumors and breast cancer risk. *American Journal of Pathology*, *170*(6), 2030–2041. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060512>

Brizel, D. M., Posner, M. R., Fried, M. P., & Ross, M. E. (2018). Treatment of early (stage I and II) head and neck cancer: The hypopharynx Authors. *UpToDate*, 1–22.

Brockstein, B. E., Stenson, K. M., & Sher, D. J. (2019). Treatment of locoregionally advanced (stage III and IV) head and neck cancer: The larynx and hypopharynx. *UpToDate*, 1–35. http://www.uptodate.com/contents/treatment-of-locoregionally-advanced-stage-iii-and-iv-head-and-neck-cancer-the-larynx-and-hypopharynx?source=search_result&search=Up-to-date%3A+Treatment+of+locoregionally+advanced+%28stage+III+and+IV%29+head+and+neck+canc

Burkill, G. J. C., Evans, R. M., Raman, V. V., & Connor, S. E. J. (2016). Modern Radiology in the Management of Head and Neck Cancer. *Clinical Oncology*, *28*(7), 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2016.03.003>

Buttigieg, P. L., & Ramette, A. (2014). A guide to statistical analysis in microbial ecology: A community-focused, living review of multivariate data analyses. *FEMS Microbiology Ecology*, *90*(3), 543–550. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12437>

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S.

- P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., ... Jia, H. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>
- Chiu, C. H., Wang, Y. T., Walther, B. A., & Chao, A. (2014). An improved nonparametric lower bound of species richness via a modified good-turing frequency formula. *Biometrics*, *70*(3), 671–682. <https://doi.org/10.1111/biom.12200>
- Dai, Y. L., & King, A. D. (2018). State of the art MRI in head and neck cancer. *Clinical Radiology*, *73*(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.crad.2017.05.020>
- De Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Frolli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., Militerni, R., & Bravaccio, C. (2010). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *51*(4), 418–424. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181dcc4a5>
- Díez Herranz, A., & Tobal González, M. (1997). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica*, *108*(1), 34–35.
- Durack, J., & Lynch, S. V. (2019). The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy. *Journal of Experimental Medicine*, *216*(1), 20–40. <https://doi.org/10.1084/jem.20180448>
- Erin Chen, Y., Fischbach, M. A., & Belkaid, Y. (2018). Skin microbiota-host interactions.

Nature, 553(7689), 427–436. <https://doi.org/10.1038/nature25177>

FEINSINGER, P. (2003). *El diseño de estudios de campo para la conservación de la biodiversidad* (FAN (ed.)).

Ferlito, A., Silver, C. E., Rinaldo, A., & Smith, R. V. (2000). Surgical treatment of the neck in cancer of the larynx. *Orl*, 62(4), 217–225. <https://doi.org/10.1159/000027749>

Fernández-Fernández, M. M., González, L. M. J., Calvo, C. R., Arias, P. P., Cabré, F. C., & del Álamo, P. O. (2016). Transoral ultrasonic total laryngectomy (TOUSS-TL): description of a new endoscopic approach and report of two cases. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 273(9), 2689–2696.

<https://doi.org/10.1007/s00405-015-3784-5>

Ferreira, R. M., Pereira-Marques, J., Pinto-Ribeiro, I., Costa, J. L., Carneiro, F., MacHado, J. C., & Figueiredo, C. (2018). Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut*, 67(2), 226–236.

<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314205>

Finegold, S. M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M. L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E. M., Collins, M. D., Lawson, P. A., Summanen, P., Baysallar, M., Tomzynski, T. J., Read, E., Johnson, E., Rolfe, R., Nasir, P., ... Kaul, A. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clinical Infectious Diseases*, 35(Suppl 1), S6–S16. <https://doi.org/10.1086/341914>

Flowers, L., & Grice, E. A. (2020). The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward. *Cell Host and Microbe*, 28(2), 190–200. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017>

Forastiere, A. A., Ismaila, N., Lewin, J. S., Nathan, C. A., Adelstein, D. J., Eisbruch, A., Fass, G., Fisher, S. G., Laurie, S. A., Le, Q. T., O'Malley, B., Mendenhall, W. M., Patel, S.,

