

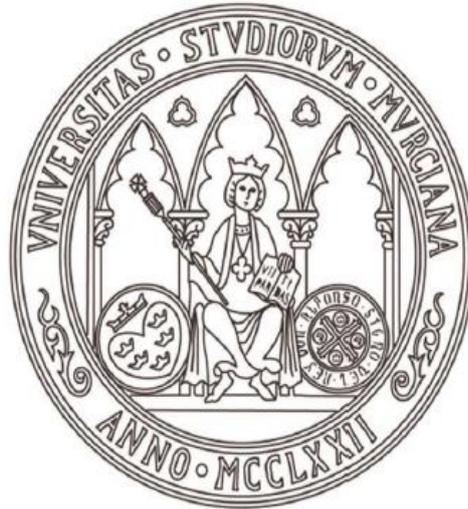


**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS EN SALIVA  
EN EL CARCINOMA EPIDERMOIDE DE FARINGE Y LARINGE

**D. Manuel Matías Sánchez**  
**2024**





**UNIVERSIDAD DE MURCIA**  
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS EN SALIVA EN  
EL CARCINOMA EPIDERMOIDE DE FARINGE Y LARINGE

Autor: D. Manuel Matías Sánchez

Director/es: D. José Antonio Díaz Manzano y D. Juan Cabezas  
Herrera





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. MANUEL MATÍAS SÁNCHEZ

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:

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS EN SALIVA EN EL CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE FARINGE Y LARINGE

y dirigida por, D./Dña. JOSÉ ANTONIO DÍAZ MANZANO D./Dña. JUAN CABEZAS HERRERA 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 22 de JULIO de 2024

Fdo.: MANUEL MATÍAS SÁNCHEZ

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser adjunta en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Table with 2 columns: Field (Responsable, Legitimación, Finalidad, Destinatarios, Derechos) and Content (University of Murcia details, legal basis, purpose, recipients, and rights).



## **AGRADECIMIENTOS**

*Siempre en primer lugar, mi más sincero agradecimiento a mis padres, Paquita y Antonio; firmes cimientos sin los que sin duda esta Tesis Doctoral, y muchas más cosas, nunca habrían llegado a buen puerto.*

*Agradecer también al resto de mi familia: tíos, tías, primas y primos, por estar siempre presentes.*

*No puedo dejar de mencionar a mis tutores, Pepe Díaz y Juan Cabezas, por su paciencia y comprensión en el largo proceso de este doctorado.*

*Mi sincero agradecimiento también a Diego, Sergio y Gaby, por la ayuda que me han prestado, siempre desinteresada y notablemente valiosa.*

*Y por último, agradecer a todas las personas con las que he compartido momentos felices: a Diego Picher y a mis excompañeros de residencia por haber resistido unidos al enemigo común; a la Delefamilia por seguir disfrutando de revitalizantes reencuentros juntos; a Javi, Ana y todos los que nos conocimos en la adolescencia y aún seguimos aquí al pie del cañón; a la “Big Onion” por sus inagotables despropósitos; y por último, a todas las personas con las que trabajo en el Hospital de Elda, con las que he logrado una realización y una satisfacción profesional al alcance de muy pocos.*



# ÍNDICE

<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>1. EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO</b>	<b>3</b>
1.1 <u>El cáncer de cavidad oral</u>	3
1.2 <u>El cáncer de orofaringe</u>	4
1.3 <u>El cáncer de laringe</u>	5
1.4 <u>El cáncer de hipofaringe</u>	8
1.5 <u>Otros cánceres de cabeza y cuello</u>	8
1.6 <u>Diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello</u>	9
1.7 <u>Tratamiento del cáncer de cabeza y cuello</u>	11
1.7.1 <i>Tratamiento quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello</i>	12
1.7.1.1 Tratamiento quirúrgico del cáncer de cavidad oral	12
1.7.1.2 Tratamiento quirúrgico del cáncer de orofaringe	13
1.7.1.3 Tratamiento quirúrgico del cáncer de laringe e hipofaringe	13
1.7.1.4 Tratamiento quirúrgico del cuello	16
1.7.2 <i>Tratamiento no quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello</i>	16
1.8 <u>Pronóstico del cáncer de cabeza y cuello</u>	17
<b>2. BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO</b>	<b>18</b>
2.1 <u>Virus del papiloma humano y P16</u>	18
2.2 <u>Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/HER1)</u>	19
2.3 <u>La vía PI3k/AKT/mTOR</u>	21
2.4 <u>Biomarcadores relacionados con la respuesta inmune</u>	22
2.4.1 <i>Linfocitos infiltrantes en el tumor (TILS)</i>	22
2.4.2 <i>PD1/PD-L1</i>	23
2.5 <u>Otros biomarcadores en cáncer de cabeza y cuello</u>	24
<b>3. LA SUPERFAMILIA DE LAS CATEPSINAS</b>	<b>25</b>
3.1 <u>Estructura y caracterización</u>	26
3.2 <u>Inhibidores de catepsinas</u>	26

3.3 <u>Funciones y patologías asociadas</u>	27
3.3.1 <i>Catepsinas y su relación con las enfermedades neurodegenerativas</i>	28
3.3.2 <i>Catepsinas y su relación con enfermedades cardiovasculares</i>	29
3.3.3 <i>Catepsinas y su relación con enfermedades autoinmunes</i>	30
3.3.4 <i>Catepsinas y osteoporosis</i>	30
<b>4. CATEPSINAS Y CÁNCER</b>	<b>31</b>
4.1 <u>Catepsina B</u>	31
4.2 <u>Catepsina C</u>	33
4.3 <u>Catepsina D</u>	35
4.4 <u>Catepsina E</u>	36
4.5 <u>Catepsina G</u>	37
4.6 <u>Catepsina K</u>	38
4.7 <u>Catepsina L</u>	39
4.8 <u>Catepsina S</u>	39
4.9 <u>Catepsina X/Z</u>	41
<b>5. LAS CATEPSINAS EN ONCOLOGÍA DE CABEZA Y CUELLO</b>	<b>42</b>
<b>6. BIOMARCADORES SALIVARES</b>	<b>47</b>
6.1 <u>Biomarcadores salivares en el cáncer de cabeza y cuello</u>	48
<b><u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	<b>51</b>
<b>1. HIPÓTESIS</b>	<b>53</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>53</b>
<b><u>MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	<b>55</b>
<b>1. DISEÑO DEL ESTUDIO</b>	<b>57</b>
<b>2. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN</b>	<b>57</b>
2.1 <u>Grupo de casos</u>	57
2.2 <u>Grupo control</u>	57

<b>3. DESARROLLO DEL ESTUDIO</b>	<b>58</b>
3.1 <u>Obtención y tratamiento de las muestras</u>	58
3.2 <u>Variables del estudio</u>	59
3.3 <u>Análisis proteómico de las muestras</u>	60
3.4 <u>Análisis de los datos</u>	62
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>65</b>
<b>1. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO DE CASOS</b>	<b>67</b>
<b>2. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO CONTROL</b>	<b>74</b>
<b>3. PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS</b>	<b>75</b>
3.1 <u>Perfil de proteínas basado en actividad global</u>	77
3.2 <u>Perfil de proteínas basado en actividad en grupo casos y grupo control</u>	79
<b>4. ANÁLISIS COMPARANDO CASOS Y CONTROLES PARA DETERMINAR DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S ENTRE AMBOS GRUPOS</b>	<b>80</b>
<b>5. ANÁLISIS RELACIONANDO LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR</b>	<b>82</b>
5.1 <u>Análisis comparando la extensión del tumor primario mediante la variable T clínica agrupada</u>	82
5.2 <u>Análisis comparando la extensión del tumor primario mediante la variable T anatomopatológica agrupada</u>	85
<b>6. ANÁLISIS RELACIONANDO LA PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR</b>	<b>88</b>
6.1 <u>Análisis de la presencia de metástasis ganglionares cervicales mediante la variable N clínica agrupada</u>	88
6.2 <u>Análisis de la presencia de metástasis ganglionares cervicales mediante la variable N anatomopatológica agrupada</u>	91

<b>7. ANÁLISIS RELACIONANDO EL ESTADIO TUMORAL CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR</b>	<b>94</b>
7.1 <u>Análisis comparando el estadio del tumor mediante la variable Estadio clínico agrupado</u>	94
7.2 <u>Análisis comparando el estadio del tumor mediante la variable Estadio anatomopatológico agrupado</u>	97
<b>8. ANÁLISIS RELACIONANDO LA PRESENCIA DE COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S</b>	<b>100</b>
8.1 <u>Análisis de complicaciones postquirúrgicas globales</u>	100
8.2 <u>Análisis de la aparición de fístula salival tras la laringectomía total</u>	104
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b>109</b>
<b>1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA POBLACIONAL</b>	<b>111</b>
1.1 <u>Obtención del grupo de casos</u>	111
1.2 <u>Obtención del grupo control</u>	112
1.3 <u>Perfil epidemiológico de ambos grupos</u>	112
<b>2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS</b>	<b>114</b>
2.1 <u>Análisis de la localización de los procesos neoplásicos</u>	114
2.2 <u>Análisis de los procedimientos terapéuticos realizados</u>	115
2.3 <u>Análisis de las complicaciones postquirúrgicas</u>	116
<b>3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS SALIVARES</b>	<b>118</b>
3.1 <u>Análisis de la actividad global de las catepsinas salivares</u>	119
3.2 <u>Comparación de la actividad de las catepsinas salivares entre grupos</u>	120
3.2.1 <i>Comparación de la actividad de la catepsina B entre grupos</i>	120
3.2.2 <i>Comparación de la actividad de la catepsina L entre grupos</i>	121
3.2.3 <i>Comparación de la actividad de la catepsina S entre grupos</i>	122

<b>4. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE FARINGOLARÍNGEO</b>	<b>123</b>
4.1 <u>La catepsina S salivar como test diagnóstico de carcinoma faringolaríngeo</u>	123
4.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con el carcinoma faringolaríngeo</u>	124
4.3 <u>Aplicación clínica de la catepsina S salivar como biomarcador diagnóstico para carcinoma faringolaríngeo</u>	126
<b>5. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO</b>	<b>128</b>
5.1 <u>La catepsina S salivar como test predictivo de la extensión del tumor primario</u>	128
5.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con la extensión del tumor primario</u>	130
5.2.1 <i>Análisis en función de la cT</i>	130
5.2.2 <i>Análisis en función de la pT</i>	131
5.3 <u>Aplicación clínica de la catepsina S como biomarcador predictivo de la extensión del tumor primario</u>	131
<b>6. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LAS METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES</b>	<b>133</b>
6.1 <u>La catepsina S salivar como test predictivo de las metástasis ganglionares cervicales</u>	133
6.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con las metástasis ganglionares cervicales</u>	134
6.2.1 <i>Análisis en función de la cN</i>	135
6.2.2 <i>Análisis en función de la pN</i>	135
6.3 <u>Aplicación clínica de la catepsina S salivar como biomarcador predictivo de metástasis ganglionar cervical</u>	136
<b>7. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DEL ESTADIO TUMORAL</b>	<b>137</b>
7.1 <u>La catepsina S salivar como test predictivo del estadio tumoral</u>	137
7.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con el estadio tumoral</u>	138
7.2.1 <i>Análisis en función del estadio clínico</i>	138
7.2.2 <i>Análisis en función del estadio anatomopatológico</i>	139
7.3 <u>Aplicación clínica de la catepsina S salivar como biomarcador predictivo del estadio tumoral</u>	140

<b>8. LA CATEPSINA S COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS</b>	<b>141</b>
8.1 <u>La catepsina S salivar como test predictivo de la aparición de complicaciones postoperatorias</u>	141
8.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con las complicaciones postoperatorias</u>	142
<b>9. LA CATEPSINA S COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA APARICIÓN DE FÍSTULA SALIVAL TRAS LA LARINGECTOMÍA TOTAL</b>	<b>144</b>
9.1 <u>La catepsina S salivar como test predictivo de la aparición de fístula salival</u>	144
9.2 <u>La catepsina S salivar y su relación con la fístula salival</u>	145
9.3 <u>Aplicación clínica de la catepsina S salivar como biomarcador predictivo de fístula salival</u>	146
<b>10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO</b>	<b>147</b>
<b>11. NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>148</b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b>149</b>
<b>1. CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>153</b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>173</b>
<b>1. ANEXO I: SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN TNM</b>	<b>175</b>
1.1 <u>Estadificación del cáncer de orofaringe P16 negativo</u>	175
1.2 <u>Estadificación del cáncer de laringe</u>	176
1.3 <u>Estadificación del cáncer de hipofaringe</u>	177
<b>2. ANEXO II: GELES DE ELECTROFORESIS REALIZADOS</b>	<b>179</b>

# **INTRODUCCIÓN**



# 1. CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Según la definición de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, el término “Cáncer de cabeza y cuello” se aplica a los procesos neoplásicos originados en la mucosa de la cavidad oral, faringe, laringe y senos paranasales, así como en las glándulas salivares mayores y menores (1). Ello excluye de esta denominación a los originados en la glándula tiroides y en la piel, entre otros.

Durante el año 2018, se han estimado los nuevos casos de cáncer de cabeza y cuello en 890.000, con un total de 450.000 fallecimientos a nivel mundial. Esto supone el 3% de todos los cánceres diagnosticados ese año (2). En España, se calculó una incidencia en 2012 de 33 casos por 100.000 pacientes/año (3).

El cáncer de cabeza y cuello es, globalmente, entre 2 y 5 veces más común en hombres que en mujeres (4). La edad media de presentación se halla entre la sexta y la séptima década de vida para la mayoría de las localizaciones anatómicas (5).

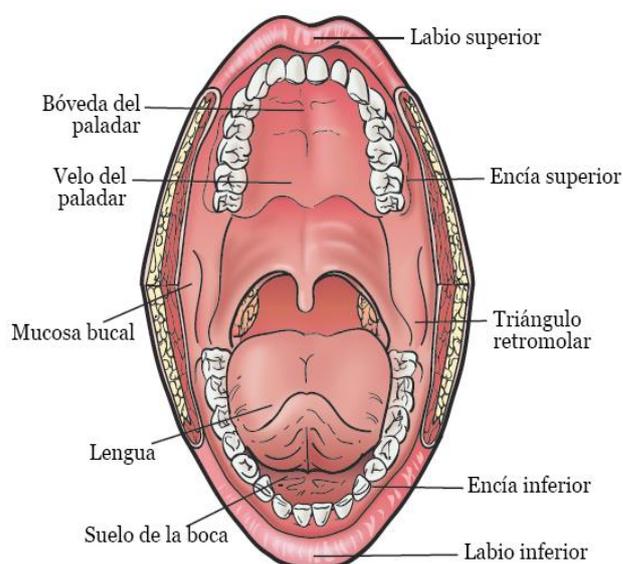
## 1.1 EL CÁNCER DE CAVIDAD ORAL

Bajo este término se incluyen los cánceres originados en los labios, mucosa yugal, encía, lengua móvil, suelo de boca, paladar duro y trígono retromolar [Figura 1]. La histología predominante es la de carcinoma epidermoide (6).

FIGURA 1.

*Localizaciones anatómicas del cáncer de cavidad oral.*

*Memorial Sloan Kettering Cancer Center. 2005. La cavidad oral. [Figura] Recuperado de: <https://www.mskcc.org/es/cancer-care/patient-education/early-stage-oral-cavity>*



Es la localización más común dentro del cáncer de cabeza y cuello. En EE.UU. supone un 5% de todos los tumores diagnosticados; y a nivel global, se reportaron 354.864 nuevos casos en 2018 y 177.384 muertes (2,7).

El tabaco es el principal factor de riesgo para su desarrollo. Además, el frecuente consumo simultáneo con el alcohol supone una potenciación de sus efectos carcinógenos. Es objeto de discusión si el alcohol por sí solo posee un papel carcinogénico (8,9).

Se ha identificado también como factor de riesgo a

la nuez de betel, una sustancia estimulante que se masca con asiduidad en muchas regiones del Sudeste Asiático, donde el cáncer de cavidad oral llega a suponer en ocasiones el tipo de cáncer más comúnmente diagnosticado (7).

El papel del virus del papiloma humano (HPV) en el desarrollo del carcinoma oral es aún objeto de discusión. Ha sido claramente identificado como agente etiológico en las neoplasias de cérvix uterino y de orofaringe (10,11). Se ha detectado al HPV en el 38% de los casos de carcinoma oral, mientras que dicha prevalencia media baja al 24% si se considera al carcinoma de cabeza y cuello globalmente (12). También se ha hallado una relación entre el HPV 16/18 y las lesiones displásicas de la cavidad oral, con una prevalencia media del 24,5% (13). No obstante, aún no hay suficiente evidencia científica para considerarlo un factor de riesgo.

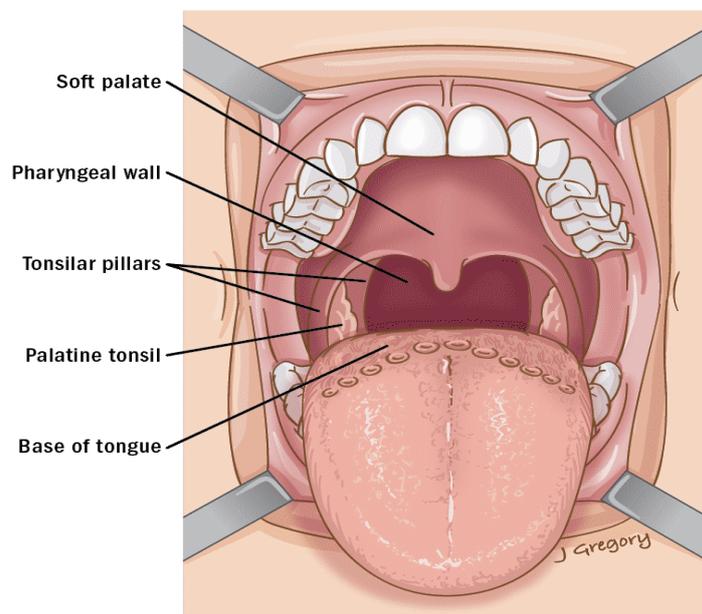
Se han propuesto otros factores de riesgo, como el virus del herpes simple 1 (HSV-1), la infección por el hongo *Candida* o la higiene dental deficiente; con escasos datos que lo apoyen (8).

## 1.2 EL CÁNCER DE OROFARINGE

FIGURA 2.

*Localizaciones anatómicas del cáncer de orofaringe.*

Gregory J, THANC Foundation. 2020. [Figura] Recuperado de: <https://thancguide.org/cancer-types/throat/pharyngeal/oropharyngeal/anatomy/>



Se incluyen aquí los cánceres originados en el paladar blando, amígdalas palatinas, base lingual, valléculas y pared posterior orofaríngea [Figura 2] (6). Supuso en 2018 el 0,5% de todos los cánceres diagnosticados a nivel global, con 92.887 nuevos casos y 51.005 fallecimientos (2). La histología predominante es la de carcinoma epidermoide.

El consumo de tabaco, y su asociación con el alcohol, constituye el principal factor de riesgo (9). Sin embargo, en las últimas décadas ha emergido con fuerza el rol del virus del papiloma humano (HPV), hasta el punto de que actualmente se considera al carcinoma de orofaringe HPV+ una entidad diferente al

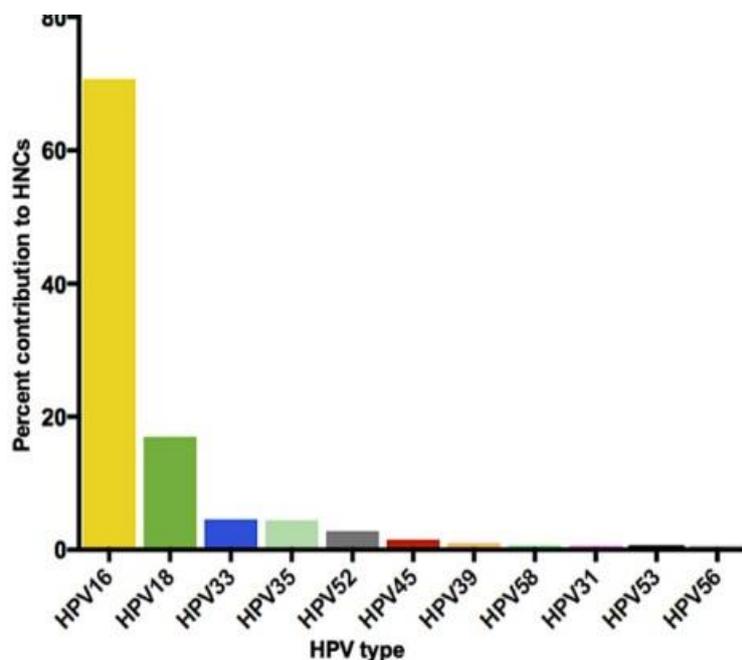
HPV-, con sustanciales diferencias en su epidemiología, manejo terapéutico y pronóstico, así como una estadificación propia (14,15).

El número de carcinomas de orofaringe HPV+ está aumentando en las últimas décadas, especialmente en los países desarrollados; lo que no es sorprendente ya que la infección por HPV constituye una de las enfermedades de transmisión sexual más comunes en el mundo (16). Se estima que suponen el 30-35% de todos los carcinomas de orofaringe (17).

FIGURA 3.

*Prevalencia de los distintos serotipos de HPV en el cáncer de cabeza y cuello HPV+.*

*Tumban E. 2019. The prevalence/contribution of human papillomavirus (HPV) types to HPV-associated head and neck cancers (HPV+ HNC). [Figura] Recuperado de: Tumban, E. (2019). A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. Viruses, 11(10). <https://doi.org/10.3390/v11100922>*



Se conocen más de 200 variedades de HPV. A nivel clínico, es importante distinguir entre los serotipos denominados “de bajo riesgo oncogénico” (6, 11, 40, 54...), responsables de las papilomatosis genitales y respiratorias; de los serotipos “de alto riesgo oncogénico” (16, 18, 33, 35...), asociados con las neoplasias en el área genital y en cabeza y cuello (18). Como puede verse en la Figura 3, los serotipos 16 y 18 son los relacionados con el carcinoma de cabeza y cuello en aproximadamente el 90% de los casos (19).

Debe mencionarse que el tabaco y el alcohol continúan teniendo un rol relevante en los carcinomas de orofaringe HPV+. Se ha demostrado que la incidencia de carcinoma de orofaringe HPV+ es más alta en fumadores, y se ha relacionado el riesgo con el número de paquetes-año, del mismo modo que en el carcinoma HPV- (20).