- Pfister, D. G., Provenzano, A. F., Weber, R., Weinstein, G. S., & Wolf, G. T. (2018). Use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *Journal of Clinical Oncology*, *36*(11), 1143–1169. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.7385>
- Fukata, M., Hernandez, Y., Conduah, D., Cohen, J., Chen, A., Breglio, K., Goo, T., Hsu, D., Xu, R., & Abreu, M. T. (2009). Innate immune signaling by toll-like receptor-4 (TLR4) shapes the inflammatory microenvironment in colitis-associated tumors. *Inflammatory Bowel Diseases*, *15*(7), 997–1006. <https://doi.org/10.1002/ibd.20880>
- Gail A. Cresci. (2016). The Gut Microbiome: What we do and don't know. *Physiology & Behavior*, *176*(1), 139–148. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>.The
- Gil, Z., & Fliss, D. M. (2009). Contemporary management of head and neck cancers. *Israel Medical Association Journal*, *11*(5), 296–300.
- Gong, H. L., Shi, Y., Zhou, L., Wu, C. P., Cao, P. Y., Tao, L., Xu, C., Hou, D. S., & Wang, Y. Z. (2013). The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population. *PLoS ONE*, *8*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066476>
- Gong, H., Shi, Y., Xiao, X., Cao, P., Wu, C., Tao, L., Hou, D., Wang, Y., & Zhou, L. (2017). Alterations of microbiota structure in the larynx relevant to laryngeal carcinoma. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05576-7>
- Gong, H., Shi, Y., Zhou, L., Tao, L., Shi, Y., Cao, W., & Cheng, L. (2012). Helicobacter pylori infection of the larynx may be an emerging risk factor for laryngeal squamous cell carcinoma. *Clinical and Translational Oncology*, *14*(12), 905–910. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0879-y>

Gong, H., Shi, Y., Zhou, X., Wu, C., Cao, P., Xu, C., Hou, D., Wang, Y., & Zhou, L. (2014).

Microbiota in the throat and risk factors for laryngeal carcinoma. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(23), 7356–7363.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02329-14>

Gong, H., Wang, B., Shi, Y., Shi, Y., Xiao, X., Cao, P., Tao, L., Wang, Y., & Zhou, L. (2017).

Composition and abundance of microbiota in the pharynx in patients with laryngeal carcinoma and vocal cord polyps. *Journal of Microbiology*, *55*(8), 648–

654. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6636-8>

Gonzalez, A., Stombaugh, J., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Gordon, J. I., & Knight, R.

(2011). *The mind-body-microbial continuum*. 55–62.

Gotelli, N. J., & Colwell, R. . (2011). *Estimating species richness. Biological diversity:*

frontiers in measurement and assessment.

Han, J., & Sumer, B. D. (2021). The Changing Demographics and Treatment of Larynx

Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, *28*(12), 6927–6928.

<https://doi.org/10.1245/s10434-021-10657-z>

Hanshew, A. S., Jetté, M. E., & Thibeault, S. L. (2014). Characterization and comparison

of bacterial communities in benign vocal fold lesions. *Microbiome*, *2*(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-43>

Hayes, R. B., Ahn, J., Fan, X., Peters, B. A., Ma, Y., Yang, L., Agalliu, I., Burk, R. D., Ganly,

I., Purdue, M. P., Freedman, N. D., Gapstur, S. M., & Pei, Z. (2018). Association of oral microbiome with risk for incident head and neck squamous cell cancer. *JAMA*

Oncology, *4*(3), 358–365. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.4777>

He, Z., Gharaibeh, R. Z., Newsome, R. C., Pope, J. L., Dougherty, M. W., Tomkovich, S.,

- Pons, B., Mirey, G., Vignard, J., Hendrixson, D. R., & Jobin, C. (2019). *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut*, *68*(2), 289–300. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317200>
- Hollander, M., Wolfe, D. A., & Chicken, E. (2013). *Nonparametric Statistical Methods* (3rd ed.).
- Irfan, M., Delgado, R. Z. R., & Frias-Lopez, J. (2020). The Oral Microbiome and Cancer. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591088>
- Isles, M. G., McConkey, C., & Mehanna, H. M. (2008). A systematic review and meta-analysis of the role of positron emission tomography in the follow up of head and neck squamous cell carcinoma following radiotherapy or chemoradiotherapy. *Clinical Otolaryngology*, *33*(3), 210–222. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2008.01688.x>
- Jetté, M. E., Dill-Mcfarland, K. A., Hanshew, A. S., Suen, G., & Thibeault, S. L. (2016). The human laryngeal microbiome: Effects of cigarette smoke and reflux. *Scientific Reports*, *6*(May), 6–16. <https://doi.org/10.1038/srep35882>
- Juliano, A., & Moonis, G. (2018). Computed Tomography Versus Magnetic Resonance in Head and Neck Cancer: When to Use What and Image Optimization Strategies. *Magnetic Resonance Imaging Clinics of North America*, *26*(1), 63–84. <https://doi.org/10.1016/j.mric.2017.08.005>
- Khan, A. W., Ologun, G., Arora, R., McQuade, J. L., & Wargo, J. A. (2019). The gut microbiome modulates response to cancer immunotherapy. *Physiology & Behavior*, *176*(3), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06111-x>.The

- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Koroulakis A, A. M. (2021). *Laryngeal Cancer*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526076/>
- Krebs, C. J., & Price, P. W. (1973). Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. In *BioScience* (Vol. 23, Issue 4). <https://doi.org/10.2307/1296598>
- Kumpitsch, C., Koskinen, K., Schöpf, V., & Moissl-Eichinger, C. (2019). The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease. *BMC Biology*, *17*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0703-z>
- Lax, A. J. (2005). Bacterial toxins and cancer - A case to answer? *Nature Reviews Microbiology*, *3*(4), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1130>
- Leoncini, E., Ricciardi, W., Cadoni, G., Arzani, D., Petrelli, L., Paludetti, G., Brennan, P., Luce, D., Stucker, I., Matsuo, K., Talamini, R., La Vecchia, C., Olshan, A. F., Winn, D. M., Herrero, R., Franceschi, S., Castellsague, X., Muscat, J., Morgenstern, H., ... Boccia, S. (2014a). ACCURACY OF WHOLE-BODY PET AND PET-CT IN INITIAL M STAGING OF HEAD AND NECK CANCER: A META-ANALYSIS. *Head and Neck*, *36*(10), 1391. <https://doi.org/10.1002/HED>
- Leoncini, E., Ricciardi, W., Cadoni, G., Arzani, D., Petrelli, L., Paludetti, G., Brennan, P., Luce, D., Stucker, I., Matsuo, K., Talamini, R., La Vecchia, C., Olshan, A. F., Winn, D. M., Herrero, R., Franceschi, S., Castellsague, X., Muscat, J., Morgenstern, H., ... Boccia, S. (2014b). ULTRASOUND-GUIDED CORE-NEEDLE BIOPSY IN THE DIAGNOSIS

- OF HEAD AND NECK MASSES INDICATIONS TECHNIQUE AND RESULT 2007.pdf.
Head and Neck, 36(10), 1391. <https://doi.org/10.1002/HED>
- Lim, Y., Fukuma, N., Totsika, M., Kenny, L., Morrison, M., & Punyadeera, C. (2018). The performance of an oral microbiome biomarker panel in predicting oral cavity and oropharyngeal cancers. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(AUG), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00267>
- López, I., & Pita. (1998). Curvas ROC. *Cad Aten Primaria*, 5(4), 229–235.
- Mager, D. L. (2006). Bacteria and cancer: Cause, coincidence or cure? A review. *Journal of Translational Medicine*, 4, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-14>
- Magurran, A. (2004). Measuring Biological Diversity - Chapter 2. *Measuring Biological Diversity*, 18–215.
- Malamud, D. (2011). Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dental Clinics of North America*, 55(1), 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>
- Man, W. H., De Steenhuijsen Piters, W. A. A., & Bogaert, D. (2017). The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 259–270. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.14>
- Mao, Q., Jiang, F., Yin, R., Wang, J., Xia, W., Dong, G., Ma, W., Yang, Y., Xu, L., & Hu, J. (2018). Interplay between the lung microbiome and lung cancer. In *Cancer Letters* (Vol. 415). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.11.036>
- Martínez Pérez, J. A., & Pérez Martin, P. S. (2023). ROC curve. *Semergen*, 49(1). <https://doi.org/10.1016/j.semerng.2022.101821>
- Marur, S., & Forastiere, A. A. (2008). Head and neck cancer: Changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(4), 489–501.