### 1.3 EL CÁNCER DE LARINGE

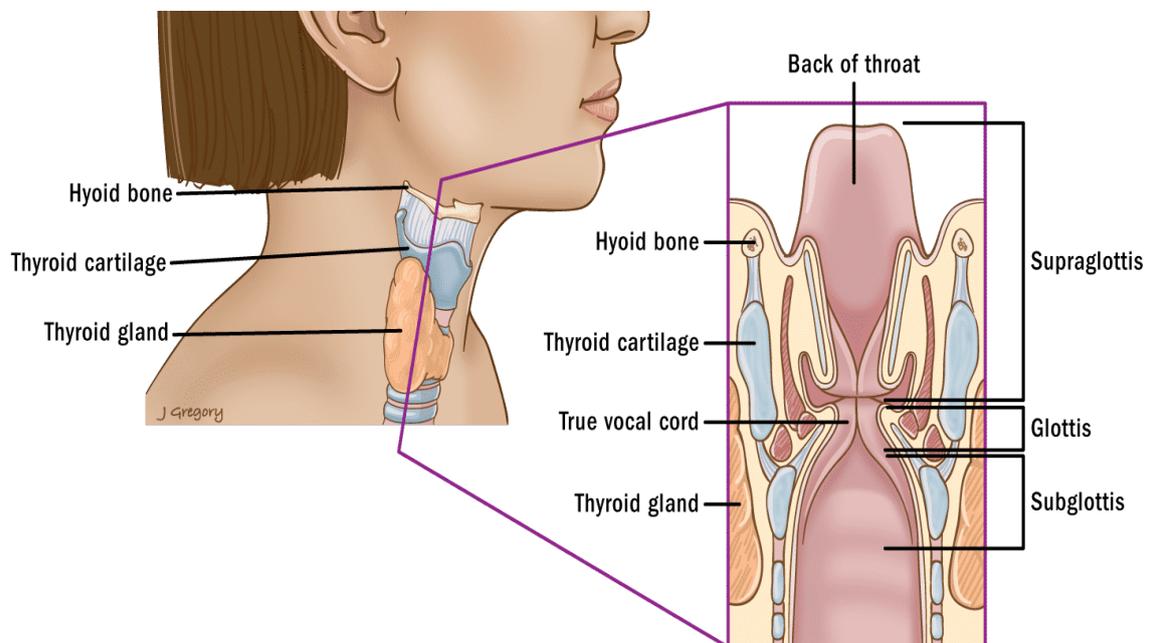
En las neoplasias de la laringe, es preciso su subdivisión en las tres regiones anatómicas que la conforman [Figura 4]:

- **Supraglotis:** se incluyen aquí los cánceres originados en epiglotis, repliegues aritenoepiglóticos, bandas ventriculares y aritenoides. Suponen aproximadamente un tercio de los casos.
- **Glottis:** se incluyen aquí los cánceres originados en las cuerdas vocales, comisura anterior y comisura posterior. Suponen aproximadamente dos tercios de los casos diagnosticados.
- **Subglottis.** Suponen un porcentaje mínimo (menos del 2%) (15,21).

FIGURA 4.

*División anatómica de la laringe.*

Gregory J. 2020. *Coronal Larynx Anatomy.* [Figura] Recuperado de: <https://thancguide.org/es/cancer-types/throat/laryngeal/subglottic/anatomy/attachment/35-coronal-larynx/>



El cáncer de laringe supuso en 2018 el 1% de las neoplasias a nivel mundial, con 177.422 casos diagnosticados y 94.771 fallecimientos. Ello le sitúa como el segundo tumor más frecuente dentro de la cabeza y el cuello, por detrás de las neoplasias de cavidad oral (2). Su incidencia es mayor en hombres que en mujeres, con una proporción 6:1 (22). El carcinoma epidermoide constituye casi en exclusiva su forma histológica.

El tabaco es el principal factor de riesgo para su desarrollo. Se ha demostrado que la incidencia aumenta de manera proporcional al número de paquetes-año, de tal modo que un gran fumador puede tener un riesgo 30 veces superior al de un no fumador (22). También se ha demostrado la reducción en la incidencia de este cáncer

con el cese del hábito tabáquico, aunque el riesgo nunca llega a igualarse con aquellos que nunca han fumado (23).

En cuanto al alcohol, está claro su papel como potenciador de los efectos carcinógenos del tabaco, pero es más controvertido si constituye un carcinógeno por sí mismo. Algunos estudios han hallado un incremento del riesgo de cáncer de laringe en grandes bebedores no fumadores [Tabla 1] (24).

TABLA 1.

*Relación entre alcohol, tabaco y cáncer de laringe. Puede objetivarse el aumento lineal del riesgo de cáncer al aumentar el número de cigarrillos/día. También la OR incrementada en grandes bebedores, aunque no llega a la significación estadística (límite inferior del IC en 0,98).*

*Odds ratio (OR) of laryngeal cancer and 95% confidence interval (CI) for alcohol-drinking non-smokers, and tobacco-smoking non-drinkers. 2002. [TABLA]. Recuperado de: Bosetti, C., Gallus, S., Franceschi, S., Levi, F., Bertuzzi, M., Negri, E., Talamini, R., & La Vecchia, C. (2002). Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. British Journal of Cancer, 87(5), 516–518.*

	Case	Control	OR <sup>a</sup>	95% CI
Alcohol consumption (drinks/day)				
< 3 drinks/day	22	70		
3 – < 5 drinks/day	5	41	1 <sup>b</sup>	
5 – < 8 drinks/day	4	31		
≥ 8 drinks/day	9	18	2.46	(0.98 – 6.20)
Smoking status				
Never smokers	6	69	1 <sup>b</sup>	
Current smokers	44	48	9.38	(3.35 – 26.26)
< 15 cigarettes/day	9	17	3.89	(1.09 – 13.89)
15 – 24 cigarettes/day	19	17	14.22	(4.32 – 46.77)
≥ 25 cigarettes/day	16	14	13.56	(3.90 – 47.19)
Ex-smokers	18	44	4.23	(1.41 – 12.73)

Cada vez son más los estudios que colocan al reflujo gastroesofágico como un factor de riesgo independiente para el cáncer de laringe, que parece específico de este órgano, sin afectar a otras regiones adyacentes como la hipofaringe o la orofaringe (25,26). Se postula que la distinta susceptibilidad de los epitelios a la acción del ácido puede estar detrás de este hecho.

El papel del virus del papiloma humano en el cáncer de laringe es objeto de discusión. No se han hallado por el momento datos que le otorguen un rol carcinogénico, como ocurre en las neoplasias de orofaringe. Además, hasta el momento, los tumores de laringe P16+ no han mostrado diferencias en la supervivencia respecto a los P16-. Sí cabe mencionar que la positividad para P16 es más frecuente en la supraglotis (27,28).

## 1.4 EL CÁNCER DE HIPOFARINGE

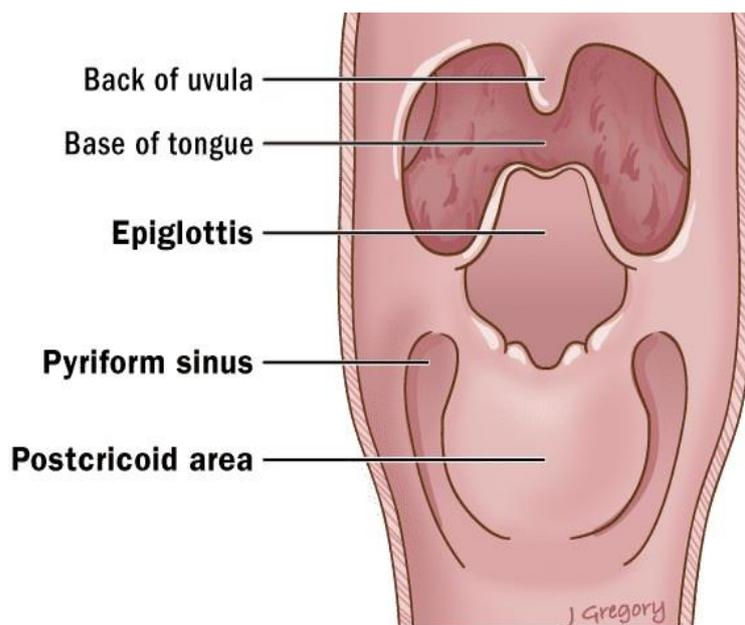
El cáncer de hipofaringe comprende aquellos tumores originados en los senos piriformes, paredes posteriores y laterales de hipofaringe, y área retrocricóidea [Figura 5]. La histología predominante continúa siendo el carcinoma epidermoide (6).

En 2018 fueron diagnosticados en el mundo 80.608 casos (un 0,4% del total), con 34.984 muertes; unos datos similares a los del cáncer de orofaringe, y significativamente menores que en el cáncer de cavidad oral y en el cáncer de laringe (2). La edad media de presentación es de 63 años, con un predominio en varones en proporción 3:1 (29).

FIGURA 5.

Visión posterior de la hipofaringe.

Gregory J. 2020. Posterior view: base of tongue, larynx, hypopharynx & esophagus [Figura] Recuperado de: <https://thancguide.org/cancer-types/throat/pharyngeal/hypopharyngeal/anatomy/>



El tabaco y el alcohol son nuevamente los principales factores de riesgo de estos tumores (30). El reflujo gastroesofágico ha sido propuesto como factor de riesgo, pero, al contrario de lo que sucede en el cáncer de laringe, hasta la fecha no se han hallado datos que avalen esta relación causal (26,31).

Sí que existen indicios de que el reflujo biliar podría ser un factor de riesgo independiente, con relación a un posible efecto carcinógeno de la bilis sobre la mucosa hipofaríngea (32). Sin embargo, aún no se dispone de evidencia científica suficiente para poder realizar dicha afirmación.

En cuanto al HPV, hasta la fecha no se han hallado datos que vinculen el cáncer de hipofaringe con la infección por el virus del papiloma humano (25).

## 1.5 OTROS CÁNCERES DE CABEZA Y CUELLO

El resto de las neoplasias englobadas en la definición de “cáncer de cabeza y cuello” presentan importantes diferencias en su epidemiología, formas histológicas, manejo clínico y pronóstico, respecto de las que han sido mencionadas hasta ahora.

En el caso del cáncer de nasofaringe o cavum, destaca la ausencia de relación con el hábito tabáquico y el alcohol. En cambio, se ha descrito como factor de riesgo al virus de Epstein-Barr, y también toma gran importancia el factor genético, lo que hace que esta enfermedad se considere endémica de ciertas regiones como el Sudeste Asiático (70% de todos los diagnosticados en el mundo) o el norte de África (33).

En cuanto a las neoplasias que asientan en las glándulas salivares, se trata de un grupo muy heterogéneo de tumores, sin claros factores de riesgo conocidos. La última clasificación de la WHO describe 20 formas histológicas malignas y 11 benignas, además de los tumores secundarios y las lesiones no neoplásicas (34).

Debido a estas grandes diferencias, los tumores de nasofaringe y de glándulas salivares quedan excluidos en las siguientes referencias que se harán al cáncer de cabeza y cuello.

## 1.6 DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El diagnóstico del cáncer de cabeza y cuello comienza con una historia clínica completa, prestando especial atención a la presencia de los factores de riesgo ya comentados, y a los síntomas referidos por el paciente, que pueden orientar a la zona donde asienta el tumor. Los síntomas más comunes en oncología de cabeza y cuello son:

- **Disfonía:** como síntoma aislado, orienta hacia un tumor asentado en la glotis; mientras que acompañado por otros síntomas puede delatar una parálisis hemilaringea por extensión de un tumor primario originado en la supraglotis o en la hipofaringe.
- **Disfagia:** orienta hacia un tumor en la orofaringe o la hipofaringe, o un tumor voluminoso de origen laríngeo.
- **Odinofagia:** orienta hacia un tumor de orofaringe o de hipofaringe, especialmente si se asocia con otalgia refleja.
- **Disnea:** orienta hacia un tumor laríngeo que estenose la vía aérea, o una extensión laríngea importante de un tumor hipofaríngeo.
- **Otalgia refleja:** síntoma típico de la orofaringe y la hipofaringe.
- **Hemoptisis:** puede orientar hacia un tumor localizado en laringe, aunque es más común como síntoma en las neoplasias broncopulmonares.
- **Parestesias faríngeas:** las molestias faríngeas pueden aparecer en cualquier tumor de orofaringe, hipofaringe o supraglotis, aunque es un síntoma muy inespecífico para patología tumoral.
- **Tumoración cervical:** la percepción por el propio paciente de una tumoración en el cuello es más habitual en las zonas con mayor riqueza de drenaje linfático, como orofaringe, hipofaringe o supraglotis.

A continuación, debe realizarse una exploración otorrinolaringológica completa: faringoscopia, rinoscopia anterior, otoscopia, nasofibrolaringoscopia y palpación cervical. Puede permitir, en función de la localización del tumor y de los medios disponibles, la obtención de una biopsia, tras cuyo análisis histopatológico se establecerá el diagnóstico de certeza.

El siguiente paso es el estudio de extensión tumoral, para lo que resulta imprescindible una prueba de imagen. Generalmente se utiliza la tomografía computarizada (TC) y/o la resonancia magnética (RM) de cabeza y cuello. La TC es superior a la hora de valorar la invasión ósea en la cavidad oral y la orofaringe, o la invasión cartilaginosa en el caso de la laringe. Sin embargo, ocasiona más artefactos por amalgama dental. La RM posee mayor precisión para valorar la invasión de la fascia prevertebral, o la médula ósea mandibular; sin embargo, su gran inconveniente es la aparición de artefactos por los movimientos relacionados con la deglución y la respiración. En muchas ocasiones, ambas pruebas se consideran estudios complementarios (35,36).

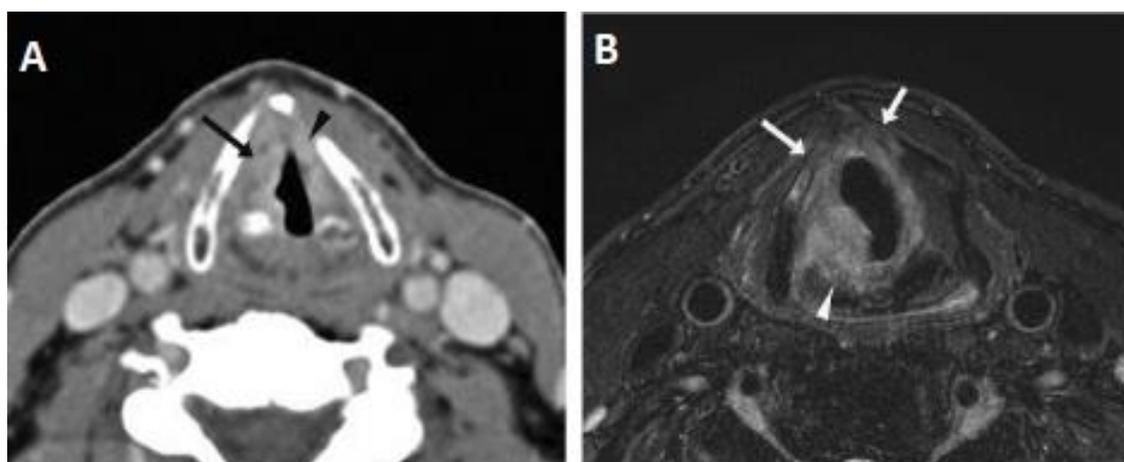
La TC/RM no solo se emplean en la caracterización del tumor primario, sino que simultáneamente son fundamentales para la detección de las metástasis ganglionares cervicales, principal vía de diseminación regional de los tumores de cabeza y cuello. Globalmente, la presencia de metástasis ganglionar cervical en el momento del diagnóstico está alrededor del 40%, siendo los principales factores de riesgo para su desarrollo el tamaño del tumor primario y un grado pobre de diferenciación tumoral. (37).

El cáncer de cabeza y cuello se considera una enfermedad fundamentalmente locorregional, dado que la presencia de metástasis a distancia es baja. El pulmón es la localización más frecuente, con alrededor del 70% de los casos, seguido del hueso y el hígado. Esto hace que, en caso de tumores avanzados, en ocasiones se soliciten pruebas de medicina nuclear como el 18FDG-PET-TAC para la detección de posible enfermedad a distancia (36,38).

FIGURA 6.

A: Tumor glótico visualizado mediante TC. B: Mismo caso. La RM permite apreciar un aumento de la señal en la porción anterior del ala tiroidea derecha, sugestivo de invasión tumoral

Juliano et al. 2018. [Figura]. Recuperado de: 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>



La estadificación tumoral suele realizarse sobre la base del sistema TNM, donde la “T” hace referencia a la extensión del tumor primario, la “N” a la existencia de metástasis ganglionares cervicales, y la “M” a la presencia de metástasis a distancia (39). En el Anexo I pueden consultarse los TNM de cabeza y cuello más recientes de la AJCC.

## 1.7 TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

El tratamiento del cáncer de cabeza y cuello es un proceso complejo con varias alternativas terapéuticas diferentes en función de las características de cada tumor y del propio paciente.

Al tratarse de una enfermedad eminentemente locorregional, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en una etapa en la que es posible un tratamiento con intención curativa, con dos grandes herramientas: la cirugía y la radioterapia, esta última apoyada en ocasiones en la quimioterapia. En aquellos casos de cáncer de cabeza y cuello metastásico o recurrente, entran en juego las terapias sistémicas con quimioterapia y/o inmunoterapia (62).

## 1.7.1 Tratamiento quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello

### 1.7.1.1 Tratamiento quirúrgico del cáncer de cavidad oral

El tratamiento quirúrgico constituye el tratamiento de primera elección en la mayor parte de las neoplasias de cavidad oral, y su objetivo es la exéresis del tumor primario con un margen de seguridad alrededor de al menos 1 cm, ya que distancias menores suponen uno de los principales factores de mal pronóstico tras la cirugía (40).

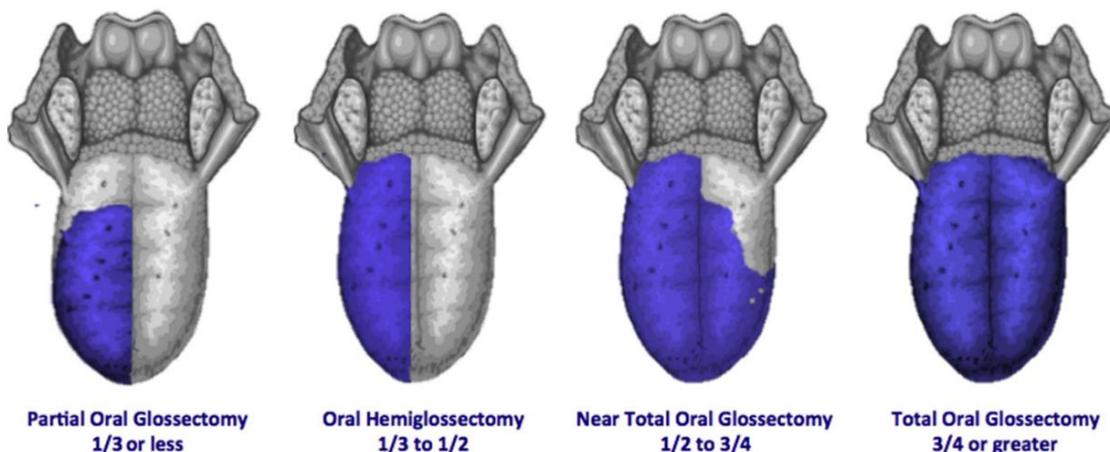
En el caso de la lengua, principal asiento de las neoplasias de cavidad oral, las técnicas quirúrgicas se dividen en función de la cantidad de tejido a extirpar:

- **Glosectomía parcial:** es la extirpación de menos de un tercio de la lengua. Es la única intervención sobre la lengua que puede admitir un cierre directo, sin técnica reconstructiva asociada.
- **Hemiglosectomía:** supone la exéresis de entre un tercio y la mitad de la lengua. Debe asociar técnicas reconstructivas para reducir la morbilidad asociada en forma de disfagia y dislalia.
- **Glosectomía subtotal:** supone la exéresis de entre la mitad y tres cuartos de la lengua. Precisa técnica reconstructiva asociada, pese a lo cual acarrea importante morbilidad.
- **Glosectomía total:** supone la exéresis de más de tres cuartos partes de la lengua. Precisa técnica reconstructiva asociada, pese a lo cual acarrea importante morbilidad (41).

FIGURA 7.

Técnicas de glosectomía.

Shanti R et al. (2018). Oral glossectomy classification based on extent of tissue excised. [Figura] Recuperado de: Shanti, R. M., & O'Malley, B. W. (2018). Surgical Management of Oral Cancer. *Dental Clinics of North America*, 62(1), 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.08.005>



En el caso de los tumores que asientan en reborde alveolar, o de tumores grandes que afectan al hueso mandibular, es preciso la exéresis de una parte de la mandíbula para garantizar una exéresis correcta y unos márgenes de seguridad adecuados. Se utiliza el término de mandibulectomía marginal en aquellos casos en los que es posible respetar la integridad del borde inferior mandibular; y de mandibulectomía segmentaria cuando se extirpa un segmento mandibular completo. Salvo en las mandibulectomías marginales pequeñas, debe asociarse una técnica reconstructiva (42).

#### 1.7.1.2 Tratamiento quirúrgico del cáncer de orofaringe

La orofaringe puede ser abordada quirúrgicamente de forma sencilla en caso de tumores pequeños en localizaciones como la amígdala palatina, donde una amigdalectomía clásica puede extirpar el tumor con unos márgenes adecuados. Sin embargo, tumores más voluminosos o en otras localizaciones obligaban clásicamente a abordajes muy amplios que acarrearían importante morbilidad (43). Por ello, los tratamientos con radioterapia o quimiorradioterapia han supuesto la principal herramienta terapéutica para este tipo de tumores. Sin embargo, en la última década han aparecido nuevas técnicas para el abordaje de la orofaringe como la cirugía transoral ultrasónica (TOUSS) o la cirugía transoral robótica (TORS) que han devuelto a la cirugía un papel importante en el tratamiento del cáncer de orofaringe (44).

#### 1.7.1.3 Tratamiento quirúrgico del cáncer de laringe e hipofaringe

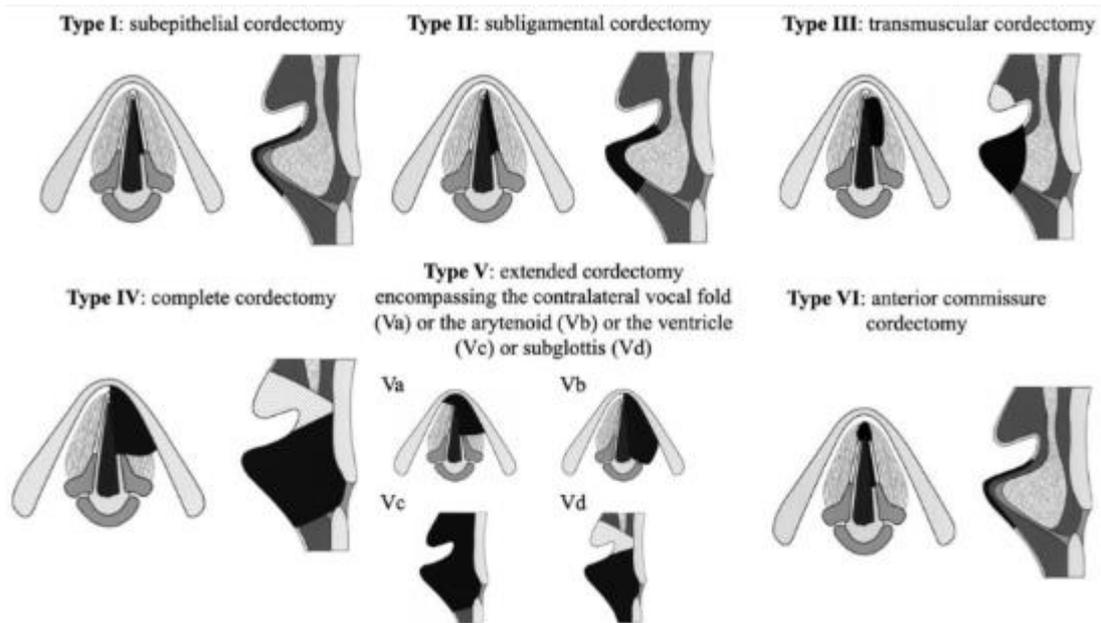
La laringe, por su parte, es la localización anatómica donde mayor diversidad de tratamientos existen. Tumores pequeños, generalmente T1 o T2, de supraglotis, glotis o hipofaringe, son generalmente tratados mediante microcirugía transoral láser, aunque un tratamiento no quirúrgico con radioterapia ofrece resultados equiparables y es empleado como alternativa en muchos centros (45). La Figura 8 muestra las distintas técnicas quirúrgicas con microcirugía transoral láser para el cáncer glótico en estadios iniciales.