<https://doi.org/10.4065/83.4.489>

McMullen, C. P., & Smith, R. V. (2015). Treatment/Comparative Therapeutics: Cancer of the Larynx and Hypopharynx. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 24(3), 521–545. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2015.03.013>

Miller, P. L., & Carson, T. L. (2020). Mechanisms and microbial influences on CTLA-4 and PD-1-based immunotherapy in the treatment of cancer: A narrative review. *Gut Pathogens*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00381-6>

Moreno, C. (2006). Trends in the measurement of alpha diversity in the last two decades. *Interciencia*, 31(1), 67-71.

Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*.

<https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>

Morgan XC, H. C. (2012). *Chapter 12: Human Microbiome Analysis. PLOS Computational Biology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002808>

Nicholson, J., Yap, I. K. S., Angley, M., Veselkov, K. A., Holmes, E., & Lindon, J. C. (2013). Urinary Metabolic Phenotyping Differentiates Children with Autism from Their Unaffected Siblings and Age Matched Controls 2010.pdf. *Journal of Proteome Research*, 2996–3004. <http://f1000.com/718010580>

Nocini, R., Molteni, G., Mattiuzzi, C., & Lippi, G. (2020). Updates on larynx cancer epidemiology. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32(1), 18–25. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2020.01.03>

Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Durand, S., Beatriz, H., Evangelista, A., Friendly, M., Hannigan, G., Hill,

- M. O., ... Ter, C. J. F. (2022). *Title Community Ecology Package*.
- P., S. K., B., K. K., & Sushil, K. (2015). Development of SCAR Marker Linked to Sex Determination Locus in *Trichosanthes dioica*. *Molecular Plant Breeding*, 6(15), 1–22. <https://doi.org/10.5376/mpb.2015.06.0015>
- Parracho, H. M. R. T., Bingham, M. O., Gibson, G. R., & McCartney, A. L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *Journal of Medical Microbiology*, 54(10), 987–991. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>
- Peet, R. K. (1974). The Measurement of Species Diversity. *Foraminiferal Ecology and Paleocology*, 3–10. <https://doi.org/10.2110/scn.79.06.0003>
- Pelegrín Hernandez, J. P. (2015). Universidad de Murcia. In *All rights reserved. IJES* (Vol. 281, Issue 4). <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Universidad+de+murcia#0>
- Porcheri, C., & Mitsiadis, T. A. (2021). Notch in head and neck cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1287, 81–103. https://doi.org/10.1007/978-3-030-55031-8_7
- Punzón-Jiménez, P., & Labarta, E. (2021). The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: a review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(10), 2519–2541. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02247-5>
- Pushalkar, S., Hundeyin, M., Daley, D., Zambirinis, C. P., Kurz, E., Mishra, A., Mohan, N., Aykut, B., Usyk, M., Torres, L. E., Werba, G., Zhang, K., Guo, Y., Li, Q., Akkad, N., Lall,

- S., Wadowski, B., Gutierrez, J., Rossi, J. A. K., ... Miller, G. (2018). The pancreatic cancer microbiome promotes oncogenesis by induction of innate and adaptive immune suppression. *Cancer Discovery*, *8*(4), 403–416.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1134>
- Pushalkar, S., Ji, X., Li, Y., Estilo, C., Yegnanarayana, R., Singh, B., Li, X., & Saxena, D. (2012). Comparison of oral microbiota in tumor and non-tumor tissues of patients with oral squamous cell carcinoma. *BMC Microbiology*, *12*.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-144>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, *41*(D1), 590–596.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rovira, A., Ramos, A., & Juan, M. de. (2011). *Actualización SERAM. Radiología de Cabeza y Cuello*.
- Sandler, R. H., Finegold, S. M., Bolte, E. R., Buchanan, C. P., Maxwell, A. P., Väisänen, M. L., Nelson, M. N., & Wexler, H. M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of Child Neurology*, *15*(7), 429–435.
<https://doi.org/10.1177/088307380001500701>
- Schmidt, B. L., Kuczynski, J., Bhattacharya, A., Huey, B., Corby, P. M., Queiroz, E. L. S., Nightingale, K., Kerr, A. R., DeLacure, M. D., Veeramachaneni, R., Olshen, A. B., & Albertson, D. G. (2014). Changes in abundance of oral microbiota associated with oral cancer. *PLoS ONE*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098741>
- Schmieder, R., & Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic

- datasets. *Bioinformatics*, 27(6), 863–864.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>
- SEORL-CCC. (2019). *¿Cuáles son los síntomas del cáncer de laringe?*
<https://seorl.net/sintomas-cancer-laringe/>
- Shi, N., Li, N., Duan, X., & Niu, H. (2017). Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>
- Shui, L., Yang, X., Li, J., Yi, C., Sun, Q., & Zhu, H. (2020). Gut Microbiome as a Potential Factor for Modulating Resistance to Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02989>
- Snider, L. A., Lougee, L., Slattery, M., Grant, P., & Swedo, S. E. (2005). Antibiotic prophylaxis with azithromycin or penicillin for childhood-onset neuropsychiatric disorders. *Biological Psychiatry*, 57(7), 788–792.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2004.12.035>
- Snow, G. B. (2020). Head and neck cancer. *The New England Journal of Medicine*, 4(3), 469–470. <https://doi.org/10.1097/00001622-199206000-00007>
- Steuer, C. E., El-Deiry, M., Parks, J. R., Higgins, K. A., & Saba, N. F. (2017). An update on larynx cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(1), 31–50.
<https://doi.org/10.3322/caac.21386>
- Sturgis, E. M., Wei, Q., & Spitz, M. R. (2019). Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Seminars in Oncology*, 31(6), 726–733.
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.09.013>
- Su, A. (2017). *Microbioma y secuenciación masiva*. 30(5), 305–311.

- Sun, J., Tang, Q., Yu, S., Xie, M., Xie, Y., Chen, G., & Chen, L. (2020). Role of the oral microbiota in cancer evolution and progression. *Cancer Medicine*, *9*(17), 6306–6321. <https://doi.org/10.1002/cam4.3206>
- Svider, P. F., Blasco, M. A., Raza, S. N., Shkoukani, M., Sukari, A., Yoo, G. H., Folbe, A. J., Lin, H. S., & Fribley, A. M. (2017). Head and Neck Cancer: Underfunded and Understudied? *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, *156*(1), 10–13. <https://doi.org/10.1177/0194599816674672>
- Takeshita, T., Kageyama, S., Furuta, M., Tsuboi, H., & Takeuchi, K. (2016). Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions : the Hisayama Study. *Nature Publishing Group, November 2015*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep22164>
- Teimoorian, F., Ranaei, M., Tilaki, K. H., Shirvani, J. S., & Vosough, Z. (2018). Association of helicobacter pylori infection with colon cancer and adenomatous polyps. *Iranian Journal of Pathology*, *13*(3), 325–332.
- Torres, P. J., Fletcher, E. M., Gibbons, S. M., Bouvet, M., Doran, K. S., & Kelley, S. T. (2015). Characterization of the salivary microbiome in patients with pancreatic cancer. *PeerJ*, *2015*(11), 1–16. <https://doi.org/10.7717/peerj.1373>
- Tsai, H. F., & Hsu, P. N. (2010). Interplay between Helicobacter pylori and immune cells in immune pathogenesis of gastric inflammation and mucosal pathology. *Cellular and Molecular Immunology*, *7*(4), 255–259. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.2>
- Urbaniak, C., Gloor, G. B., Brackstone, M., Scott, L., Tangney, M., & Reid, G. (2016). The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(16), 5039–5048. <https://doi.org/10.1128/AEM.01235-16>

Vogelmann, R., & Amieva, M. R. (2007). The role of bacterial pathogens in cancer.

Current Opinion in Microbiology, 10(1), 76–81.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.12.004>

Wang, H., Funchain, P., Bebek, G., Altemus, J., Zhang, H., Niazi, F., Peterson, C., Lee, W.