Estadios tumorales más avanzados en la laringe obligan a cirugías mucho más agresivas. Las técnicas de cirugía laríngea parcial abierta fueron empleadas durante muchas décadas en un intento de extirpar tumores relativamente voluminosos sin sacrificar la función laríngea. Destacaron entre ellas la laringectomía horizontal supraglótica, la laringectomía frontolateral, la laringectomía frontal anterior y la laringectomía supracricoidea. Sin embargo, la aparición de los protocolos de tratamiento con quimiorradioterapia ha hecho disminuir en gran medida el uso de estas técnicas, aunque aún suponen una excelente opción en casos seleccionados (46).

FIGURA 8.

Clasificación de las cordectomías para el tratamiento quirúrgico transoral del cáncer glótico en estadios iniciales.

Hans S et al (2022). The European Laryngological Society classification of endoscopic cordectomies. Recuperado de: Hans, S., et al. (2022). Laryngeal Cancer Surgery: History and Current Indications of Transoral Laser Microsurgery and Transoral Robotic Surgery. Journal of Clinical Medicine, 11(19). <https://doi.org/10.3390/jcm11195769>



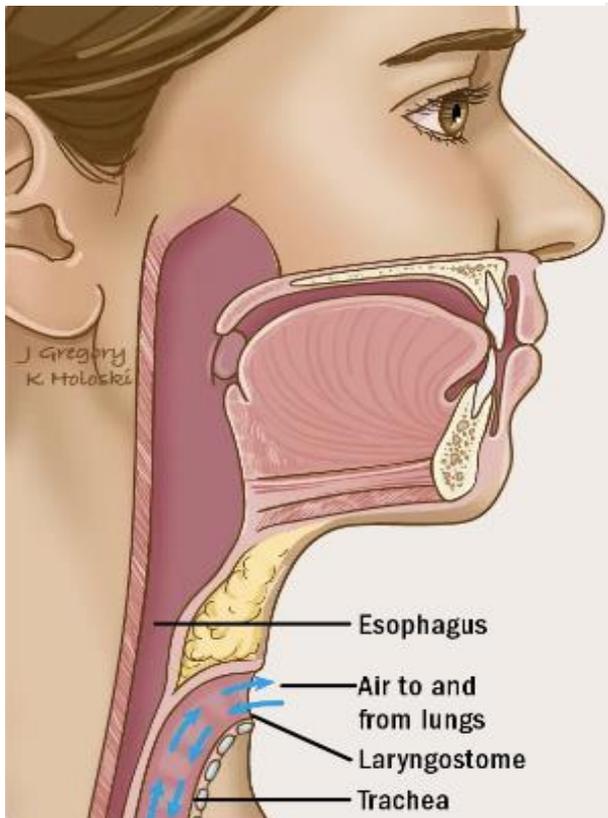
La técnica clásica para el tratamiento del cáncer de laringe, descrita hace 150 años, ha sido la laringectomía total, que continúa siendo actualmente de elección en tumores laríngeos localmente avanzados (laringectomía total primaria) o tras el fracaso de un tratamiento conservador previo con quimiorradioterapia (laringectomía total de rescate) (47).

La laringectomía total supone la extirpación completa la laringe, con la independencia de las vías digestiva y respiratoria, y la creación de un traqueostoma permanente. Aunque es una técnica fiable, bien tolerada incluso en pacientes frágiles, no está exenta de complicaciones postoperatorias. La más frecuente de ellas es la fístula faringocutánea, con incidencias que en la literatura varían entre el 9% y el 57%, aunque la mayoría de los estudios presentan unas tasas de entre el 10% y el 25% (48).

FIGURA 9.

Situación de las vías respiratoria y digestiva superiores en un paciente laringectomizado total.

Gregory J. (2023). Recuperado de:  
<https://thanguide.org/cancer-basics/treatments/surgery/ablative/laryngectomy/>



Los factores de riesgo para la aparición de fístula faringocutánea tras una laringectomía total primaria son:

- La presencia de comorbilidades.
- La exéresis concomitante de una parte de la hipofaringe.
- Niveles preoperatorios de hemoglobina disminuidos.
- Niveles preoperatorios de albúmina disminuidos.
- Márgenes quirúrgicos afectados por enfermedad maligna.(49)

Por el contrario, el cierre de la hipofaringe con una sutura horizontal (en lugar de la habitual sutura en T o vertical) supone un factor protector para la aparición de fístula faringocutánea (49).

La incidencia de fístula faringocutánea es también más elevada en las laringectomías de rescate (50).

La fístula faringocutánea supone un importante aumento de la estancia hospitalaria. Un reciente estudio mostraba una media  $\pm$  desviación estándar de  $32,40 \pm 14,75$  días en los pacientes que presentaban fístula faringocutánea, respecto a una media  $\pm$  desviación estándar de  $16,89 \pm 7,05$  días en aquellos que no la padecían ( $p < 0,01$ ) (51).

Otras complicaciones de la laringectomía son la infección de la herida quirúrgica, con unas tasas de entre el 4% y el 15%; la disfagia, con tasas en torno al 9%; y la hemorragia, presente en el 2-3% de los casos. Todas estas complicaciones son más frecuentes en las laringectomías de rescate respecto a las primarias (52,53). La tasa de mortalidad asociada a la laringectomía total está en torno al 1% (54).

#### 1.7.1.4 Tratamiento quirúrgico del cuello

El tratamiento del cáncer de cabeza y cuello conlleva siempre el tratamiento del tumor primario y del cuello, principal vía de diseminación de estos cánceres, para un adecuado control locorregional. Es por ello por lo que, salvo en ciertas localizaciones muy poco linfógenas como la glotis, la cirugía del tumor primario se asociaba clásicamente con un vaciamiento cervical, ya fuera unilateral o bilateral.

Esta actitud continúa vigente en los casos con adenopatías clínicamente sospechosas en los estudios de extensión, pero resulta más controvertida la actuación en los cuellos cN0. Se sabe que, en estos últimos, el porcentaje de metástasis ocultas está entre el 20% y el 30%, por lo que muchos autores abogan por mantener la realización del vaciamiento cervical de manera electiva (55,56).

Sin embargo, en los últimos años han surgido autores que defienden la vigilancia estricta del cuello y la realización del vaciamiento cervical solo en los casos en los que se detectan adenopatías sospechosas; estrategia conocida en la literatura como “wait and see”. (57). En esta estrategia, está cobrando cada vez más importancia la ecografía cervical, ya que permite evaluar las cadenas ganglionares cervicales de un modo rápido, inocuo y eficaz, además de permitir la obtención de una muestra de las lesiones sospechosas mediante punción ecoguiada (58,59).

#### 1.7.2 Tratamiento no quirúrgico del cáncer de cabeza y cuello

El tratamiento quirúrgico acarrea importantes secuelas para el paciente debido a la pérdida del órgano afectado (laringectomías totales, glosectomías amplias) o a los abordajes empleados (laringofisuras, mandibulotomías). Debido en parte a estas circunstancias, los avances en radioterapia consolidaron esta técnica y actualmente es una herramienta fundamental en el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello en su modalidad de intensidad modulada o IMRT.

La radioterapia aislada constituye actualmente una opción terapéutica excelente en los tumores de faringe y laringe en estadios iniciales, fundamentalmente T1 y T2 (45). En tumores más avanzados, forma parte de los conocidos protocolos de preservación de órgano, en los que, actuando de manera sinérgica con la quimioterapia, se trata de conseguir el control locorregional de la enfermedad evitando las secuelas de las cirugías extensas (60,61).

Por último, la radioterapia y la quimioterapia también juegan un papel importante como terapias adyuvantes, es decir, aplicadas tras un tratamiento quirúrgico inicial. Según las últimas guías oncológicas promulgadas por la Sociedad Española de Oncología Médica, se consideran factores de riesgo para la aplicación de radioterapia aislada adyuvante (generalmente 60-66 Gy de IMRT sobre el tumor primario y las cadenas ganglionares cervicales) (62):

- Invasión perineural.
- Invasión linfovascular.
- Tumores pT3 o pT4.
- Más de 2 adenopatías metastásicas cervicales, sin extensión extracapsular.
- Tumores de cavidad oral u orofaringe con adenopatías metastásicas en los niveles cervicales IV o V.

En cambio, se aconseja un tratamiento adyuvante con radioterapia (60-66 Gy de IMRT sobre el tumor primario y las cadenas ganglionares cervicales) y quimioterapia concomitante (cisplatino 100 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 22 y 43) cuando existen factores de alto riesgo:

- Márgenes quirúrgicos afectos.
- Extensión extracapsular en algunas de las adenopatías metastásicas (62).

## 1.8 PRONÓSTICO DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

En cuanto a la supervivencia, un estudio realizado en Europa con resultados obtenidos entre 2000 y 2007 estimó la supervivencia relativa a 5 años en un 61% para la laringe, un 48% para la cavidad oral, un 41% para la orofaringe, y un 25% para la hipofaringe (63).

Si acudimos a datos más actuales, un estudio publicado en 2021 por Saroul N et al. muestra una supervivencia global del 85% al año, del 58% a los 3 años, y del 52% a los 5 años. Si separamos por localizaciones anatómicas, la tasa de supervivencia a los 5 años fue del 54% para la cavidad oral, del 63% para la orofaringe, del 62% para la laringe, y del 31% para la hipofaringe (64).

Además de la localización anatómica, uno de los factores pronósticos fundamentales es el grado de extensión de la enfermedad. Las tasas de supervivencia a 5 años están alrededor del 73% para tumores pequeños (T1-T2), pero bajan al 35% en tumores T3-T4. También es relevante la presencia de metástasis ganglionares cervicales, con supervivencias del 63% para tumores N0, y del 43% para tumores N+. Si nos referimos al estadio tumoral, la supervivencia a 5 años se estima del 70% en estadios iniciales (I-II) y del 45% en estadios avanzados (III-IV) (64).

## 2. BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

Según la definición del NCI (“*National Cancer Institute*”), un biomarcador es una molécula presente en la sangre, en otro fluido corporal o en los tejidos, que señala la existencia de un proceso, condición o enfermedad. Es muy común en la práctica clínica oncológica el empleo de biomarcadores con tres posibles intenciones: diagnóstica, pronóstica y predictiva (65). El más empleado es el antígeno carcinoembrionario, un grupo de proteínas presentes de manera natural en el periodo embrionario, que se ha relacionado con el cáncer colorrectal, de pulmón o de páncreas, entre otros (66).

En el cáncer de cabeza y cuello, solo existe actualmente un biomarcador para su uso en la práctica clínica: el virus del papiloma humano, del que se hablará a continuación. Son muchas las investigaciones encaminadas a encontrar nuevas moléculas. No obstante, hay que tener en cuenta que solo una pequeña parte de los biomarcadores en desarrollo terminan trasladándose a la práctica clínica, ya que tienen que cumplir una serie de requisitos: elevada sensibilidad, especificidad y valores predictivos (VPP y VPN), sencillez y rapidez para su obtención, así como la aportación de información clínica relevante. Se calcula que solo el 1% de los biomarcadores publicados se utiliza finalmente en la práctica clínica (65,67).

### 2.1 VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y P16

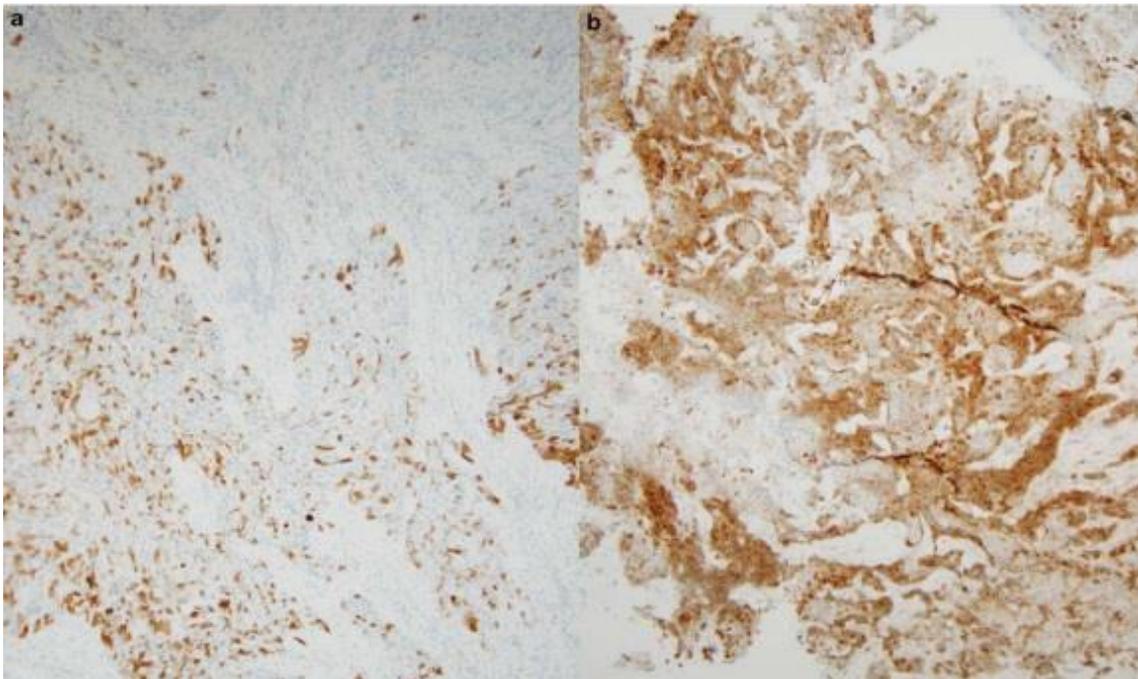
Como ya se ha explicado previamente, aproximadamente un tercio de los casos de carcinoma de orofaringe están causados por el virus del papiloma humano (HPV), y el 90% de los carcinomas HPV+ involucran al serotipo 16. El virus utiliza sus oncoproteínas E6 y E7 para la inactivación de dos proteínas supresoras de tumores: p53 y la proteína del retinoblastoma (Rb). La supresión mantenida de Rb induce un incremento compensatorio de la proteína P16, que es utilizada como marcador de HPV (68,69).

P16 es una proteína supresora de tumores codificada por el gen *CDKN2A*, que participa en la regulación del ciclo celular. En la mucosa faríngea normal, generalmente no es detectable, o lo es con un patrón de tinción irregular. La proliferación descontrolada propia del proceso neoplásico provoca una sobreexpresión de P16 en los carcinomas HPV+ (70,71). Esto no sucede en la mayor parte de los carcinomas HPV- debido a que en estos tiene lugar una pérdida de la función de P16 por alteraciones genéticas en el gen *CDKN2A* (72).

FIGURA 10.

A: Carcinoma con positividad débil e irregular para P16. B: Carcinoma con positividad intensa y difusa para P16.

Lewis JS et al. 2012. [Figura] Recuperado de: Lewis, J. S., Chernock, R. D., Ma, X. J., Flanagan, J. J., Luo, Y., Gao, G., Wang, X., & El-Mofty, S. K. (2012). Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: Extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. *Modern Pathology*, 25(9), 1212–1220. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.79>



Tanto la positividad para HPV demostrada mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la sobreexpresión de P16, usualmente detectada mediante técnicas de inmunohistoquímica; son factores de buen pronóstico sólidamente establecidos. Se ha demostrado en varios estudios con distintas modalidades de tratamiento que el riesgo de muerte disminuye un 40-80% y el de recurrencia un 60-70% en los carcinomas de orofaringe HPV+ (73,74).

Esto explica que se apliquen unos protocolos de tratamiento diferentes y posean una estadificación propia. De hecho, mediante estudios de secuenciación genética, se ha demostrado que las mutaciones genéticas presentes en los tumores HPV+ son diferentes a las detectadas en los cánceres HPV- (75), un argumento más a favor de su consideración como entidades clínicas distintas.

## 2.2 RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR/HER1)

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o HER1) es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de receptores ErbB/HER, de la que se han

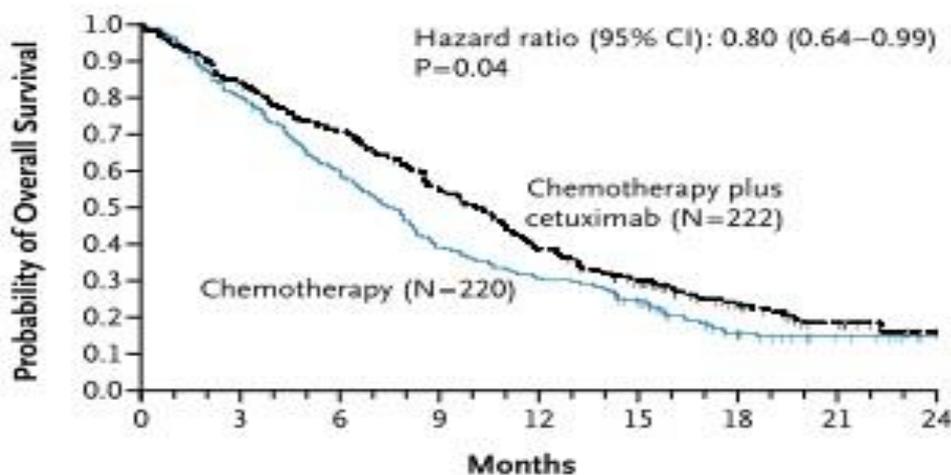
identificado otras tres moléculas (denominadas HER2, HER3 y HER4). Se conocen hasta 6 ligandos para EGFR, entre los que destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento tumoral alfa (TGF $\alpha$ ) (76).

La unión de EGFR con sus ligandos provoca la activación de 4 grandes vías de señalización, que promueven la proliferación celular descontrolada, favorecen la angiogénesis y evitan la apoptosis; es decir, contribuyen al desarrollo del proceso neoplásico. En cáncer de cabeza y cuello, son raras las mutaciones genéticas sobre el oncogen *EGFR*, pero sí es común su sobreexpresión por varios mecanismos. Por ejemplo, el hábito tabáquico puede elevar las concentraciones de TGF $\alpha$  y de anfiregulina, dos ligandos de EGFR (77,78).

FIGURA 11.

*Curva de Kaplan-Meier que muestra incremento de la supervivencia media en el grupo de tratamiento que incluye cetuximab.*

Vermoken J. 2008. Kaplan–Meier Estimates of Overall Survival and Progression-free Survival According to the Treatment Group. [Figura]. Recuperado de: Vermorken, J. B. et al. (2008). Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine*, 359(11), 1116–1127. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0802656>



El EGFR no ha demostrado hasta el momento valor pronóstico en cáncer de cabeza y cuello. Sin embargo, se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal que bloquea la unión entre EGFR y su ligando, denominado cetuximab. Varios estudios han demostrado un incremento de la supervivencia al emplear la pauta de tratamiento con cetuximab y radioterapia, tanto respecto a la radioterapia aislada (79), como respecto al uso de otros quimioterápicos clásicos [Figura 11] (80).

El cetuximab es actualmente de uso habitual en oncología de cabeza y cuello, mientras que otras moléculas que también actúan sobre el EGFR, como el panitumumab, son objeto de estudio en varios ensayos clínicos (81,82).

## 2.3 LA VÍA PI3k/AKT/mTOR

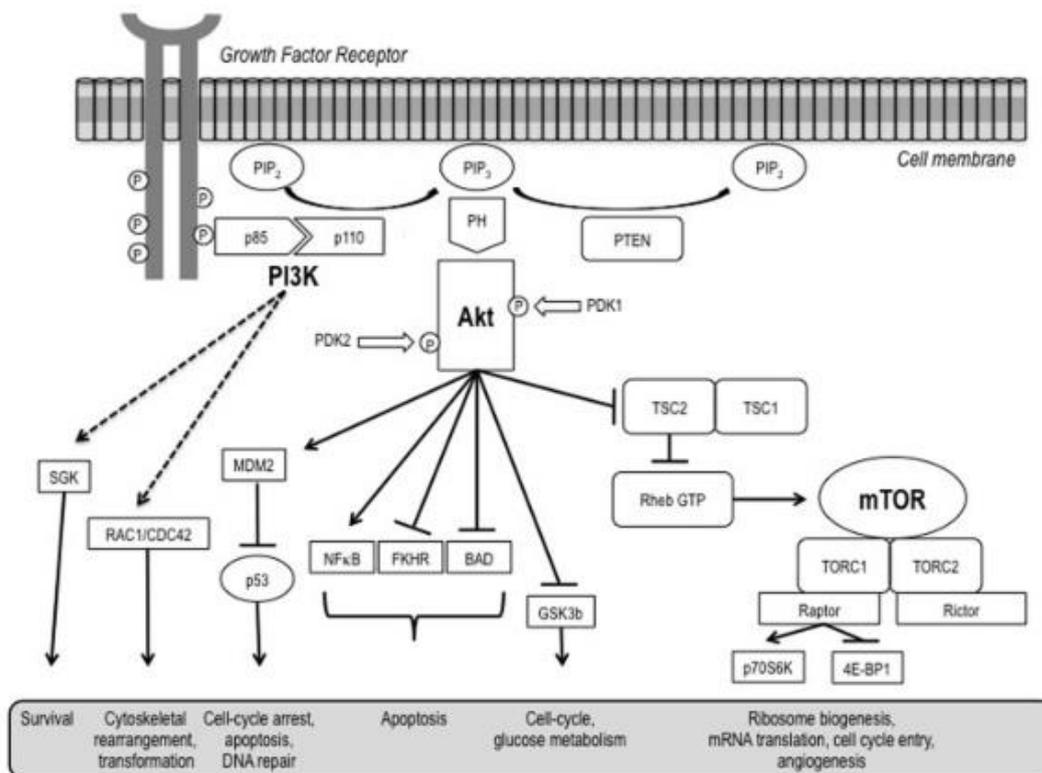
La vía PI3k/AKT/mTOR es una cascada de señalización iniciada por la unión entre EGFR y alguno de sus ligandos. Regula importantes funciones como la absorción de nutrientes y el crecimiento, proliferación, y supervivencia celular (83). Se denomina así por tres de las principales proteínas que participan en la vía: el heterodímero PI3k y las serina/treonina quinasas AKT y mTOR (84), como se aprecia en la Figura 12.

Las alteraciones en esta vía en el cáncer se producen por varios mecanismos. En primer lugar, se han hallado mutaciones de la proteína PI3k en el 8,6% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, que parecen afectar más prominentemente a la faringe. Más frecuentes aún son las sobreexpresiones de proteína PI3k normal, que llegan al 27% de todos los casos. Estos datos se hallan recogidos en la base de datos COSMIC “*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*” (85).

FIGURA 12.

Representación esquemática de la vía PI3k/AKT/mTOR.

Porta C. 2014. A schematic representation of the PI3K/Akt/mTOR pathway. [Figura] Recuperado de: Yu, J. S. L., & Cui, W. (2016). Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development (Cambridge)*, 143(17), 3050–3060. <https://doi.org/10.1242/dev.137075>



Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha demostrado una actividad incrementada de la vía PI3k/AKT/mTOR en el 90% de los cánceres de cabeza y cuello estudiados, en especial un aumento de AKT y mTOR no relacionado con una ulterior hiperactividad del factor de crecimiento epidérmico (86).