T., Burkey, B. B., & Eng, C. (2017). Microbiomic differences in tumor and paired-normal tissue in head and neck squamous cell carcinomas. *Genome Medicine*, 9(1),

1–10. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0405-5>

Wang, J., Rizvi, S. M. A., Madigan, M. C., Cozzi, P. J., Power, C. A., Qu, C. F., Morgenstern,

A., Apostolidis, C., Russell, P. J., Allen, B. J., & Li, Y. (2007). Characterization of Benign and Malignant Prostate Epithelial tHoechst 33342 Side Populations.

Prostate, 67(April), 1384–1396. <https://doi.org/10.1002/pros>

Wang, Yu, Du, J., Wu, X., Abdelrehem, A., Ren, Y., Liu, C., & Zhou, X. (2021). Crosstalk

between autophagy and microbiota in cancer progression. *Molecular Cancer*, 1–

19. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01461-0>

Wang, Yuxuan, Springer, S., Mulvey, C. L., Silliman, N., Schaefer, J., Sausen, M., James,

N., Rettig, E. M., Guo, T., Pickering, C. R., Bishop, J. A., Chung, C. H., Califano, J. A.,

Eisele, D. W., Fakhry, C., Gourin, C. G., Ha, P. K., Kang, H., Kiess, A., ... Agrawal, N.

(2015). Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of

patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science Translational*

Medicine, 7(293), 1–8. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8507>

Whittaker, A. R. H., & Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species

Diversity Published by : International Association for Plant Taxonomy (IAPT) Stable

URL : <http://www.jstor.org/stable/1218190> . extend access to Taxon . EVOLUTION

- AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY ". *Taxon*, 21(2/3), 213–251.
- Williams, M. D. (2010). Integration of biomarkers including molecular targeted therapies in head and neck cancer. *Head and Neck Pathology*, 4(1), 62–69.
<https://doi.org/10.1007/s12105-010-0166-6>
- Wong, W. L., Sonoda, L. I., Gharpurhy, A., Gollub, F., Wellsted, D., Goodchild, K., Lemon, C., Farrell, R., & Saunders, M. (2012). 18F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography/Computed Tomography in the Assessment of Occult Primary Head and Neck Cancers - An Audit and Review of Published Studies. *Clinical Oncology*, 24(3), 190–195. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2011.11.001>
- Xie, H., Onsongo, G., Popko, J., de Jong, E. P., Cao, J., Carlis, J. V., Griffin, R. J., Rhodus, N. L., & Griffin, T. J. (2008). Proteomics analysis of cells in whole saliva from oral cancer patients via value-added three-dimensional peptide fractionation and tandem mass spectrometry. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7(3), 486–498.
<https://doi.org/10.1074/mcp.M700146-MCP200>
- Yuan, S., Cohen, D. B., Ravel, J., Abdo, Z., & Forney, L. J. (2012). *Evaluation of Methods for the Extraction and Purification of DNA from the Human Microbiome*. 7(3).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033865>
- Yuan, X., Liu, Y., Kong, J., Gu, B., Qi, Y., Wang, X., Sun, M., Chen, P., Sun, W., Wang, H., Zhou, F., & Gao, S. (2017). Different frequencies of Porphyromonas gingivalis infection in cancers of the upper digestive tract. *Cancer Letters*, 404, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.003>
- Zaura, E., Keijsers, B. J., Huse, S. M., & Crielaard, W. (2009). Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiology*, 9, 1–12.

<https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-259>

Zhang, L., Henson, B. S., Camargo, P. M., & Wong, D. T. (2009). The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 51(1), 25–37.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00315.x>

ANEXOS

ANEXO I

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL PACIENTE EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DENOMINADO: ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL MICROBIOTA SALIVAL HUMANO EN PACIENTES CON CANCER EPIDERMÓIDE DE LARINGE Y PACIENTES SANOS.

La **Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica**, establece en su artículo 58 que la obtención de muestras biológicas con fines de investigación biomédica podrá realizarse únicamente cuando se haya obtenido previamente el consentimiento escrito del sujeto fuente y previa información de las consecuencias y los riesgos que pueda suponer tal obtención para su salud.

De conformidad a lo previsto en el artículo 58 de la citada Ley, se le informa de los siguientes extremos:

a) La finalidad de la investigación es la siguiente: *Obtener información de interés con fines científicos, diagnósticos, pronósticos y terapéuticos de cáncer de laringe.*

b) Los beneficios esperados son los siguientes: *mejorar la asistencia de los pacientes con cáncer de laringe.*

c) Los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra (solo si existe alguno, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras) son los que siguen: *No hay.*

d) Los responsables de la investigación son los Dres: *D. Juan David Lara Lozano y D. Diego Hellín Meseguer*

e) El lugar de realización del análisis y destino de la muestra al término de la

investigación será *La Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca”*

f) Se garantiza la total confidencialidad de la información obtenida, únicamente accediendo a la información obtenida los Dres. Responsables de la Investigación.

g) No existe la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica.

h) El presente proyecto de investigación ha obtenido informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del “Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca” para la obtención y utilización de muestras biológicas para investigación biomédica.

Se le informa igualmente que el presente consentimiento puede ser revocado, totalmente o para determinados fines, en cualquier momento. Cuando la revocación se refiera a cualquier uso de la muestra, se procederá a su inmediata destrucción, sin perjuicio de la conservación de los datos resultantes de las investigaciones que se hubiesen realizado con carácter previo.

D./D^a.....

DNI:

He leído y comprendido el presente documento y doy mi consentimiento expreso para que se obtengan las muestras biológicas referidas mediante la realización de los análisis y pruebas oportunas.

.....

Fdo.

ANEXO II

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO. ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL MICROBIOTA SALIVAL HUMANO EN PACIENTES CON CANCER EPIDERMÓIDE DE LARINGE Y PACIENTES SANOS.

FORMULARIO DE RECOGIDA DE MUESTRAS:

DATOS

1. Médico responsable _____

2. Hospital _____

3. Fecha de recogida _____

4. Número de Inclusión _____

5. Consentimiento informador SI NO

6. Edad _____

MUESTRA

1. Saliva SI NO Volumen:

2. Sangre SI NO

3. Tejido patológico SI NO

4. Tejido sano SI NO

ANEXO III

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO. ESTUDIO DESCRIPTIVO Y COMPARATIVO DEL MICROBIOTA SALIVAL HUMANO EN PACIENTES CON CANCER EPIDERMÓIDE DE LARINGE Y PACIENTES SANOS.

FORMULARIO DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

1. Nombre y Apellidos.
2. Número de historia clínica.
3. Género.
4. Fecha del diagnóstico.
5. Antecedentes personales.
 - a. Alcoholismo.
 - b. Tabaquismo.
6. Localización del tumor primario.
 - a. Supraglotis.
 - b. Glotis.
 - c. Subglotis.
7. Anatomía patológica del tumor.

8. Estadio del turno. TNM.

9. Estadio global.

10. Tratamiento.

- a. Quirúrgico.
- b. Radioterapia.
- c. Quimioterapia.

11. Cirugía.

- a. Cordectomía.
- b. Laringectomía parcial supraglótica.
- c. Laringectomía parcial frontolateral.
- d. Laringectomía total.
- e. Vaciamiento cervical.

ANEXO IV



Arrixaca
**Hospital Universitario
"Virgen de la Arrixaca"**
Ctra. Madrid - Cartagena • Tel. 968 36 95 00
30120 El Palmar (Murcia)

Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

CERTIFICA

Que el CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca en su reunión del día 24/06/2019, acta 06/2019 ha evaluado la propuesta de los investigadores **Dr. Diego Hellín Meseguer** y **Dr. Juan Cabezas Herrera** referida al estudio:

Título: Estudio de la microbiota de tejidos y saliva en cánceres de cabeza y cuello y poliposis nasosinusales

Código Interno: 2019-5-2-HCUVA

1º. Considera que

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos de la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad de los Investigadores y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

2º. Por lo que este CEIm emite un **DICTAMEN FAVORABLE.**

Lo que firmo en Murcia, a 24 de junio de 2019

Fdo:



Dr. D. Antonio Piñero Madrona
Presidente del CEIm Hospital Virgen de la Arrixaca