Debido a estos hechos, se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la vía PI3k/AKT/mTOR. Los estudios preclínicos en ratones han mostrado reducción del tamaño tumoral y mejorado la sensibilidad a la radioterapia (87). Los estudios clínicos se hallan actualmente en fases I y II, generalmente en casos de tumores muy avanzados (88). Solo el everolimus, un inhibidor de mTOR, se ha ensayado como terapia de inducción. Por el momento, los resultados son discretos, sin lograr demostrar beneficios que apoyen su uso (89,90).

## 2.4 BIOMARCADORES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune frente al tumor ha demostrado tener gran importancia en el pronóstico de los procesos cancerosos, habiéndose estudiado múltiples biomarcadores relacionados con ella.

### 2.4.1 Linfocitos infiltrantes en tumor (TILS)

El microambiente de los tumores sólidos contiene una proporción variable de células inmunes, fundamentalmente linfocitos T, linfocitos NK macrófagos y células dendríticas. Se ha demostrado que concentraciones elevadas de estas células invadiendo el tejido tumoral protegen frente a su crecimiento e invasión (91,92).

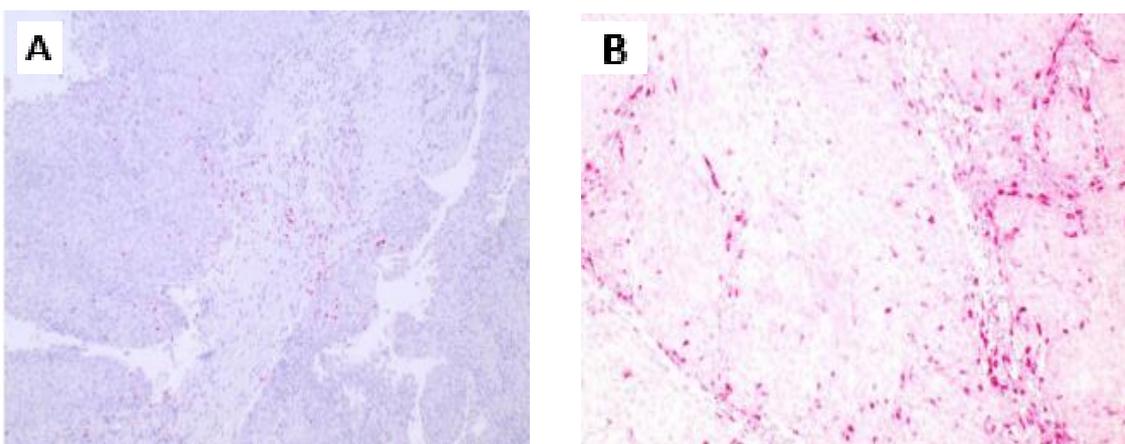
De todos los parámetros estudiados, el más importante ha sido la cuantificación y caracterización de los linfocitos infiltrantes en tumor o TILS (*“tumor infiltrating lymphocytes”*), en concreto los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y los reguladores (CD4+ y FoxP3+) (93). Los TILs, utilizando como biomarcador la molécula CD3+ (común a todos los linfocitos T) y la molécula CD8+ (linfocitos T citotóxicos) han demostrado una íntima relación directa con el pronóstico en el carcinoma de cabeza y cuello (94,95).

Los TILs CD8+, y posiblemente los CD4+, se asocian con unas tasas favorables de supervivencia libre de enfermedad y supervivencia específica de la enfermedad para el cáncer de laringe recurrente/persistente (96).

FIGURA 13.

Ejemplos de carcinoma epidermoide de hipofaringe que muestra la proporción de linfocitos citotóxicos (CD8+) en imagen A, y de linfocitos T colaboradores (CD4+) en la imagen B.

Knebel M et al. 2023. Immunohistochemical analysis of immune cell subsets in the validation cohort.. Representative H&E as well as immunohistochemical stainings are shown for one HPV-negative hypopharyngeal cancer patient. [Figura] Recuperado de: Knebel, M., Körner, S., Kühn, J. P., Wemmert, S., Brust, L., Smola, S., Wagner, M., Bohle, R. M., Morris, L. G. T., Pandey, A., Schick, B., & Linxweiler, M. (2023). Prognostic impact of intra- and peritumoral immune cell subpopulations in head and neck squamous cell carcinomas – comprehensive analysis of the TCGA-HNSC cohort and immunohistochemical validation on 101 patients. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1172768>



#### 2.4.2 PD1/PD-L1

PD-1 es un receptor de membrana presente en la mayor parte de las células inmunes, cuya unión con sus ligandos desencadena una cascada de señalización que lleva a la supresión de la respuesta inmune. Se conocen dos ligandos: PDL-1, que se encuentra en una amplia variedad de estirpes celulares, y PDL-2, restringido a las células inmunes (97).

PDL-1 se expresa con elevada frecuencia en las células tumorales, lo que les permite inhibir las células inmunes a su alrededor. Es especialmente relevante su acción inhibitoria sobre los linfocitos T CD8+, disminuyendo su proliferación, su producción de citoquinas y su actividad citotóxica. De este modo, PDL-1 ayuda al tumor a escapar de la respuesta inmune (98,99).

Niveles elevados de PDL-1 en las células tumorales se han relacionado con peor pronóstico en varios tumores sólidos como el gástrico, el renal o el esofágico. Aún no está claro su papel en el carcinoma de cabeza y cuello (100).

No obstante, se han desarrollado anticuerpos monoclonales que bloquean la unión de PD1 con sus ligandos, y tratan de evitar la supresión de la respuesta inmune. El nivolumab, un anti-PD1, ha demostrado en un ensayo en fase III una mejora de la

supervivencia en cáncer de cabeza y cuello en estadio avanzado, en comparación con el cisplatino (101).

Otro anti-PD1, el pembrolizumab, ha mostrado también un aumento de la supervivencia en cáncer de cabeza y cuello recurrente o metastásico en combinación con otros quimioterápicos. Su efectividad mejora si un análisis previo de las células tumorales muestra elevada expresión de PD-L1 (102).

## 2.5 OTROS BIOMARCADORES EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

La E-cadherina es una glicoproteína de adhesión intercelular. La pérdida de su expresión, o la presencia de mutaciones que den lugar a formas aberrantes, se ha relacionado con la invasión tumoral y la presencia de metástasis en cáncer de cabeza y cuello. Una revisión sistemática y metaanálisis (103) apoya su consideración como factor pronóstico, aunque existen otros autores que discrepan al respecto (104).

Cabe mencionar también las alteraciones en la región cromosómica 11q13, y en especial la amplificación del gen *CCND1*, frecuente en los carcinomas de cabeza y cuello. Da lugar a una sobreproducción de la ciclina D1, que ha sido relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad (105).

### 3. LA SUPERFAMILIA DE LAS CATEPSINAS

#### 3.1 ESTRUCTURA Y CARACTERIZACIÓN

Las catepsinas son un amplio grupo de proteasas descritas en 1929 por Willstater and Baumann, y cuyo nombre procede del término griego “Kathepsins”, que significa “digerir”. Se trata de enzimas lisosomales, presentes en todos los tejidos del organismo, que se subdividen en función de su mecanismo catalítico, su centro activo y su pH óptimo de actuación (106).

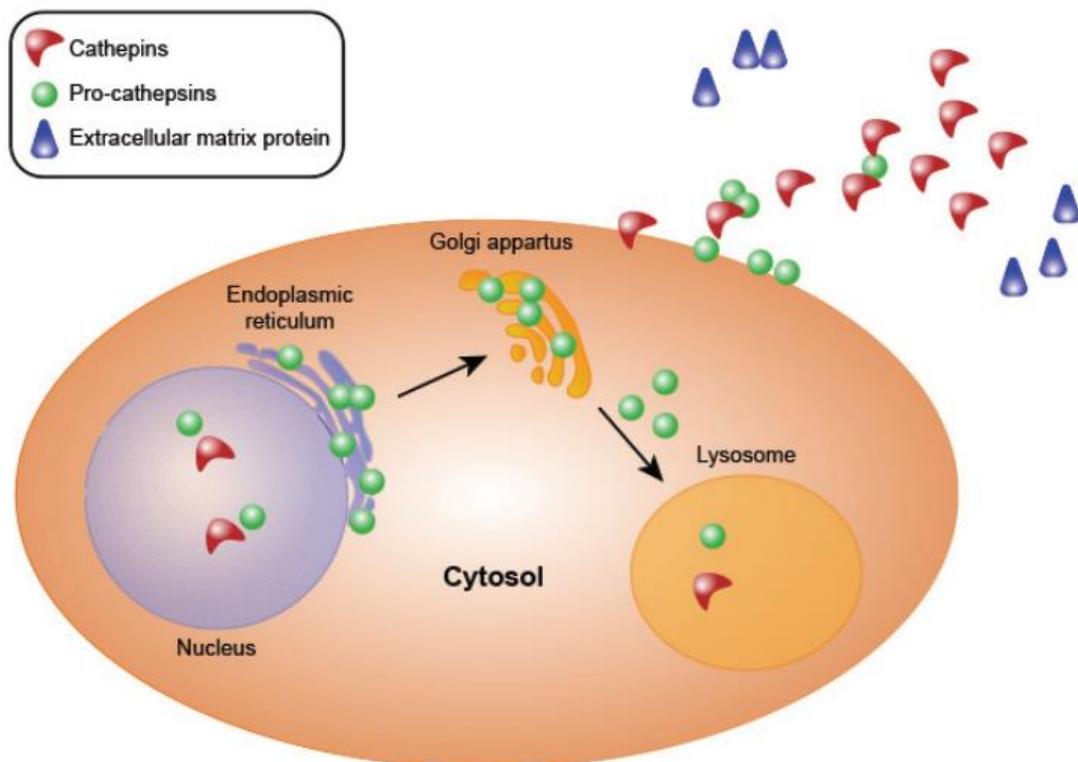
Hasta la fecha se han descrito 15 tipos de catepsinas en el ser humano. Atendiendo a su mecanismo catalítico, se dividen en:

- Cistein-catepsinas: se trata de las catepsinas B, C, F, H, K, L, O, S, V, W y X/Z.
- Serin-catepsinas: se trata de las catepsinas A y G
- Aspartato-catepsinas: se trata de las catepsinas D y E (107).

FIGURA 14.

*Síntesis de las catepsinas.*

Siyuan C. 2017. *Cathepsin synthesis [Figura]*. Recuperado de: Chen, S., Dong, H., Yang, S., & Guo, H. (2017). *Cathepsins in digestive cancers. Oncotarget, 8(25), 41690–41700.* <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16677>



Las catepsinas son sintetizadas en los ribosomas en forma de preproenzimas. Sufren a continuación un procesamiento en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, donde pierden el prepéptido y experimentan procesos de fosforilación y glicosilación [Figura 14].

Como proenzimas o cimógenos, penetran en los lisosomas. Allí perderán el propéptido y serán activadas, en parte debido a un mecanismo autocatalítico favorecido por el ambiente ácido del lisosoma, y también por la acción directa de otras proteasas, como la propia catepsina D (108,109).

Las catepsinas en su forma activa son monómeros con un peso molecular de entre 20 y 35 kilodaltons (kDa); con la única salvedad de la catepsina C, constituida por un tetrámero de unos 200 kDa (110).

Su vida media varía entre unos pocos minutos y varias horas, en función de las condiciones del ambiente en que se encuentren. En general, necesitan de un medio ácido para mantener su actividad y se inactivan de modo irreversible en pH neutro, a excepción de la catepsina S, cuyo pH óptimo de actuación es 6,5 (111,112).

Aunque descritas inicialmente en el interior de los lisosomas, se ha demostrado su presencia en el citosol y en el núcleo de las células (113). Más importante todavía es su secreción al medio extracelular, por parte de células inmunes y de otra índole (queratinocitos, células tiroideas, osteoclastos); donde cumplirán una parte de sus funciones (114).

### 3.2 INHIBIDORES DE CATEPSINAS

FIGURA 15.

*Conformación tridimensional de la estefina A.*

Abrahamson C. 2003. *Human cystatinA* [Figura] Recuperado de: Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., & Nathanson, C. M. (2003). *Cystatins*. *Biochemical Society Symposium*, 99(70)



Las superfamilias de las estefinas, las cistatinas, los cininógenos y las tiropinas son conocidas por su papel inhibitorio sobre las cistein-catepsinas. Las dos primeras son principalmente intracelulares, y se distinguen por la presencia de péptido señal y de puentes disulfuro en las cistatinas (115).

Los cininógenos, por su parte, son grandes proteínas presentes mayoritariamente en el medio extracelular, encargados de la inhibición de las catepsinas presentes en dicha localización (116).

### 3.3 FUNCIONES Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS

La mayoría de las catepsinas son endopeptidasas, es decir, hidrolizan las proteínas sustrato en un punto situado dentro de la cadena peptídica. Constituyen una excepción a esta regla las catepsinas B y X, con actividad carboxipeptidasa; y las catepsinas C y H, que son aminopeptidasas (110,117).

Como proteasas, participan en una amplia variedad de procesos fisiológicos como la apoptosis, el remodelamiento de la matriz extracelular, la cicatrización de heridas, la presentación de antígenos o la maduración de ciertas prohormonas (118).

La disfunción en la síntesis y la actividad de las catepsinas se ha asociado con una gran cantidad de procesos patológicos. La Figura 16 (119) muestra sus funciones en el interior del lisosoma, y la patología en la que participan.

FIGURA 16.

*Catepsinas. Funciones endolisosomales y patologías asociadas*

*Yadati T et al. Cathepsins in the endo/lysosomal compartment. 2020. [TABLA] Recuperado de: Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. Cells, 9(7). <https://doi.org/10.3390/cells9071679>*

Cathepsin	Substrate	Pathological State
Cathepsin B, K, and L	proteoglycan	osteoarthritis
Cathepsin B, L, G, and S	fibronectin	cancer and adipogenesis
Cathepsin B, L, and S	laminin	cancer neovascularization, intestinal trauma
Cathepsin K	collagen type I	osteoporosis, rheumatized arthritis, osteoarthritis
Cathepsin B, K, L, and S	collagen type 2	lung fibrosis, cardiovascular diseases and cancer
Cathepsin B	tenascin	cancer
Cathepsin B, K, L, and S	aggrecan	osteoarthritis
Cathepsin L, S, and B	plexin	tumorigenesis
Cathepsin S	fractalkine	neuropathic pain
Cathepsin D	fibroblast growth factor	breast cancer
Cathepsin V	elastin	cancer
Cathepsin X	CXCL-12	-
Cathepsin W	-	cell-mediated cytotoxicity
Cathepsin A, C, E, F, O, and Z*	-	-

\* Role of these extracellular cathepsins in pathologies in not known.

Por otro parte, la Figura 17, también de los mismos autores (119), hace lo propio con el medio extracelular.

FIGURA 17.

*Funciones en el medio extracelular y patologías asociadas.*

*Yadati et al. Cathepsins in the extracellular space. 2020. [TABLA] Recuperado de: Yadati, T., Houben, T., Bitorina, A., & Shiri-Sverdlov, R. (2020). The Ins and Outs of Cathepsins: Physiologic*

Cathepsin	Enzyme Commission Number	Catalytic Type	Function	Pathology
Cathepsin A	3.4.16.5	serine	dual function: a. protective: $\beta$ -galactosidase and neuraminidase b. degradative: bioactive peptides like bradykinin, angiotensin, oxytocin, endothelin 1	hypertension Galactosialidosis
Cathepsin B	3.4.22.1	cysteine	degrades amyloid- $\beta$ ; activation of pro-hormones and pro-enzymes; trypsin activation; promotes viral entry into cells	Alzheimer's; gaucher disease acute pancreatitis
Cathepsin C	3.4.14.1	cysteine	inflammatory responses and activation of serine proteases including neutrophil elastase and cathepsin G	Papillon-Lefèvre syndrome Periodontitis
Cathepsin D	3.4.23.5	aspartic	embryo and neuronal development brain antigen processing of $\alpha$ -Synuclein; tau, amyloid $\beta$ , apoE; degradation of hormones, proenzymes and growth factors	Alzheimer's disease; CLN 10 Parkinson's; Huntington's
Cathepsin E	3.4.23.34	aspartic	carboxypeptidase A and IgE processing	atopic dermatitis
Cathepsin F	3.4.22.41	cysteine	li chain processing and MHC-II class responses	CLN 13
Cathepsin G	3.4.21.20	serine	auto antigen processing	auto-immune diseases
Cathepsin H	3.4.22.16	cysteine	prohormone processing	type 1 diabetes
Cathepsin K	3.4.22.38	cysteine	TLR signaling; processing of $\beta$ -endorphin in brain	periodontitis; pycnodysostosis
Cathepsin L	3.4.22.15	cysteine	antigen and li chain processing; prohormone processing; degradation of $\alpha$ -Synuclein, tau; promotes viral entry into cells	Parkinson's disease; frontotemporal dementia
Cathepsin S	3.4.22.27	cysteine	antigen processing and presentation; li chain processing	auto-immune diseases
Cathepsin X	3.4.18.1	cysteine	T-cell migration and invasion	-
Cathepsin O	3.4.22.42	cysteine	-	-
Cathepsin V	3.4.22.43	cysteine	natural killer cell and CD8+ cytotoxic cell production	thymic pathology
Cathepsin W	3.4.22.-	cysteine	component of endoplasmic reticulum proteolytic machinery	-
Cathepsin Z	3.4.18.1	cysteine	intracellular protein turnover	-

### 3.3.1 Catepsinas y su relación con las enfermedades neurodegenerativas

La actividad aspartato-proteasa de la catepsina D es esencial para mantener el equilibrio entre síntesis y degradación proteica en el interior de la neurona. Muchas enfermedades neurodegenerativas se producen por el acúmulo de agregados proteicos de, por ejemplo, péptido  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer o huntingtina en la enfermedad de Huntington. Ambos son sustratos de la catepsina D, habiéndose identificado mutaciones en esta que favorecen el desarrollo de las enfermedades mencionadas (120).

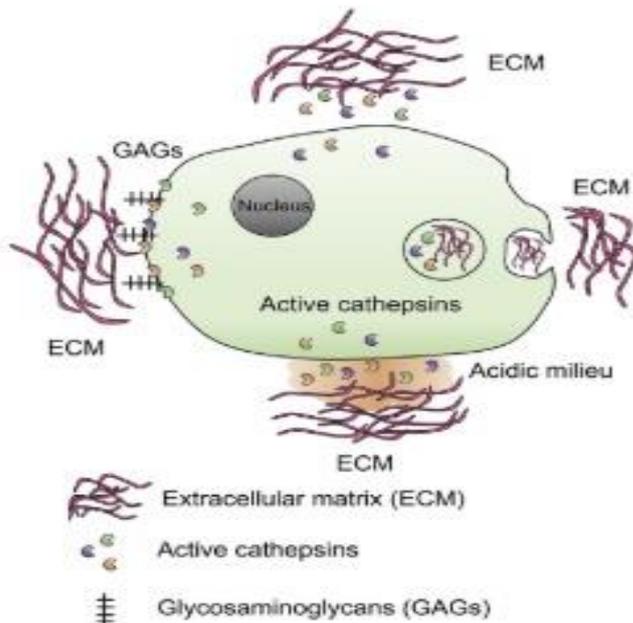
La enfermedad de Parkinson, por su parte, está producida por la pérdida neuronal en los núcleos de la sustancia negra. La  $\alpha$ -sinucleína es la proteína más relacionada con su desarrollo. Estudios *in vitro* y en ratones han mostrado un mayor acúmulo merced a una disminución en la actividad de las catepsinas D y L, encargadas de su degradación (121).

### 3.3.2 Catepsinas y su relación con enfermedades cardiovasculares

FIGURA 18.

*Degradación proteica de la matriz extracelular.*

Zhang X et al. *Cathepsin stability and activity against ECM.* 2020. [Figura]. Recuperado de: Zhang, X., Luo, S., Wang, M., & Shi, G. P. (2020). Cysteinyl cathepsins in cardiovascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1868(4), 140360. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2020.140360>



Las catepsinas juegan un papel fundamental en el remodelamiento de la matriz extracelular, degradando proteínas como el colágeno, la elastina o los proteoglicanos. Esto pueden realizarlo en el medio extracelular o en el medio endolisosomal, previa endocitosis de los sustratos proteicos, como se muestra en la Figura 18 (122).

La aterosclerosis, por su parte, es el mecanismo fisiopatológico responsable de muchas de las enfermedades cardiovasculares, donde tiene lugar una destrucción proteica de la matriz extracelular de la pared arterial. Una alteración en la actividad de las catepsinas S, K, L y C, así como de su inhibidor, la cistatina C, se ha relacionado con el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis y las subsiguientes enfermedades cardiovasculares (123).

De hecho, se ha demostrado que los pacientes con enfermedades cardiovasculares muestran niveles elevados de catepsinas en el corazón, la aorta, y lo que es más relevante, en el plasma sanguíneo. Ello hace que puedan ser usadas como un marcador de riesgo cardiovascular elevado (124).

### 3.3.3 Catepsinas y su relación con enfermedades autoinmunes

Las catepsinas juegan un papel importante en la presentación de antígenos. Se ha demostrado que las catepsinas S y L son necesarias para la maduración del complejo de histocompatibilidad II (MHC-II), encargado de la presentación de moléculas previamente captadas del medio extracelular (125).

Por otra parte, la catepsina G es una serin-proteasa íntimamente relacionada con la respuesta inmune, ya que se encuentra en los lisosomas de los neutrófilos maduros. Se ha demostrado *in vitro* que su inhibición protege frente al desarrollo de enfermedades inflamatorias (126). Además, recientemente se ha podido demostrar su participación en varias enfermedades autoinmunes. En el lupus eritematoso sistémico, la catepsina G es el principal antígeno de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos, cuyos niveles se disparan en las fases activas de la enfermedad. También se han hallado niveles elevados de catepsina G en el líquido sinovial de los pacientes con artritis reumatoide; o en el plasma sanguíneo de los afectados por dermatomiositis (127).

### 3.3.4 Catepsinas y osteoporosis

Es interesante resaltar el papel de la catepsina K, una proteasa presente mayoritariamente en los osteoclastos. Allí, se encarga de la degradación de la matriz extracelular, jugando un papel primordial en la resorción ósea. La ausencia de catepsina K por una mutación genética causa en seres humanos la picnodisostosis, enfermedad que provoca un incremento de la densidad mineral ósea, con malformaciones del esqueleto y fragilidad ósea. Gracias a este descubrimiento se han desarrollado inhibidores farmacológicos de la catepsina K para uso en el tratamiento de la osteoporosis (128,129).

## 4. CATEPSINAS Y CÁNCER

La proteólisis es un fenómeno clave en el desarrollo y progresión de los procesos neoplásicos. En las fases iniciales de la invasión tumoral, la destrucción de proteínas de unión intercelular, como la E-cadherina, facilita el desanclaje de la célula tumoral de sus vecinas.

Además, la proteólisis afecta también a las proteínas de la membrana basal y de la matriz extracelular, creando caminos que emplean las células malignas para migrar y alcanzar las inmediaciones de los vasos sanguíneos y linfáticos. La subsiguiente destrucción de las paredes de estos vasos permite al tumor acceder a la circulación y constituye el primer paso en la formación de metástasis a distancia (130).

Existen varias familias de proteasas que participan en estos procesos. Cabe destacar las metaloproteasas de la matriz extracelular, una familia de endopeptidasas implicadas en la invasión tumoral y la metástasis (131); el activador del plasminógeno tipo uroquinasa, relacionado con la degradación de la matriz extracelular (132); y la superfamilia de las catepsinas, que son secretadas al espacio extracelular y participan en la invasión tumoral, la angiogénesis y la metástasis (133,134).

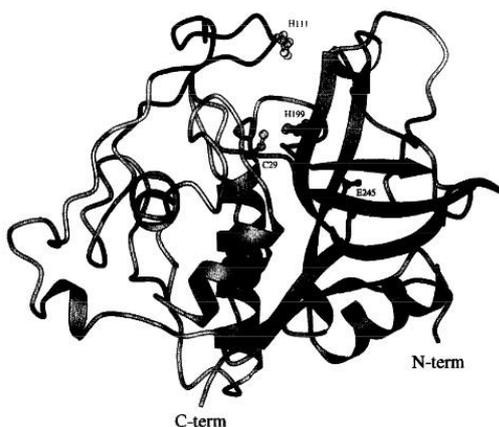
De todas las catepsinas conocidas, las que más han sido relacionadas con el desarrollo del cáncer han sido las catepsinas B, C, D, E, G, K, L, S y X/Z.

### 4.1 CATEPSINA B

FIGURA 19.

*Conformación tridimensional de la catepsina B.*

*Mort JS et al (1997). Schematic representation of the three-dimensional structure of the single chain form of lysosomal cathepsin B. [Figura]. Recuperado de: Mort, J. S., & Buttle, D. J. (1997). Cathepsin B. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 29(5), 715–720.*



La catepsina B es una cisteín-catepsina cuya forma madura consta de una cadena pesada de 25 kDa y una cadena ligera de 5 kDa, que conforman una estructura bilobal con un centro activo formado por cisteína, histidina y ácido aspártico. Posee actividad carboxipeptidasa en ambiente ácido, y actividad endopeptidasa en ambiente con pH neutro (135).

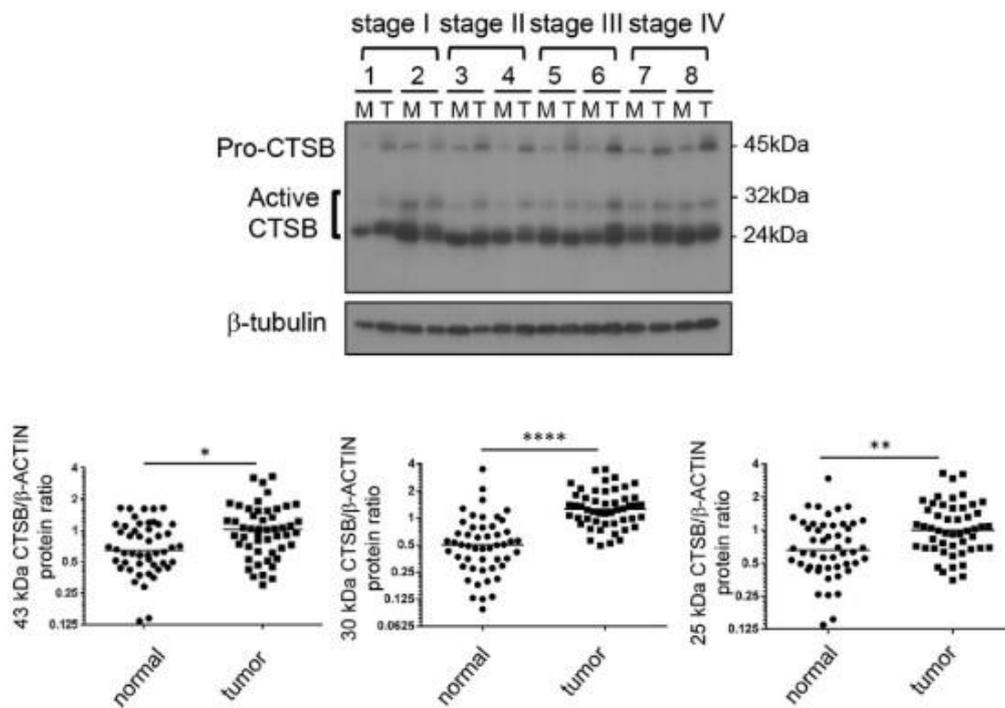
La catepsina B es una proteasa íntimamente ligada a la progresión de los tumores. En los años 90 se descubrieron niveles elevados de catepsina B en la orina, suero y tejido tumoral de pacientes con cáncer gastrointestinal metastásico (136). Ya en el año 2000, estudios de inmunohistoquímica (137) realizados en biopsias de cáncer colorrectal mostraron un aumento de la actividad de catepsina B en el tejido tumoral primario respecto a la mucosa cólica sana, y aún mayor en las metástasis; concentrándose dicha actividad en los macrófagos de los bordes tumorales.

Posteriormente, otros autores publicaron hallazgos similares, como se muestra en la Figura 20. Pero, además, demostraron la disminución en la capacidad de invasión de la célula tumoral al utilizar inhibidores selectivos de catepsina B en el medio extracelular; y la inhibición de su crecimiento *in vitro* y en ratones, mediante técnicas de silenciamiento génico con ARN de interferencia (138,139).

FIGURA 20.

Arriba, análisis de Western blot de ocho muestras de tejido tumoral y margen sano en cáncer colorrectal. Debajo, representación gráfica de dicho análisis con 50 muestras apareadas (margen sano y tumor). Muestra diferencias estadísticamente significativas para la procatepsina B ( $p < 0.05$ ), para la forma activa de 30 kDa ( $p < 0.0005$ ) y para la forma activa de 25 kDa ( $p < 0.005$ ).

Bian B et al. (2015). Cathepsin B expression is increased in adenomas and in colorectal cancers of all stages [Figura] Recuperado de: Bian, B., Mongrain, S., Cagnol, S., Langlois, M. J., Boulanger, J., Bernatchez, G., Carrier, J. C., Boudreau, F., & Rivard, N. (2016). Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Molecular Carcinogenesis*, 55(5), 671–687.



R

Recientemente se ha ensayado *in vitro* un inhibidor de la catepsina B, el 3-bromopiruvato, que ha logrado disminuir la síntesis y la actividad de catepsina B en células humanas de cáncer colorrectal, reduciendo con ello su motilidad y capacidad de invasión (140). También hay estudios preclínicos que demuestran la posibilidad de inhibir la catepsina B mediante compuestos con metales pesados, destacando entre ellos el rutenio (141).

En el caso de las enfermedades tiroideas, estudios proteómicos mediante electroforesis (142) identificaron niveles elevados de catepsina B en el carcinoma papilar y en el carcinoma folicular de tiroides, no presentes en el tejido tiroideo normal ni en patologías tiroideas benignas como el bocio multinodular. Siguiendo dicha línea de investigación, recientemente se ha demostrado un mayor riesgo de metástasis ganglionares en carcinomas papilares con elevados niveles de catepsina B, y también hay indicios de su participación en la metástasis a distancia (143). Estos hallazgos plantean el potencial uso de la catepsina B como marcador de enfermedad maligna, como marcador pronóstico e incluso como diana terapéutica para nuevos fármacos contra la metástasis.

El estudio de la catepsina B también ha aportado datos reveladores en el caso del cáncer gástrico. Se ha hallado una sobreexpresión de la catepsina B en el 60% de los tumores gástricos. Más importante aún, por su relevancia clínica, es que se ha demostrado un aumento de los niveles séricos de catepsina B en pacientes enfermos con respecto a los controles sanos, y se ha podido relacionar con estadios avanzados de la enfermedad y tasas de supervivencia reducidas (144,145).

Esta relación entre catepsina B y cáncer se ha estudiado asimismo desde el punto de vista genómico. Se han encontrado polimorfismos genéticos asociados con un menor riesgo de cáncer gástrico en población china, y con mejores tasas de supervivencia (146).

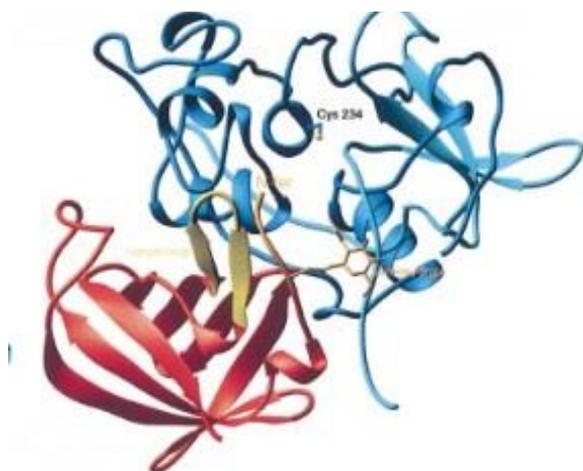
## 4.2 CATEPSINA C

La catepsina C, también llamada dipeptidil-peptidasa I, destaca por su alto peso molecular (200 kDa) debido en parte a que se trata de un tetrámero constituido por 4 subunidades iguales, cada una de las cuales está formada por 3 cadenas polipeptídicas. Se trata de una aminopeptidasa presente sobre todo en tejido renal y esplénico, y más específicamente en los lisosomas de los linfocitos T citotóxicos y otras células mieloides con un papel predominante en la respuesta inmune (147).

FIGURA 21.

Estructura tridimensional de un monómero de catepsina C

Turk, İ et al (2001). Tetrahedral structure of DPPI [Figura]. Recuperado de: Turk, İ., Janjic, V., Igor, S., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S. W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V., & Turk, B. (2001). Turk2001. 20(23).



Su relación con los procesos tumorales comenzó a ponerse de manifiesto a principios del siglo XXI. En los cánceres de esófago distal, se demostró un aumento de la actividad de catepsina C tanto en los carcinomas epidermoides como en los adenocarcinomas de la unión gastroesofágica. Más relevante aún es que, en estos últimos, se pudo relacionar el aumento de catepsina C con menores tasas de diferenciación tumoral y mayor de metástasis ganglionares (148).

En cáncer de mama, se ha puesto de manifiesto la secreción de catepsina C por las células tumorales, y se ha relacionado con la formación de

metástasis pulmonares, al activar y reclutar neutrófilos en los nichos metastásicos, que destruyen la matriz extracelular y favorecen la invasión del proceso oncológico (149).

A nivel genómico, el gen que codifica la catepsina C, denominado *CTSC*, se ha relacionado con varios tipos de cáncer debido a su papel regulador sobre el proceso de autofagia, que permite a las células tumorales sobrevivir y desarrollar resistencia a los fármacos quimioterápicos (150). En estudios *in vitro* con células humanas de cáncer colorrectal, la pérdida de expresión de *CTSC* frenaba el proceso de autofagia y dificultaba el crecimiento de la célula tumoral (151).

También se ha demostrado que el gen *CTSC* actúa como oncogen en el carcinoma hepatocelular (152). En el campo del cáncer cerebral, recientemente se ha demostrado su sobreexpresión en los gliomas, favoreciendo el proceso de malignización al activar varias cascadas de señalización. Ello le convierte en un potencial biomarcador diagnóstico y terapéutico (153).

Existen también ensayos *in vitro* con células humanas de carcinoma renal donde el uso de Timosaponin AIII, una molécula esteroidea con conocido potencial anticanceroso, disminuye la expresión de *CTSC* e inhibe la migración de dichas células tumorales (154).

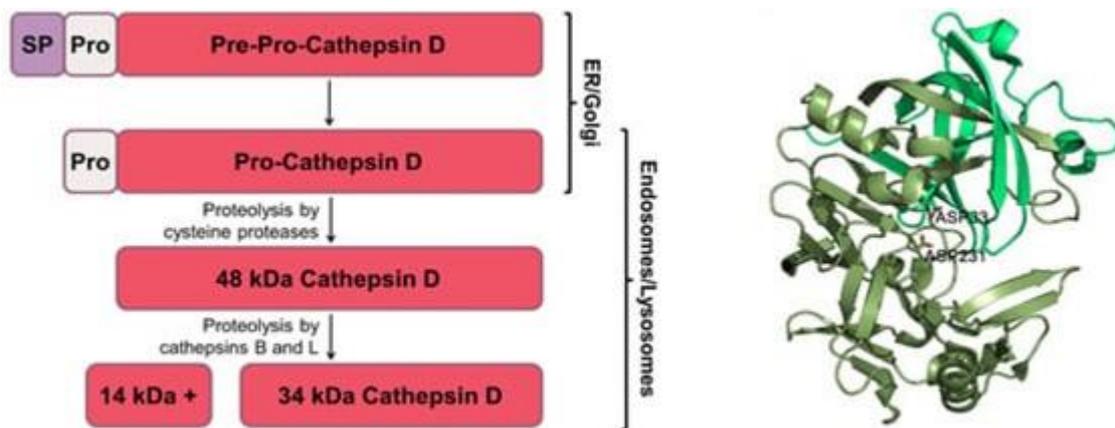
### 4.3 CATEPSINA D

La catepsina D es una aspartato-catepsina encargada de la degradación de proteínas en el medio intracelular. Se sintetiza como preprocatepsina D inactiva (43 kDa), que a su vez se escinde y glicosila para formar procatepsina D (52 kDa) (155). El propéptido es esencial para el plegamiento correcto, la activación y la entrega de la proteína a los lisosomas. Este péptido, que se expresa y secreta en las células cancerosas, se ha demostrado que actúa como factor de crecimiento para las células tumorales (156).

FIGURA 22.

Maduración y estructura de la catepsina D.

Olga Mijanovic et al (2022). *Cathepsin D maturation and structure* [Figura]. Recuperado de: Gieselmann, V., Hasilik, A., & Von Figura, K. (1985). *Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*, 260(5), 3215–3220. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)89493-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)89493-5)



La catepsina D intermedia se procesa aún más por proteasas de cisteína y autocatálisis para generar catepsina D madura (48 kDa), que contiene una cadena pesada (34 kDa) y una cadena ligera (14 kDa) (157). El pH óptimo para su actividad es 3,5; sin embargo, también se ha informado de actividad proteolítica a pH neutro en el citosol de células apoptóticas y en la degeneración neurofibrilar (158).

La relación entre catepsina D y cáncer está probada en multitud de ámbitos. En cáncer de próstata, se ha desarrollado recientemente un test sanguíneo para su detección (Proclarix), que contiene 4 antígenos con relación probada con dicha neoplasia, uno de los cuales es la catepsina D. Ayuda a guiar los casos en los que es recomendable realizar la biopsia prostática (159,160).

Se ha demostrado, mediante análisis de Western-Blotting en tejido, una sobreexpresión de procatepsina D en las células del carcinoma epidermoide de esófago, una entidad que guarda importantes similitudes en cuanto a factores de riesgo y características histológicas, con el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (161).

También en un reciente artículo se analizaron muestras de tejido de carcinoma hepatocelular relacionado con el virus de la hepatitis B, colangiocarcinoma intrahepático y cáncer colorrectal con metástasis hepática, utilizando espectrometría de masas. Se seleccionó un subconjunto de proteínas que mostraron una alta expresión en carcinoma hepatocelular y luego se confirmó mediante Western-blotting que la anexina A2 y la catepsina D estaban sobreexpresadas en el carcinoma hepatocelular. Sus autores sugieren que sugiere que la catepsina D sérica puede ser un biomarcador útil para diferenciar el carcinoma hepatocelular de la cirrosis y otros cánceres hepáticos (162).

En cáncer cerebral, concretamente en uno de sus tipos más agresivos como es el glioblastoma multiforme, se ha demostrado que la catepsina D, y otras de la familia (B, L y X/Z) están intensamente relacionadas con la radiorresistencia del tumor, por lo que se han propuesto como posibles dianas terapéuticas en el futuro (163).

En melanoma de cabeza y cuello, se ha puesto de manifiesto la expresión de las catepsinas B, D y G en el tejido neoplásico, mediante técnicas de inmunohistoquímica. Además, la tinción por inmunofluorescencia realizada en dos de las muestras demostró la expresión de las catepsinas B y D por parte de las células madre del cáncer y la catepsina G por parte de las células dentro del estroma peritumoral (164).

Por último, la catepsina D tiene una importancia vital en cáncer de mama, ya que niveles elevados en el tejido tumoral se han asociado con un peor pronóstico de la enfermedad, y lo que es más importante, se ha demostrado su utilidad como factor predictivo de recurrencia tumoral, especialmente en los casos de cáncer de mama triple negativo, de peor pronóstico respecto a los otros subtipos (165,166).

#### 4.4 CATEPSINA E

La catepsina E ha sido menos estudiada en cáncer respecto a las mencionadas hasta ahora. Se trata de una aspartato-catepsina con actividad puramente intracelular, y con un peso molecular de 48 kDa (167).

La expresión de la catepsina E se ha estudiado como un posible biomarcador temprano para el adenocarcinoma ductal pancreático. Los pacientes con este tumor tienen bajas tasas de supervivencia; principalmente debido a la falta de métodos de detección temprana. Dado que la catepsina E se expresa en enfermedades pancreáticas que son factores de riesgo para adenocarcinoma pancreático, como quistes pancreáticos y pancreatitis crónica, conocer su función en estos tipos de enfermedades podría ayudar en la detección temprana. En general, la expresión y actividad de catepsina E muestra potencial para detectar cáncer y otras enfermedades pancreáticas, pero se necesita más investigación para su aplicación clínica (168).

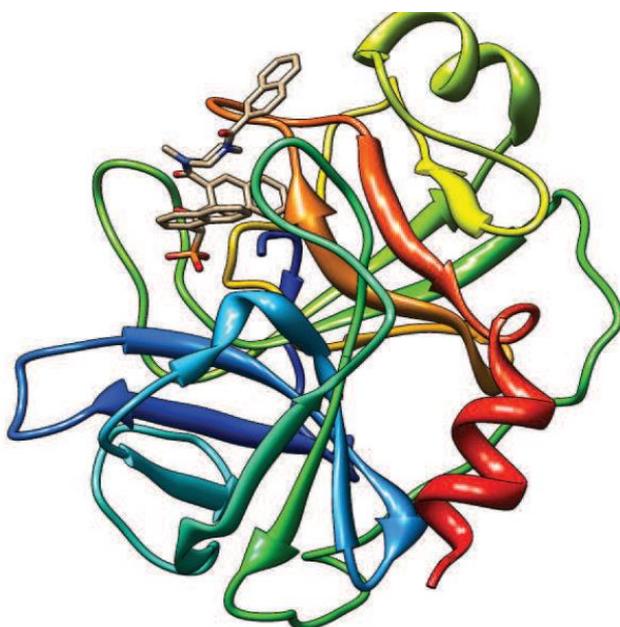
Además, en un reciente estudio sobre biomarcadores en los distintos tipos de cáncer gástrico, se relacionaron los niveles elevados de catepsina E con una disminución de la supervivencia global (169).

## 4.5 CATEPSINA G

FIGURA 23.

*Estructura tridimensional de la catepsina G*

*Maria T. Souza Bastos et al (2013). Cathepsin G structure [Figura]. Recuperado de: Bastos, M., dos Santos, M. H., & Camps, I. (2013). Molecular docking vs structure optimization. Journal of Organic Chemistry Research, 1(1), 1–9.*



La catepsina G es una endopeptidasa con actividad serin-proteasa, presente en los granos azurófilos de los neutrófilos y en otras células mieloides relacionadas con la respuesta inflamatoria. Tiene actividad principalmente extracelular (127).

Se ha estudiado el papel de la catepsina G en la progresión del cáncer colorrectal, hallando una progresión en el crecimiento de las células tumorales cuando se procede a la inhibición de la catepsina G. Del mismo modo, la sobreexpresión de catepsina G (in vivo e in vitro) suprime la cascada de señalización Akt/mTOR y eleva los marcadores asociados con la apoptosis, lo que supone una detención del crecimiento de las

células neoplásicas (170).

También se ha relacionado a la catepsina G con el desarrollo de resistencia a quimioterápicos por parte de las células tumorales. En cáncer de mama, se ha demostrado que la catepsina G puede crear agregados celulares que desarrollen quimiorresistencia por hipoxia a fármacos como la doxorrubicina (171).

Otros papeles de la catepsina G en el proceso cancerígeno son aún más complejos. Por un lado, su actividad proteolítica es esencial para la función antitumoral de los neutrófilos; pero, por otro lado, esta misma proteólisis afecta a la matriz extracelular y es esencial para la formación de los nichos tumorales metastásicos, como se ha demostrado en el tejido tumoral (172).

## 4.6 CATEPSINA K

La catepsina K es una cisteín-catepsina con actividad endopeptidasa, y un peso molecular de 27 kDa en su forma madura (38 kDa la proenzima). Es la colagenasa más potente en mamíferos. Se encuentra de manera muy predominante en los osteoclastos; pero no así en otras células del tejido óseo, dado su papel fundamental en la resorción ósea (173).

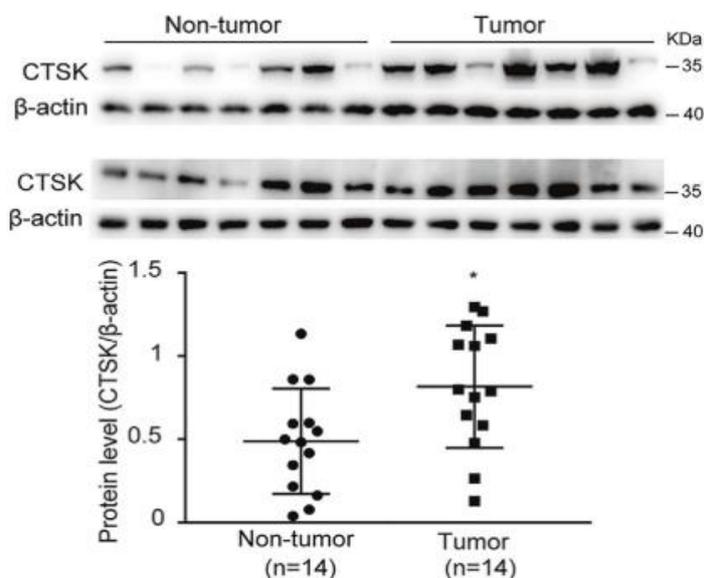
La catepsina K se ha estudiado especialmente en aquellos tumores con tendencia a la formación de metástasis óseas, como el cáncer de próstata. Se han hallado niveles elevados de catepsina K en líneas celulares de cáncer de próstata, y más aún en los nichos metastásicos óseos; no presentes en el tejido prostático normal (174).

De forma similar, también se ha relacionado la sobreexpresión de catepsina K con el desarrollo y proliferación de las células del carcinoma hepatocelular (175).

FIGURA 24.

*Aumento de los niveles de catepsina K en tejido tumoral respecto al tejido sano, en muestras de carcinoma de glándula salivar*

Zhang C et al. (2023). *CTSK is highly expressed in HCC patients [Figura]. Recuperado de: Elhendawy, H. A., & Soliman, S. (2023). Clinicopathological correlation of Cathepsin K expression in salivary gland carcinomas; relation to patients' outcome. Diagnostic Pathology, 18(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13000-023-01353-5>*



encuentra una mayor expresión de esta en tumores de alto grado, con presencia de metástasis ganglionar cervical, con metástasis a distancia, y finalmente con pacientes con menor supervivencia libre de enfermedad. Ello hace que pueda usarse como marcador pronóstico, y constituya una posible diana terapéutica futura (177).

En el caso del cáncer renal, la catepsina K es un marcador de ciertas alteraciones genéticas que aparecen con frecuencia en estos tumores, y que llevan a la activación la vía mTOR. Dado que existen inhibidores farmacológicos de esta vía, hay estudios que postulan la catepsina K como marcador predictivo de respuesta terapéutica a dichos fármacos (176).

Por último, un reciente estudio realizado en 45 casos de carcinomas de glándulas salivares relaciona los niveles de catepsina K con el desarrollo de carcinomas de glándula salivar. Además,

## 4.7 CATEPSINA L

La catepsina L es una endopeptidasa formada por una cadena pesada y otra ligera, que en su forma madura posee un peso molecular de 23 kDa. Posee un centro activo conformado por un residuo de cisteína y otro de histidina (125). Se encuentra en los lisosomas de la mayoría de las células humanas, donde participan en la proteólisis intracelular (178).

FIGURA 25.

*Conformación tridimensional de la catepsina L.*

*Gunčar et al (1999). Fold of cathepsin L, a typical human lysosomal cysteine protease [Figura]. Recuperado de: Gunčar, G., Pungerčič, G., Klemenčič, I., Turk, V., & Turk, D. (1999). Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. EMBO Journal, 18(4), 793–803.*



crecimiento celular como Ki67, Ciclina B1 y HER2, lo que apoya el papel de la catepsina L en el crecimiento y progresión de estos tumores (180).

También se han detectado niveles elevados de ARNm del gen que codifica la catepsina L (CTSL), así como de la propia actividad enzimática de la proteasa, en células mieloides de pacientes afectados por leucemia mieloide crónica. Incluso se han identificado las alteraciones epigenéticas que llevan a este aumento de expresión (hipometilación del gen *CTSL*), y cuya corrección *in vitro* provoca un descenso drástico en la actividad de la catepsina L (181).

## 4.8 CATEPSINA S

La catepsina S es una cisteín-catepsina con actividad endopeptidasa, presente en gran parte de las células del sistema inmune, ya que tiene un papel importante en la presentación de antígenos. Su peso molecular es de 25 kDa en su forma madura (40

La actividad de la catepsina L se ha visto elevada en una notable variedad de procesos oncológicos (179). Se ha demostrado la presencia de una actividad de catepsina L hasta 50 veces superior a la normal en tejido tumoral de endometrio respecto al tejido sano adyacente. Más aún, esta actividad se ha correlacionado directamente con los tumores indiferenciados y con la sobreexpresión de otros genes reguladores del

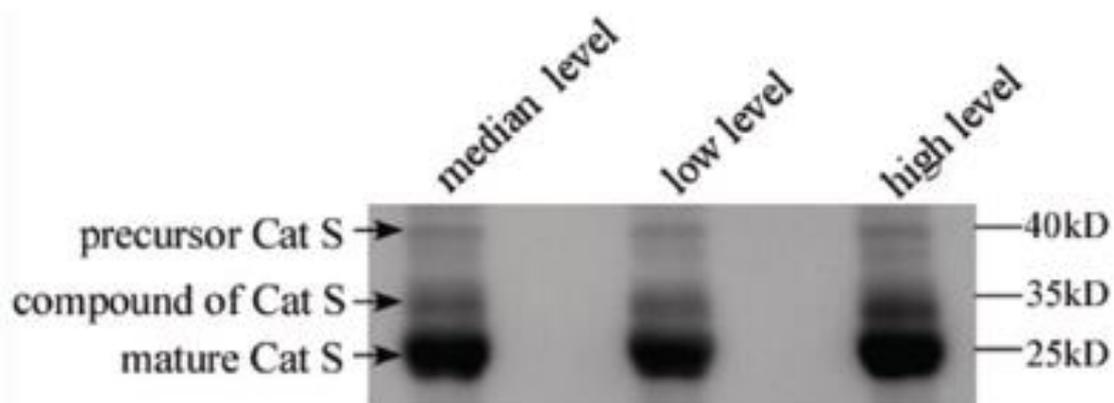
kDa su precursor). Tiene un pH óptimo de actuación de entre 5,5 y 6,5; a diferencia del resto de catepsinas, que actúan en medios ácidos (182,183).

La catepsina S se ha estudiado principalmente en cáncer gástrico, donde se ha demostrado su asociación con una de las características del desarrollo tumoral: la invasión local. Este proceso ocurre debido a que la catepsina S es capaz de degradar la matriz extracelular, modular la inflamación y la respuesta inmune, así como regular otros factores cancerígenos. Se ha encontrado que el valor diagnóstico de la catepsina S sérica tiene una especificidad similar a los marcadores utilizados convencionalmente (CEA, y CA 19-9), pero con una sensibilidad superior. La combinación de la catepsina S sérica y estos marcadores tradicionales ha demostrado los mejores resultados, con una especificidad y una sensibilidad del 91,2 y el 72,6 %, respectivamente (183,184).

FIGURA 26.

*Western-Blotting de catepsina S en tres casos de cáncer gástrico.*

*Liu W., et al (2016). Western blotting analysis of Cat S expression in three different gastric cancer patients' serum. [Figura] Recuperado de: Liu, W. et al. (2016). Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer. Oncotarget, 7(19), 28124–28138.*



Destaca también un estudio de casos y controles en el que se analizaron los niveles séricos de catepsina S en pacientes con cáncer colorrectal. De 80 pacientes y controles sanos incluidos en el estudio, diferentes parámetros como la edad, el sexo y el IMC no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos; sin embargo, los niveles de catepsina S fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes hospitalizados ( $p < 0,001$ ) y se correlacionaron significativamente con el estadio del tumor. Los autores concluyeron que la catepsina S está elevada en el suero de los pacientes con cáncer colorrectal y podría constituir marcador pronóstico importante de la enfermedad tumoral (185).

Por último, se están estudiando inhibidores simultáneos de la catepsina S y de otras proteasas como la MMP9, que han demostrado *in vitro* suprimir el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en líneas celulares de carcinoma de mama triple negativo, uno de los subtipos de cáncer de mama de los que menor arsenal terapéutico se dispone en la actualidad (186).

#### 4.9 CATEPSINA X/Z

La catepsina X o catepsina Z (denominada también por algunos autores como catepsina P) es una cisteín-catepsina con actividad carboxipeptidasa cuya presencia se limita a ciertas células del sistema inmune (macrófagos y células dendríticas) y a las células de la microglía (187).

La catepsina X/Z se ha estudiado en las alteraciones del sistema inmune y en las enfermedades neurodegenerativas, pero menos en el campo de la oncología. Recientemente se le ha relacionado con el glioblastoma multiforme, al hallar niveles elevados de catepsina X/Z en las células tumorales y en los macrófagos de la microglía. También se ha demostrado *in vitro* la disminución de la viabilidad de las células tumorales al exponerse a inhibidores de catepsina X/Z (188).

También se han encontrado indicios de que la sobreexpresión del gen de la catepsina X/Z por mecanismos epigenéticos puede favorecer el desarrollo de cáncer colorrectal (189).

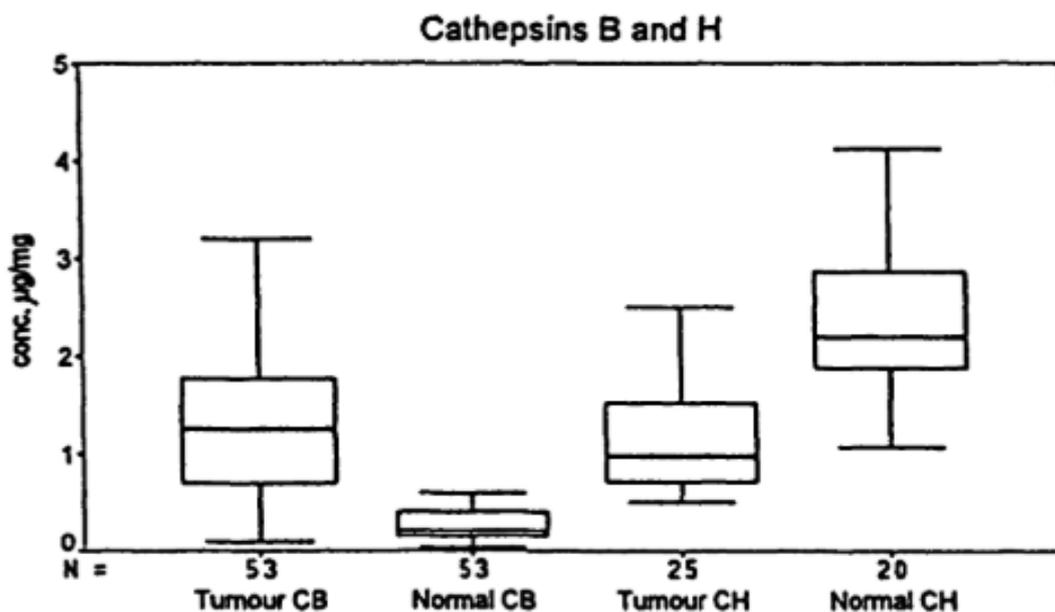
## 5. LAS CATEPSINAS EN ONCOLOGÍA DE CABEZA Y CUELLO

La relación entre la superfamilia de las catepsinas y el cáncer de cabeza y cuello comenzó a estudiarse en los años 90. Concretamente en 1995, se estudiaron citosoles de tejido tumoral y normal de 53 pacientes que padecían carcinoma de cabeza y cuello, y se midieron las catepsinas D, B, H y L usando ensayos inmunorreactivos cuantitativos (ELISA) (190).

FIGURA 27.

*Niveles de catepsina B y H en tejido tumoral de carcinoma de cabeza y cuello, y tejido normal adyacente.*

*Kos J et al (1995). Cathepsin B (CB) and Cathepsin H (CH) in Head and Neck Tumours and Adjacent Normal Tissue. [Figura] Recuperado de: Kos, J., Smid, A., Krasovec, M., Svetic, B., Lenarcic, B., Vrhovec, I., Skrk, J., & Turk, V. (1995). Lysosomal Proteases Cathepsins D, B, H, L and Their Inhibitors Stefins A and B in Head and Neck Cancer. 376(July), 401–405.*



Los valores de las catepsinas D, B y L fueron significativamente mayores en el tejido tumoral, mientras que la concentración de catepsina H fue menor en el tumor que en el tejido normal. Además, se midieron las estefinas A y B (inhibidoras de catepsinas), cuyas concentraciones no fueron significativamente diferentes entre las muestras tumorales y normales. Todas estas mediciones fueron independientes de los factores pronósticos clínicos e histológicos habituales; y se obtuvo una correlación significativa de los valores del tejido tumoral entre las catepsinas B y L, y ambas estefinas (191).

La catepsina D fue la más estudiada durante estos primeros años, debido a que era un conocido biomarcador en el campo del cáncer de mama. Santo Marsigliante y

sus colaboradores utilizaron técnicas inmunorradiométricas para investigar la distribución de la catepsina D en el cáncer de laringe de manera específica. Empleando 33 muestras de tejido tumoral y de tejido no tumoral adyacente, encontraron que la catepsina D estaba presente en ambos tejidos, con un nivel significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) en los fragmentos cancerosos (192,193).

De igual modo, otros autores estudiaron la sobreexpresión de catepsina D no solo en tumores primarios, sino también en las metástasis ganglionares cervicales, encontrando en ellas niveles de catepsina D comparables a los del tumor primario, y muy superiores a los del tejido no tumoral adyacente (194).

Siguiendo este último hallazgo, se trató de relacionar a las catepsinas con los procesos de progresión local y metástasis del cáncer de cabeza y cuello. Un estudio de Gandour-Edwards R y colaboradores de 1999 analizó muestras de biopsias tumorales de 34 pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello para determinar la presencia de catepsina D mediante inmunohistoquímica. Los tumores se consideraron positivos si  $>50\%$  de las células mostraban una fuerte tinción citoplasmática. Trece tumores (38%) tuvieron una expresión alta de catepsina D que estaba fuertemente asociada con metástasis en los ganglios linfáticos cervicales ( $p = 0,008$ ). Cuando se ajustó según el estadio y el grado del tumor, la positividad para catepsina D tenía casi el doble de probabilidades de estar asociada con metástasis en los ganglios ( $p = 0,011$ ). Por tanto, concluyeron que la expresión de catepsina D era un potencial predictor independiente de metástasis en los ganglios linfáticos cervicales (195).

Las investigaciones se centraron no solo en las catepsinas, sino también en sus moléculas inhibitoras. Comenzó a relacionarse a las estefinas y a la cistatina C, sobre todo, con una menor supervivencia de los pacientes cuando sus niveles se encontraban elevados en el medio extracelular. Otro hallazgo interesante es que se encontró una asociación inversamente proporcional entre los niveles del complejo catepsina B/cistatina C y la presencia de un tumor maligno, lo que sugería que tal vez un desbalance entre la proteasa y su inhibidor podía favorecer el proceso neoplásico. (196).

El carcinoma de cavidad oral ha sido el proceso neoplásico de cabeza y cuello cuya relación con las catepsinas más se ha estudiado. Ya en la década de los 90, en estudios *in vitro*, se relacionó a la catepsina L con los procesos de metástasis ganglionar y de invasión ósea por parte de las células cancerosas de cavidad oral (197). Siguiendo esta línea de investigación, se estudió el papel de la catepsina L en las lesiones premalignas de cavidad oral, tratando de dilucidar si contribuía al desarrollo de la enfermedad maligna. Aunque no se pudo demostrar un aumento de catepsina L en las lesiones displásicas no progresivas, respecto a las que progresaron a cáncer; sí que se demostraron niveles más bajos de catepsina L en las displasias no progresivas, con respecto a los carcinomas de cavidad oral (198).

Más adelante, la atención se centró en el rol de la catepsina B. Se demostró que la sobreexpresión de la catepsina B en los carcinomas escamosos orales se correlacionaba positivamente con el estadio tumoral avanzado y el grado de diferenciación histológica pobre. En relación con la invasividad de las células de carcinoma oral, se desarrollaron experimentos *in vitro* utilizando inhibidores de la expresión de ARNm de catepsina B en células de carcinoma epidermoide oral, y se midió su capacidad para invadir una sustancia similar al tejido conectivo llamada Matrigel. Se documentó una importante disminución de la invasividad en las células con inhibición de catepsina B, por lo que los autores hipotetizaban con la posibilidad de controlar la malignidad y la metástasis del carcinoma oral mediante el uso de estrategias de inhibición del ARN dirigidas a la catepsina B (199).

También se estudió la catepsina B en el cáncer oral desde el punto de visto genómico, intentando encontrar polimorfismos que aumentaran el riesgo de este tipo de cáncer. Se describió un mayor riesgo de estadios tumorales avanzados, y un aumento de la susceptibilidad al cáncer oral mediado por carcinógenos ambientales (tabaco y nuez de betel); en los individuos con el polimorfismo A8422G (rs8898) en el gen de la catepsina B (200).

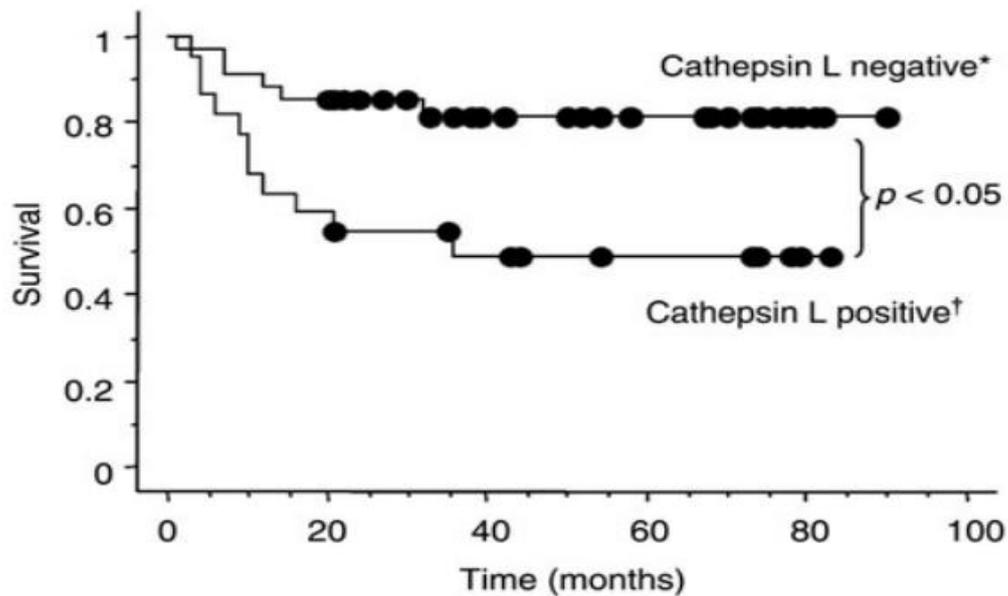
Las investigaciones en cáncer oral fueron progresando desde el campo de la investigación básica experimental a la investigación clínica. Tomando nuevamente a la catepsina L, se diseñó un estudio inmunohistoquímico de análisis de catepsina L en 56 muestras de tejido tumoral, y se analizaron sus niveles con diversos parámetros clínicos. Se encontró un mayor riesgo de metástasis ganglionares cervicales, en consonancia con otras investigaciones previas, y lo que es más importante, se relacionaron los niveles elevados de catepsina L con una peor supervivencia global. (201). Otro estudio de similares características, pero con una muestra de pacientes superior (280 muestras de tejido tumoral) y focalizado en la catepsina B, fue publicado unos años más tarde con las mismas conclusiones (202).

Más recientemente, la catepsina que más interés está despertando en el cáncer oral es la catepsina G, debido a su papel predominante en la respuesta inmune, que la hace un potencial objetivo terapéutico (203). Más recientemente, se ha descrito que la expresión de catepsina G se relaciona positivamente con la presencia de la mayoría de las células inmunitarias, incluyendo mastocitos, DC, eosinófilos, pDC, células B, TFH, macrófagos, células Th17, células Th1, células T, TReg, Tem, células citotóxicas, células NK, células T colaboradoras, aDC, células NK CD56dim, células Th2 y células T CD8+ (204).

FIGURA 28.

Análisis de supervivencia en función de la positividad para catpentina L.

Nakashima T. et al. (2012). Overall survival in cathepsin L-negative and cathepsin L-positive cases. [Figura]. Recuperado de: Nakashima, T., Yasumatsu, R., Masuda, M., Clayman, G. L., & Komune, S. (2012). Prognostic value of cathepsin L and its inhibitor headpin in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Laryngology and Otology*, 126(11), 1134–1137. <https://doi.org/10.1017/S0022215112001995>



Además del cáncer de cavidad oral, la segunda neoplasia más estudiada dentro del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello ha sido el cáncer de laringe. Un estudio realizado en 2011 trató de investigar los roles de la catepsina B y su inhibidor estefina A en 84 pacientes con cáncer de laringe. La expresión proteica de estefina A se asoció negativamente con la metástasis linfática, la recurrencia del cáncer de laringe y la tasa de supervivencia, lo que no se observó con la expresión proteica de catepsina B. Tanto la disminución de la expresión de catepsina B como el aumento de la expresión de estefina A in vitro inhibieron significativamente la migración, la invasión y la proliferación de las células del cáncer de laringe, respectivamente. Los autores conclúan que la estefina A podía ser un potencial predictor del cáncer de laringe, con potencial utilidad en el diagnóstico molecular y la terapia génica. Además, la catepsina B podía ser utilizada como objetivo terapéutico en el tratamiento del cáncer de laringe (205).

Por último, las catepsinas se han estudiado también en relación con el principal factor de riesgo de todos los cánceres de cabeza y cuello: el tabaco. Destaca un trabajo en el que se investigaron los efectos del condensado de humo de cigarrillo sobre la expresión de catepsina (B, D y L) y la invasividad mediada por proteasa en células de carcinoma de células escamosas orales humanas. Los resultados mostraron que el tratamiento de las células con condensado de humo de cigarrillo activó las catepsinas

B, D y L de forma dependiente de la dosis. Tanto la expresión como la actividad de estas catepsinas aumentaron en las células expuestas frente a las no expuestas. Además, es interesante resaltar que la catepsina L tenía el nivel basal más bajo, pero también la inducción más alta en comparación con las catepsinas B y D. La supresión de las actividades de catepsina B y L por inhibidores químicos específicos disminuyó el proceso de invasión. En general, los autores concluían que el humo de cigarrillo estimula la actividad proteolítica de la catepsina B y L y mejora la invasividad en las células de carcinoma de cavidad oral (206).

## 6. BIOMARCADORES SALIVARES

La saliva es un líquido claro, muy diluido (99% agua) y ligeramente ácido (pH entre 6 y 7), con una producción diaria de entre 1 y 1,5 litros. La producción basal de saliva depende de en gran medida de las glándulas submandibulares (65%), seguidas de las glándulas parótidas (20%), sublinguales (8%) y glándulas salivares menores (<10%). En la producción estimulada de saliva, son las glándulas parótidas las predominantes, contribuyendo en más del 50% (207,208).

La saliva contiene una fracción celular, compuesta fundamental por células acinares, ductales y mioepiteliales; una fracción proteica, compuesta por inmunoglobulinas, enzimas y otras proteínas; así como una amplia variedad de electrolitos como sodio, potasio, calcio, bicarbonato y fosfatos (208).

La fracción proteica de la saliva está formada principalmente por inmunoglobulinas, con un papel predominante de la IgA, especializada en la inmunidad de mucosas; y por otras proteínas no pertenecientes al sistema inmune, pero con capacidad antimicrobiana como la lisozima, la lactoferrina y la peroxidasa. Además, otras muchas proteínas con diversas funciones están presentes en pequeñas cantidades (209).

La saliva ofrece un potencial interesante para la obtención de biomarcadores debido a la facilidad para su obtención, no precisando medidas invasivas para los pacientes. Gracias a ello, se aplicaron técnicas de espectrometría de masas en geles en 2 dimensiones que permitieron analizar el espectro proteico de la saliva y obtener valiosa información sobre las distintas proteínas que conforman este líquido biológico (210).

Existen estudios recientes que tratan de analizar estos patrones proteicos en saliva para diagnosticar o predecir un amplio abanico de patologías, desde enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson (211); enfermedades psiquiátricas como la ansiedad o la depresión (212); como, por supuesto, patología tanto benigna como maligna de la cavidad oral. Destacan las citocinas proinflamatorias como IL-4, IL-6 e IL-8, que están incrementadas en los casos de síndrome de Sjögren, periodontitis y liquen plano. Otras son más específicas, como la IL-12 en el Sjögren, o la IL-37 en la leucoplasia oral (213).

En el campo del cáncer de cabeza y cuello, una muy reciente publicación apoya su uso para la obtención de todo tipo de biomarcadores, tanto proteicos como genómicos, epigenéticos o metabólicos; dada su sencillez de obtención y coste-efectividad cuando se compara con otros medios más invasivos (214).

## 6.1 BIOMARCADORES SALIVARES EN EL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO

La búsqueda de biomarcadores salivares en cáncer de cabeza y cuello se ha centrado principalmente en el cáncer de cavidad oral. Son varios los biomarcadores que han podido ser relacionados con esta patología, destacando aquellos relacionados con el sistema inmune:

- **Interleucina-1- $\beta$** : se han demostrado concentraciones superiores en pacientes con cáncer oral respecto a los controles, sobre todo en etapas iniciales. También se ha demostrado su reducción tras la exéresis quirúrgica del tumor. Su punto débil es la baja especificidad, pues también se asocia con enfermedades inflamatorias de la cavidad oral (215,216).
- **Interleucina-6 y Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**: ambos marcadores han mostrado potencial para distinguir entre lesiones premalignas orales y cáncer oral en estadios iniciales, demostrando su aumento progresivo con el desarrollo de la enfermedad maligna (217).
- **Interleucina-8**: se han demostrado niveles elevados en lesiones premalignas orales y en cáncer oral, y lo que es más importante, se han relacionado con una mayor tasa de recaída y una menor supervivencia, lo que le otorga valor pronóstico (218).
- **Interleucina-10**: también posee valor pronóstico, ya que se ha asociado con fenotipos agresivos de cáncer oral (219).

Otro grupo de biomarcadores en cáncer oral lo conforman las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP). Se han demostrado concentraciones salivares de MMP1 y MMP3 entre 6 y 15 veces más altas en pacientes con cáncer oral respecto a controles sanos, con tendencia a aumentar en estadios avanzados (220). Además, MMP2 y MMP9 se asocian con invasión tumoral y metástasis, y la concentración de estos biomarcadores difiere significativamente en la saliva de individuos sanos, pacientes con enfermedades premalignas de la cavidad oral y pacientes con cáncer oral, lo que sugiere su papel diagnóstico y pronóstico (221).

Además de las ya mencionadas, se han identificado otras proteínas en saliva específicas de carcinoma oral: galectina-7, cofilina, precursor de la PCR, creatina quinasa, proteína de unión de ácidos grasos de la cadena m, etc (222).

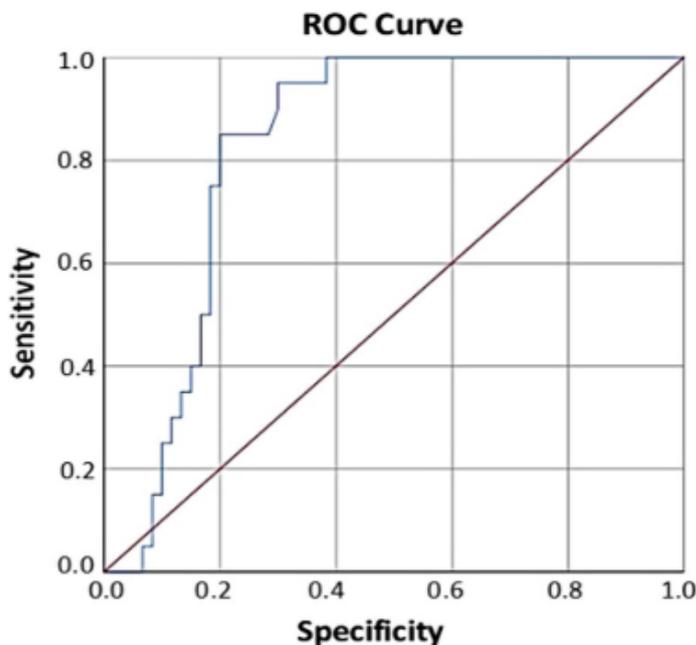
Si ampliamos a estudios que engloben al carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, la lista de proteínas en las que se ha demostrado un aumento de sus niveles en saliva con respecto a los controles sanos es aún mayor: chemerina, lactato deshidrogenasa (LDH), antígeno carcinoembrionario (CEA), peroxiredoxina-2 (PRDX-2), survinina, Zn- $\alpha$ -2-glicoproteína (ZAG), etc. (223).

La mayor parte de los estudios realizados en saliva y cáncer de cabeza y cuello no han prestado atención a la superfamilia de las catepsinas, ni suelen aparecer en los análisis proteómicos salivares que se han realizado hasta la fecha. Sin embargo, es conocida la presencia de catepsinas en la saliva en pacientes sanos, y su papel en el metabolismo periodontal ha sido estudiado dentro del campo de la ortodoncia (224).

FIGURA 29.

Curva ROC para diagnóstico de carcinoma epidermoide oral con los niveles de catepsina B salivar. Área bajo la curva de 0,83.

Shabbir et al. (2022). Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis of the predictive value of Cathepsin B for OSCC. [Figura] Recuperado de: Shabbir, A., Waheed, H., Ahmed, S., Shaikh, S. S., & Farooqui, W. A. (2022). Association of salivary Cathepsin B in different histological grades among patients presenting with oral squamous cell



Por ello, en los últimos años se ha comenzado a estudiar la posible relación de las catepsinas en saliva con el cáncer de cabeza y cuello. Un reciente estudio demostró un incremento significativamente estadístico en los niveles de catepsina B entre pacientes con cáncer oral y controles sanos. Además, halló relaciones significativas con el tamaño del tumor primario (cT) y con el grado de diferenciación tumoral. Los autores concluían que la catepsina B salivar podía constituir un método no invasivo para el diagnóstico y la monitorización del cáncer de cavidad oral (225).

Además, recientemente se ha involucrado a las catepsinas en un aspecto concreto del tratamiento del cáncer de laringe: la aparición de la fístula faringocutánea tras laringectomía total. Un estudio ha demostrado que el octreótido, un fármaco utilizado con frecuencia para el tratamiento de la fístula salival, provoca una disminución en la actividad de las cistatinas, conocidas inhibidoras de las catepsinas. Esto provoca un aumento de actividad de las cisteín-catepsinas, particularmente la catepsina S, lo que se asocia con aumento de la angiogénesis, proliferación y migración celular, y una subsiguiente mejora en el cierre de la fístula (226).



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 1. HIPÓTESIS

Se establece la hipótesis de que existe una actividad de las catepsinas en saliva diferente en los pacientes afectados de carcinoma epidermoide faringolaríngeo P16 negativo, respecto a los pacientes sanos.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es demostrar las diferencias en la actividad de las catepsinas en la saliva de los pacientes que padecen un carcinoma epidermoide de faringe o de laringe P16 negativo, comparándolos con sujetos en los que no existe evidencia de enfermedad maligna ni inflamatoria en la vía aéreo-digestiva superior.

Como objetivos secundarios se establecen:

- a) Establecer un punto de corte de actividad de catepsina en saliva válido que se relacione con el diagnóstico de carcinoma epidermoide faringolaríngeo.
- b) Establecer un punto de corte de actividad de catepsina en saliva válido que se relacione con estadios avanzados de la enfermedad tumoral, prestando especial atención al tamaño del tumor primario y a las metástasis ganglionares cervicales.
- c) Establecer un punto de corte de actividad de catepsina en saliva válido que se relacione con la aparición de complicaciones postoperatorias, haciendo hincapié en la aparición de fístula salival tras la laringectomía total.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El presente estudio ha tenido lugar en los Servicios de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos (Grupo de Investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos del IMIB) entre noviembre de 2016 y junio de 2019. Ha contado con la valoración positiva del Comité de Ética de dicho centro.

Se ha diseñado como un estudio observacional de casos-controles, de carácter ambispectivo.

## 2. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

### 2.1. GRUPO DE CASOS

Los pacientes diagnosticados en las consultas externas de Otorrinolaringología del HCUVA de un tumor localizado en la faringe o en la laringe eran seleccionados para conformar el grupo de casos, previo consentimiento informado por escrito (Anexo II).

Para ello, se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

- Paciente con edad superior a 18 años.
- Paciente con un carcinoma epidermoide de orofaringe, hipofaringe o laringe.
- Paciente que precisa intervención quirúrgica para el diagnóstico o tratamiento de su proceso neoplásico.
- Paciente que acepta el tratamiento oncológico planteado para su caso.

Asimismo, los criterios de exclusión fueron:

- Paciente con una neoplasia faringolaríngea distinta al carcinoma epidermoide.
- Paciente con positividad para P16 en las células de su carcinoma epidermoide, ya que el trasfondo molecular y etiopatogénico de estos tumores es diferente al de aquellos donde no está implicado el virus del papiloma humano.
- Paciente con metástasis cervicales de carcinoma epidermoide de origen desconocido, en el que no se ha podido determinar el origen del tumor primario.
- Paciente con una segunda enfermedad tumoral activa.
- Paciente con enfermedad crónica de base inflamatoria.

De este modo, se seleccionaron un total de 76 pacientes para el grupo de casos.

### 2.2. GRUPO CONTROL

Para la selección del grupo control, se solicitó participación voluntaria en el estudio, previo consentimiento informado por escrito, a los pacientes que acudían para valoración por otro motivo al Servicio de Otorrinolaringología del HCUVA

Se establecieron los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con edad superior a 18 años.
- Pacientes sin enfermedad inflamatoria de la vía aero-digestiva superior.

Del mismo, los criterios de exclusión fueron:

- Paciente con enfermedad oncológica activa.
- Paciente con enfermedad aguda o crónica de base inflamatoria.

Se seleccionaron un total de 32 pacientes para el grupo control.

### 3. DESARROLLO DEL ESTUDIO

La primera fase comprendió la obtención y tratamiento de las muestras de saliva, tanto en el grupo de casos como en el grupo control. Posteriormente, se recogieron en ambos grupos una serie de variables clínicas de interés. A continuación, se procedió al análisis proteómico de las muestras; y, por último, al análisis estadístico de los datos.

#### 3.1. OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el grupo de casos, la muestra de saliva se tomaba con el paciente en ayunas de al menos 8 horas, y sin haber realizado lavado de dientes, inmediatamente previo a su intervención quirúrgica. Se empleaba un tubo de extracción de saliva (Salivette®), de la empresa SARSTEDT. No se realizaba ninguna maniobra de estimulación de saliva.

FIGURA 30.

*Ilustración de un Salivette. A la izquierda, se aprecia la torunda de algodón que se introduce en la boca del paciente. Una vez recogida la muestra salivar, la torunda se deposita en el tubo de ensayo diseñado para su centrifugado (derecha en la imagen).*

Figura recuperada de: <https://helse-mr.no/avdelinger/klinikk-for-diagnostikk/salivette-ror-til-provetaking-spytt>



En el grupo control, la muestra de saliva se tomaba siguiendo el mismo protocolo, pero en la propia consulta médica, a la que había acudido en ayunas por indicaciones dadas previamente.

Una vez recolectadas las muestras, se etiquetaron correctamente y se enviaron al Biobanco de la Región de Murcia. Las muestras son centrifugadas a 3000g durante 5 minutos en centrífuga (Beckman Allegra X-12R), con el objetivo de separar la fracción soluble, que es la necesaria en el presente estudio, de la fracción celular. Ambas fueron almacenadas a -80°C para su posterior análisis.

### 3.2. VARIABLES DEL ESTUDIO

- Edad.
- Sexo: masculino o femenino.
- Síntomas: odinofagia, disfagia, disfonía, disnea, otalgia, hemoptisis, parestesias faríngeas y/o tumoración cervical; cada uno de los cuales expresado como variable cualitativa dicotómica: sí/no.
- Palpación cervical: presencia o no de adenopatías sospechosas de malignidad.
- Meses desde el inicio de los síntomas.
- Hábito tabáquico: sí/no.
- Número de paquetes-año.
- Presencia de hábito enólico: sí/no.
- Antecedentes personales de cáncer: sí/no.
- Localización primaria del tumor: orofaringe, hipofaringe, supraglotis, glotis, subglotis; cada uno de los cuales expresado como variable cualitativa dicotómica: sí/no.
- T clínico: T1, T2, T3, T4a o T4b.
- N clínico: N0, N1, N2a, N2b, N2c, N3a o N3b.
- M clínico: M0 o M1.
- Estadio clínico, según la AJCC en su octava edición: I, II, III, IVA, IVB o IVC.
- Adenopatías metastásicas en TC.
- Presentación del tumor: primario o metástasis cervical.
- Tratamiento inicial: cirugía, radioterapia o quimiorradioterapia.
- Tratamientos posteriores: ninguno, radioterapia o quimiorradioterapia.
- Tipo de cirugía: amigdalectomía, microcirugía transoral láser, laringectomía parcial o laringectomía total.
- Vaciamiento cervical: sí/no.
- Realización de traqueotomía previa: sí/no.
- Presencia de complicaciones postquirúrgicas: fístula salival, hemorragia, infección o insuficiencia laríngea.

- Necesidad de gastrostomía: sí/no.
- Estancia hospitalaria, en días.
- Grado de diferenciación tumoral: bueno, moderado, pobre o indiferenciado.
- Márgenes: afectos o libres.
- Presencia de ganglios metastásicos en la pieza quirúrgica: sí/no.
- Presencia de rotura capsular en los ganglios extirpados: sí/no.
- T anatomopatológico: pT1, pT2, pT3, pT4a, pT4b.
- N anatomopatológico: pN0, pN1, pN2a, pN2b, pN2c, pN3a o pN3b.
- Estadio anatomopatológico: pI, pII, pIII, pIVA, pIVB, pIVC.

### 3.3. ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LAS MUESTRAS

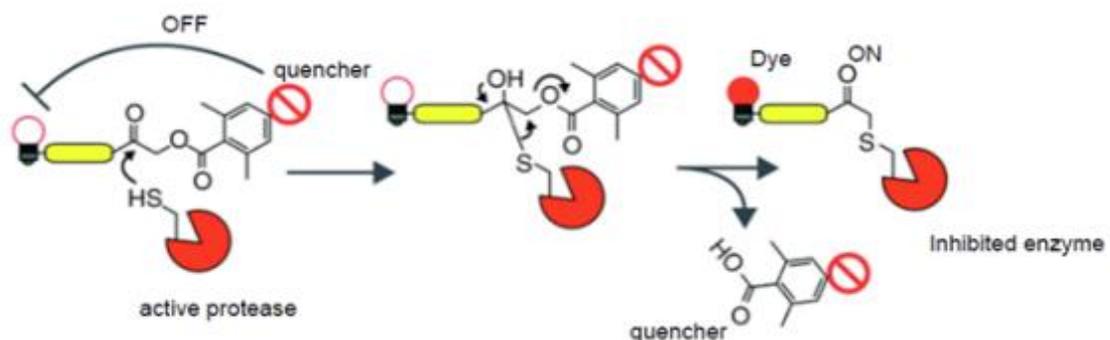
En el análisis proteómico de las muestras de saliva, se emplearon los perfiles de proteínas basados en actividad (ABPP). Esta técnica consiste en el diseño de sondas fluorescentes dirigidas al centro activo enzimático para analizar la actividad de familias específicas de proteínas, en este caso las catepsinas, dentro de proteomas complejos. Esto suministra la base para la lectura de la intensidad de densidad óptica mediante un escáner de fluorescencia. Esta intensidad será reflejo directo de la actividad de la proteasa, ya que la sonda solo se une a la enzima en su forma activa, no así a cimógenos ni a porciones de la cadena polipeptídica que conforman la proteasa.

Para la realización de este estudio, se adquirió el kit "IABP™ Pan Cathepsin Activity Based Probe" a la empresa VERGENT BIOSCIENCE, que consiste en sondas marcadas con fluoróforo (Cy5) diseñadas para la detección de las catepsinas B, L, S y X/Z. Estas sondas se suministran en un estado inactivo a nivel óptico, y solo mostrarán sus características fluorescentes cuando se unen de manera covalente a la enzima, como puede verse en la Figura 31.

FIGURA 31.

La sonda permanece unido a una molécula "extintora" (quencher en la figura) que anula sus características fluorescentes. En el momento en que la sonda se une a la enzima, se desprende la molécula extintora y la sonda revela su fluorescencia.

VERGENT BIOSCIENCE. (2017). Recuperado de: [www.vergentbio.com](http://www.vergentbio.com)



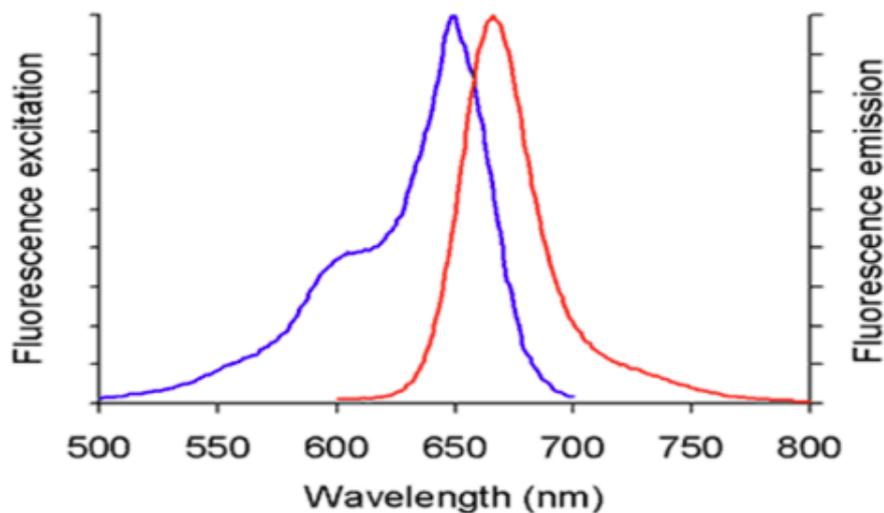
Para realizar los perfiles de proteínas basados en actividad (ABPP), se emplearon geles de poliacrilamida sometidos a electroforesis, técnica que en la literatura se conoce con el acrónimo de SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*).

Una vez realizados los geles de poliacrilamida, se sometió a un escaneado óptico para detectar y cuantificar la intensidad de densidad óptica de cada una de las bandas que aparecían. Las sondas empleadas se estimularon con una longitud de onda de 640 nm, y emitían una señal de 660, según datos aportados por la empresa fabricante, y que pueden verse en la Figura 32.

FIGURA 32.

La curva azul muestra el pico de máxima excitación de las sondas a 640 nm de longitud de onda. La curva roja hace lo propio con el pico máximo de emisión de fluorescencia.

VERGENT BIOSCIENCIE (2017). Recuperado de: [www.vergentbio.com](http://www.vergentbio.com)



El protocolo exacto de todo el proceso realizado fue el siguiente:

1. Se midió la concentración de proteína de las muestras salivares por el método de Bradford empleando el ensayo de BioRad adaptado a microplacas de 96 pocillos y con albúmina de suero Bovino como estándar (<https://www.bio-rad.com/es-es/feature/bradford-assay.html>).
2. Un total de 5 microgramos de proteína se incubaron con la sonda a una concentración de 1  $\mu\text{M}$  en un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. La reacción se detuvo por adición de 5  $\mu\text{L}$  de tampón de carga desnaturizante.
4. Seguidamente, las muestras fueron sometidas a 95°C durante 4 minutos.
5. A continuación, se sometieron a una electroforesis a voltaje constante (180mV).

6. Por último, el escaneado de la fluorescencia se realizó con el equipo Thyphoon Imager 922 empleando el filtro de excitación y emisión de 635 nm y LPR (665LP), respectivamente. Las lecturas se realizaron en la Plataforma de Proteómica del IMIB.

Se realizaron 14 geles de poliacrilamida, donde se analizaron las 108 muestras de saliva disponibles (76 del grupo de casos, y 32 del grupo control). Se compararon las distintas bandas obtenidas con las correspondientes a las catepsinas B, L, S y X/Z según datos aportados por el fabricante de las sondas, tal y como se aprecia en la Figura 34.

FIGURA 33.

*Representación de las bandas correspondientes a cada una de las catepsinas analizadas. Nótese la presencia de una banda a aproximadamente 32-34 kDa para la catepsina X/Z; doble banda aproximadamente a los 30 kDa, peso molecular de la catepsina B; una banda a 25 kDa para la catepsina S; y otra a 23 kDa para la catepsina L.*

VERGENT BIOSCIENCIE (2017). Recuperado de: [www.vergentbio.com](http://www.vergentbio.com)



Se identificaron las bandas referidas a las catepsinas B, S y L; y se recopilaron los datos de intensidad de densidad óptica, con los que se conformaron las variables “Catepsina B”, “Catepsina S” y “Catepsina L”. No se identificaron bandas que correspondieran a la catepsina X/Z, por lo que no se estableció dicha variable.

### 3.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Todas las variables obtenidas se analizaron con el programa informático SPSS v.15.0.

Se calculó la distribución de las variables cuantitativas: edad, paquetes-año, estancia hospitalaria, meses desde inicio síntomas, catepsina B, catepsina S y catepsina L; mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors.

Las siguientes variables clínicas se agruparon para facilitar el análisis de los datos:

- La variable **T clínica**, con 5 valores posibles, se transformó en **T clínica agrupada**, que puede adquirir los valores:

- Inicial: aquellos casos con valores de cT1 o cT2.
- Avanzado: aquellos casos con valores de cT3, cT4a o cT4b.
- La variable **N clínica**, con 7 valores posibles, se transformó en **N clínica agrupada**, que puede adquirir los valores:
  - Negativa: aquellos casos cN0.
  - Positiva: aquellos casos con cN1, cN2a, cN2b, cN2c, cN3a o cN3b.
- La variable **Estadio clínico**, con 5 valores posibles, se transformó en **Estadio clínico agrupado**, que puede adquirir los valores:
  - Inicial: aquellos casos con valores de I o II.
  - Avanzado: aquellos casos con valores de III, IVA, IVB o IVC.
- La variable **T anatomopatológico**, con 5 valores posibles, se transformó en **T anatomopatológico agrupado**, que puede adquirir los valores:
  - Inicial: aquellos casos con valores de pT1 o pT2.
  - Avanzado: aquellos casos con valores de pT3, pT4a o pT4b.
- La variable **N anatomopatológico**, con 7 valores posibles, se transformó en **N anatomopatológico agrupado**, que puede adquirir los valores:
  - Negativo: aquellos casos pN0.
  - Positivo: aquellos casos con pN1, pN2a, pN2b, pN2c, pN3a o pN3b.
- La variable **Estadio anatomopatológico**, con 5 valores posibles, se transformó en **Estadio anatomopatológico agrupado**, que puede adquirir los valores:
  - Inicial: aquellos casos con valores de I o II.
  - Avanzado: aquellos casos con valores de III, IVA, IVB o IVC.
- La variable **Complicaciones**, con 6 valores posibles, se transformó en **Complicaciones agrupada**, con 2 posibles valores:
  - Sí: aquellos pacientes que habían sufrido alguna complicación.
  - No: aquellos pacientes que no habían sufrido complicaciones quirúrgicas.
- Se creó una nueva variable denominada **Fístula Salival**, con dos valores posibles:
  - Sí: pacientes intervenidos de laringectomía total que padecieron fístula salival faringocutánea en su postoperatorio.
  - No: pacientes intervenidos de laringectomía total sin fístula salival faringocutánea en su postoperatorio.

Se calculó la actividad de las catepsinas utilizando la intensidad de densidad óptica obtenida en cada banda del SDS-PAGE, tanto de manera global, como en los grupos de casos y controles.

Posteriormente se tomaron los niveles de catepsina S para los siguientes análisis de comparación:

- **Grupo de casos vs Grupo control.**

- **Tumores primarios iniciales vs Tumores primarios avanzados**, utilizando las variables T clínica agrupada y T anatomopatológica agrupada.
- **Presencia de metástasis ganglionar cervical vs Ausencia de metástasis ganglionar cervical**, utilizando las variables N clínica agrupada y N anatomopatológica agrupada.
- **Estadio tumoral inicial vs Estadio tumoral avanzado**, usando las variables Estadio Clínico agrupado y Estadio Anatomopatológico agrupado.
- **Presencia de complicaciones postquirúrgicas vs Ausencia de complicaciones postquirúrgicas**, en pacientes laringectomizados totales, usando la variable Complicaciones agrupada.
- **Presencia de Fístula salival vs Ausencia de fístula salival**, en pacientes laringectomizados totales, usando la variable Fístula salival.

En cada uno de esto análisis, se procedió del mismo modo:

1. Se creó una curva ROC empleando los niveles de catepsina salivar.
2. Se estableció el Índice de Youden; parámetro que informa del rendimiento de una prueba diagnóstica, y cuyos valores varían entre -1 y +1.
3. Se realizó un análisis bivariante entre los dos grupos, con las variables relevantes en cada caso. La catepsina salivar se expresó en forma de variable cualitativa Sí/No en función del valor máximo del índice de Youden.
4. Se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron estadísticamente significativas en el análisis bivariante.

# RESULTADOS



## 1. DESCRIPCIÓN GRUPO DE CASOS

El grupo de casos está conformado por **76 pacientes**. De ellos, 72 son varones y 4 mujeres, lo que supone un 94,7% pertenecientes al sexo masculino, y un 5,3% al sexo femenino.

La **edad media** con intervalo de confianza al 95% del grupo de casos fue de 62,4 años (60,1-64,7).

El tiempo de evolución entre la aparición de los síntomas y el diagnóstico del tumor tuvo una mediana de 5 meses, con un rango intercuartílico de 3 a 7 meses.

El **hábito tabáquico** estaba presente en 74 de los 76 pacientes, lo que supone una prevalencia del 97,4%. El número de paquetes-año de los pacientes fumadores tuvo una mediana de 30, con un rango intercuartílico de 40 a 50.

Por su parte, el **consumo de alcohol** estaba presente en 72 de los 76 pacientes, es decir, el el 94,7%.

Por último, el 18,4% de los pacientes (14 de 76) presentaba antecedentes personales de cáncer, que se hallaban en remisión completa.

En cuanto a los síntomas, la Tabla 2 muestra la frecuencia de cada uno de los 8 síntomas por los que se interrogó al paciente.

*Tabla 2.*

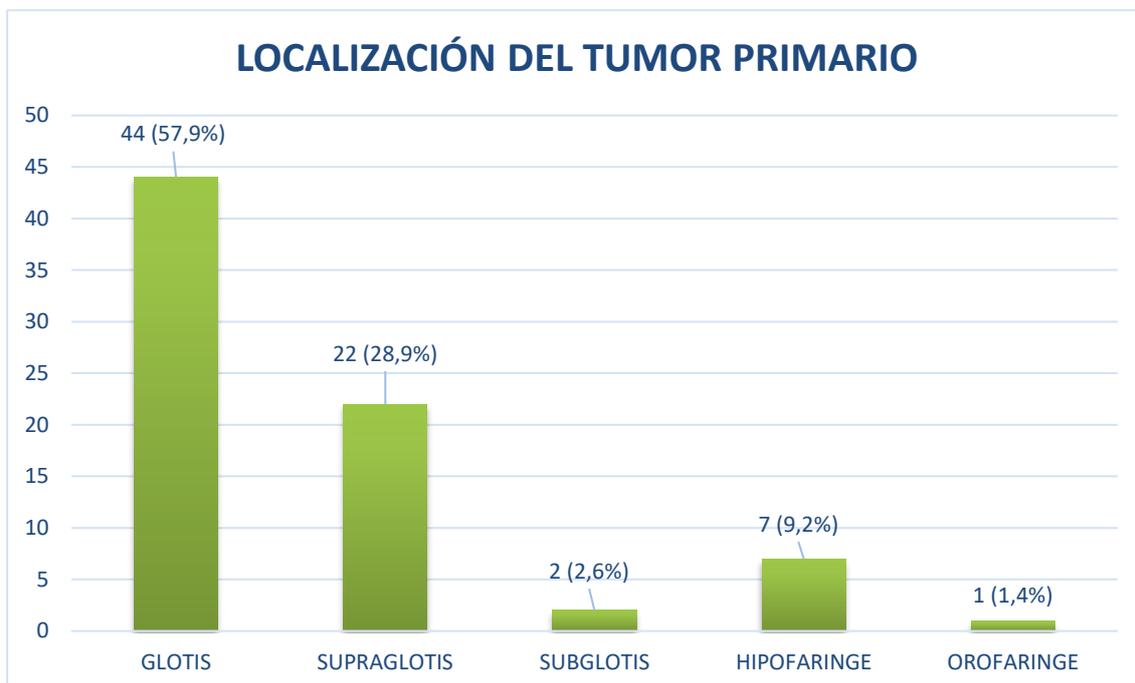
### *Síntomas en el grupo de casos*

Síntoma	N (%)
<b>ODINOFAGIA</b>	5 (6,6%)
<b>DISFAGIA</b>	21 (27,6%)
<b>DISFONÍA</b>	64 (84,2%)
<b>DISNEA</b>	8 (10,5%)
<b>OTALGIA</b>	8 (10,5%)
<b>HEMOPTISIS</b>	7 (9,2%)
<b>PARESTESIAS FARÍNGEAS</b>	7 (9,2%)
<b>TUMORACIÓN CERVICAL</b>	9 (11,8%)

*Nota.* N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Gráfico 1.

Localización anatómica del tumor primario



En cuanto a las **metástasis ganglionares cervicales**, se detectaron adenopatías patológicas en la exploración clínica inicial en 16 de los 76 pacientes, lo que supone una palpación cervical positiva en el 21,1% de los casos. Los estudios de imagen por tomografía computarizada, por su parte, mostraron adenopatías patológicas en 20 de los 76 casos, elevando el porcentaje de metástasis ganglionar cervical hasta el 26,3%.

Tabla 3.

T clínico según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición.

<b>cT Agrupado</b>	<b>cT</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>cT Inicial</u></b>	<u>T1</u>	20 (26,3%)	35 (46,1%)
	<u>T2</u>	15 (19,7%)	
<b><u>cT Avanzado</u></b>	<u>T3</u>	27 (35,5%)	41 (53,9%)
	<u>T4a</u>	14 (18,5%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Tabla 3.

N clínico según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición

<b>cN Agrupado</b>	<b>cN</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>cN Negativo</u></b>	<b><u>N0</u></b>	56 (73,7%)	56 (73,7%)
	<b><u>N1</u></b>	5 (6,6%)	20 (26,3%)
<b><u>cN Positivo</u></b>	<b><u>N2a</u></b>	4 (5,3%)	
	<b><u>N2b</u></b>	8 (10,5%)	
	<b><u>N2c</u></b>	3 (3,9%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Tabla 4.

M clínico según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición

<b>cM</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>M0</u></b>	74 (97,4%)
<b><u>M1</u></b>	2 (2,6%)

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Tabla 5.

Estadio clínico según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición

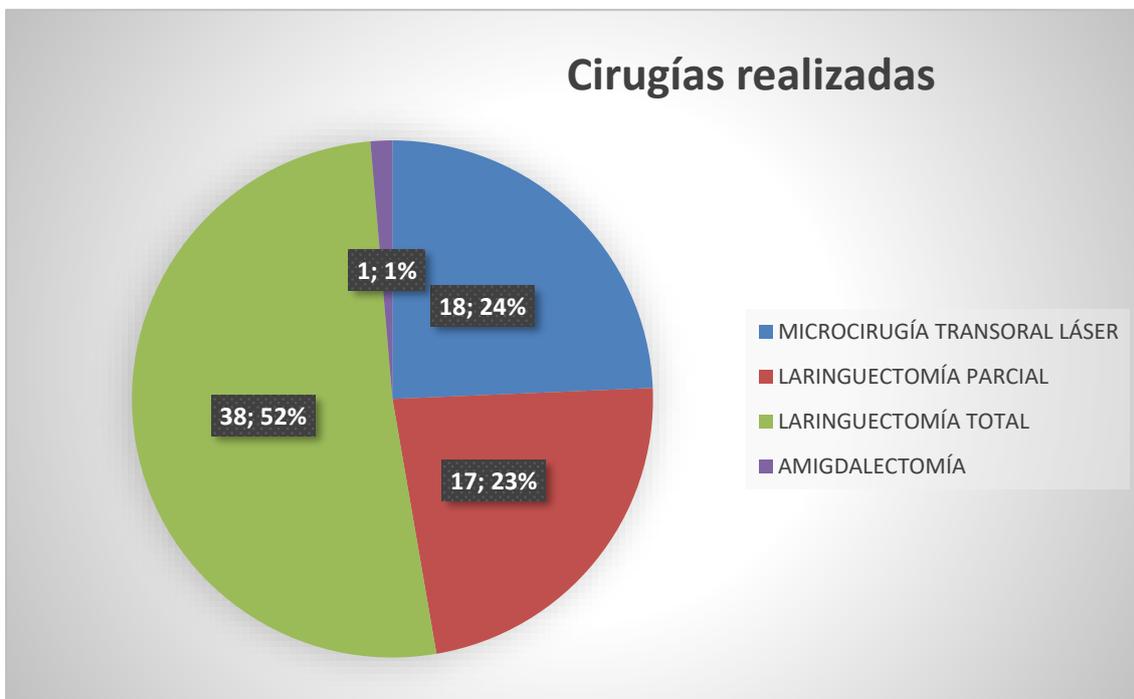
<b>Estadio Clínico Agrupado</b>	<b>Estadio Clínico</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>ESTADIO CLÍNICO INICIAL</u></b>	<b><u>I</u></b>	16 (20,3%)	29 (31,9%)
	<b><u>II</u></b>	13 (16,5%)	
<b><u>ESTADIO CLÍNICO AVANZADO</u></b>	<b><u>III</u></b>	25 (31,6%)	47 (68,1%)
	<b><u>IVA</u></b>	21 (30,4%)	
	<b><u>IVB</u></b>	0 (0%)	
	<b><u>IVC</u></b>	1 (1,3%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

El tratamiento inicial de los pacientes consistió en la cirugía en 74 de ellos (un 97,4%), mientras un paciente fue sometido a quimiorradioterapia inicial, y un paciente a tratamiento paliativo.

Gráfico 2.

Tipo de cirugías realizadas



En cuanto al **vaciamiento cervical electivo**, se realizó en 51 de los pacientes, es decir, en un 68,9%

Tabla 6.

Complicaciones postquirúrgicas de los pacientes intervenidos

		N (%)	N (%)
<b>SIN COMPLICACIONES</b>		48 (64,9%)	48 (64,9%)
<b>CON COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS</b>	<i>Fístula Salival</i>	16 (21,6%)	26 (35,1%)
	<i>Hemorragia</i>	3 (4,1%)	
	<i>Infección</i>	2 (2,7%)	
	<i>Disfagia</i>	4 (5,4%)	
	<i>Éxitus</i>	1 (1,3%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

La **estancia hospitalaria** de los pacientes intervenidos tuvo una mediana de 14 días, con un rango intercuartílico de 7 a 28 días. Sin embargo, al ser un parámetro altamente dependiente del tipo de cirugía realizada, los datos se han desglosado de manera más específica en la siguiente tabla:

Gráfico 3.

*Estancia hospitalaria en días en función del tipo de cirugía*

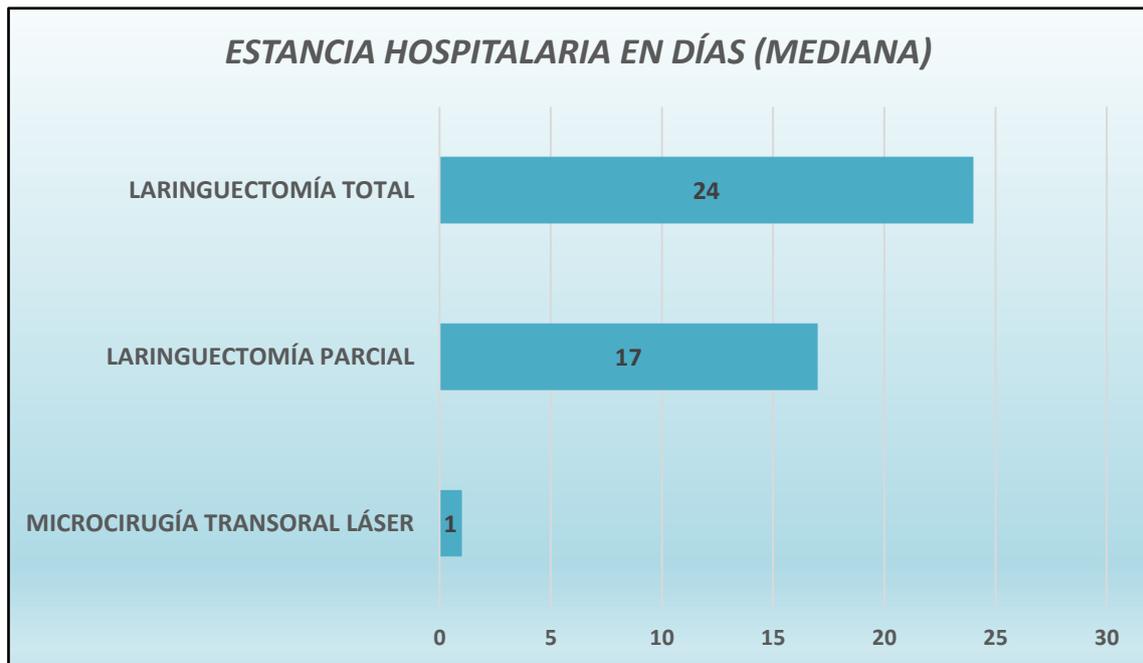
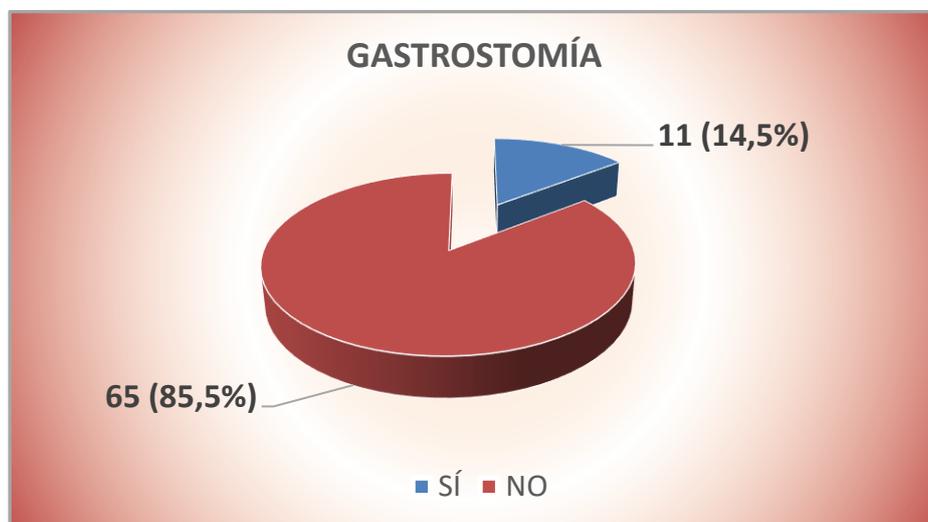


Gráfico 4.

*Pacientes que precisaron una gastrostomía para su nutrición*



Fue necesaria la realización de una **traqueotomía previa** al tratamiento del tumor, en 3 de los 76 pacientes, lo que supone un 3,9%.

Tabla 7.

*Tratamientos posteriores a la cirugía*

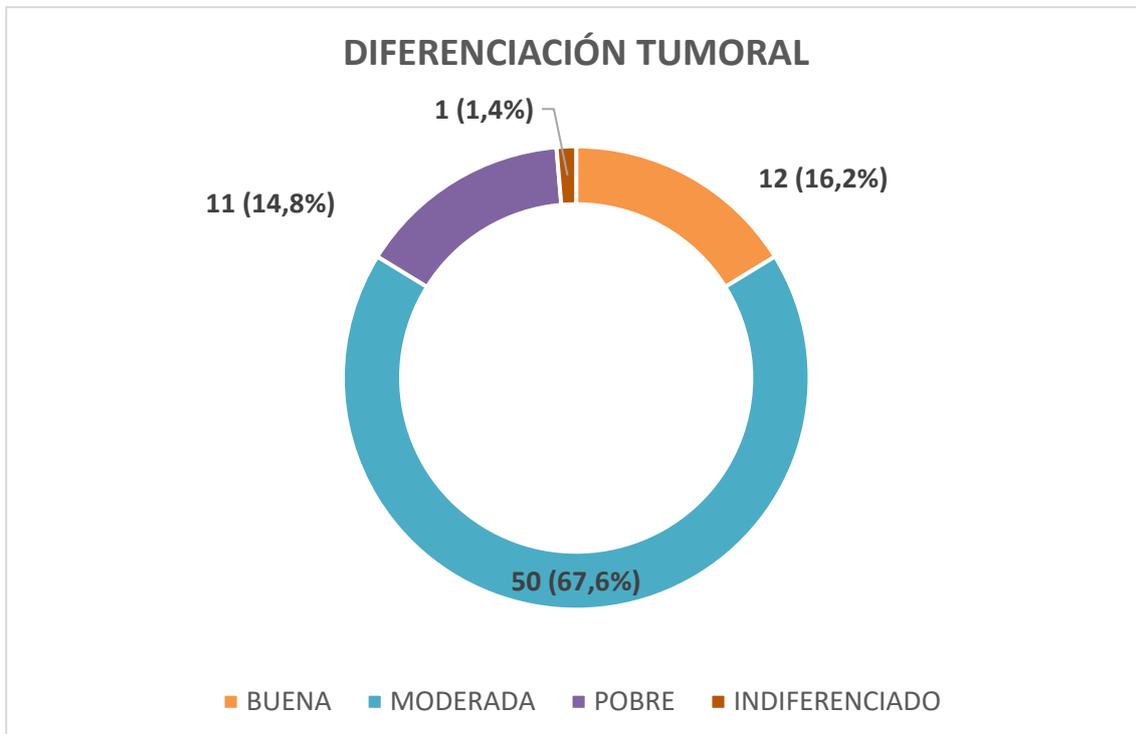
<b>Tratamiento posterior</b>	<b>N (%)</b>
<b>NINGUNO</b>	46 (62,2%)
<b>RADIOTERAPIA</b>	14 (18,9%)
<b>RADIOQUIMIOTERAPIA</b>	14 (18,9%)

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Se pudo establecer el grado de diferenciación tumoral en 74 de los 76 procesos tumorales, con los resultados que se muestran en el Gráfico 5.

Gráfico 5.

*Grado de diferenciación tumoral*



Los márgenes quirúrgicos se catalogaron como afectados en 14 de los 74 casos estudiados, un porcentaje del 18,9 %.

En cuanto al análisis anatomopatológico de los vaciamentos cervicales realizados, el 47,1% mostró ganglios afectados por metástasis de carcinoma epidermoide (24 de 51). Entre los 24 pacientes con ganglios positivos, la rotura capsular estaba presente en 10 de ellos (un 41,7%).

Tabla 8.

*pT según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición*

<b>pT Agrupado</b>	<b>pT</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>pT INICIAL</u></b>	<b><u>pT1</u></b>	21 (28,4%)	33 (44,6%)
	<b><u>pT2</u></b>	12 (16,2%)	
<b><u>pT AVANZADO</u></b>	<b><u>pT3</u></b>	22 (29,7%)	41 (55,4%)
	<b><u>pT4a</u></b>	19 (25,7%)	
	<b><u>pT4b</u></b>	0 (0%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Tabla 9.

*pN según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición*

<b>pN Agrupado</b>	<b>pN</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b><u>PN NEGATIVO</u></b>	<b><u>pN0</u></b>	50 (67,6)	50 (67,6%)
<b><u>PN POSITIVO</u></b>	<b><u>pN1</u></b>	6 (8,1%)	24 (32,4%)
	<b><u>pN2a</u></b>	2 (2,6%)	
	<b><u>pN2b</u></b>	3 (4,1%)	
	<b><u>pN2c</u></b>	3 (4,1%)	
	<b><u>pN3a</u></b>	0 (0%)	
	<b><u>pN3b</u></b>	10 (13,5%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

Tabla 10.

Estadio anatomopatológico según sistema de estadificación tumoral de la AJCC en su 8ª edición

<b>Estadio Anatómo- Patológico Agrupado</b>	<b>Estadio Anatómo- Patológico</b>	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>
<b>ESTADIO ANATOMO- PATOLÓGICO INICIAL</b>	<u><i>pI</i></u>	18 (24,3%)	27
	<u><i>pII</i></u>	9 (12,2%)	(36,5%)
<b>ESTADIO ANATOMO- PATOLÓGICO AVANZADO</b>	<u><i>pIII</i></u>	18 (24,3%)	47 (63,5%)
	<u><i>pIVA</i></u>	18 (24,3%)	
	<u><i>pIVB</i></u>	11 (14,9%)	
	<u><i>pIVC</i></u>	0 (0%)	

Nota. N=frecuencia absoluta. %=frecuencia relativa.

## 2. DESCRIPCIÓN GRUPO CONTROL

El grupo control está formado por 32 pacientes. La distribución por sexo es de 17 en el sexo masculino (53,1%), y 15 en el sexo femenino (46,9%).

La edad media con intervalo de confianza al 95% es de 47,7 (43,5-51,8) años.

El hábito tabáquico está presente en 11 de los 32 pacientes, lo que supone una prevalencia del 34,4%.

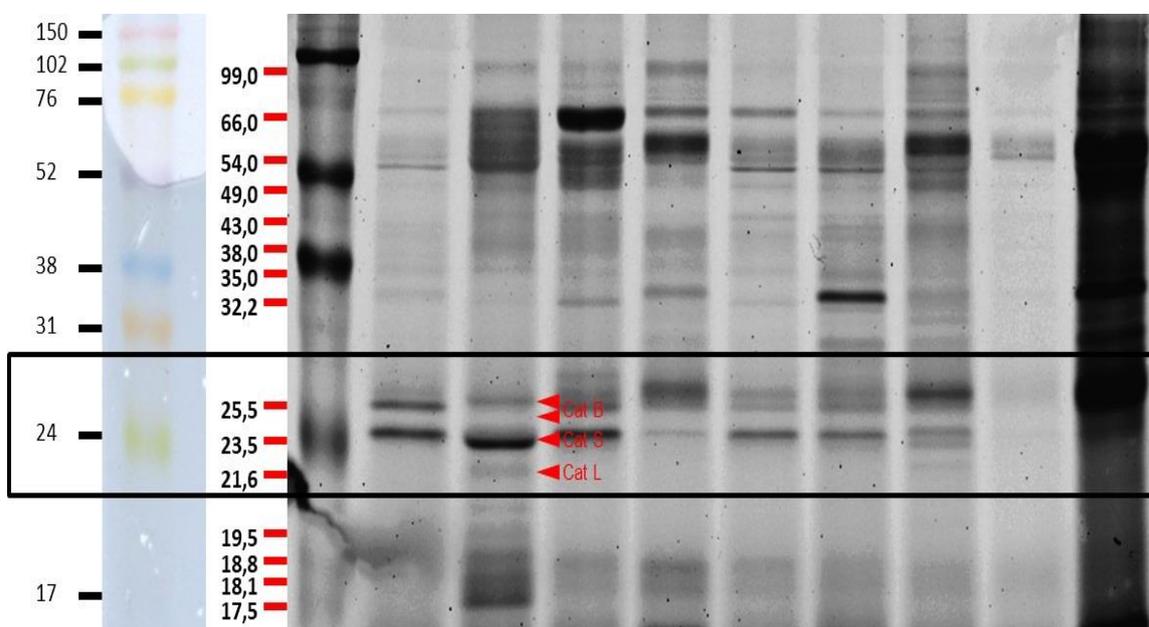
Existía el antecedente de cáncer de tiroides en uno de los 32 pacientes del grupo control. Ningún otro paciente tenía antecedentes de procesos neoplásicos.

### 3. PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS

Con las muestras de saliva obtenidas, tanto del grupo casos como del grupo control, se realizó el perfil de proteínas basado en actividad de las catepsinas, confeccionando los geles de poliacrilamida, un ejemplo de los cuales se muestra en la Figura 34. En la primera calle de cada uno de los geles, se ha instilado un preparado con marcadores para los distintos pesos moleculares. Este es empleado como referencia para localizar las bandas de las distintas catepsinas en función de su peso molecular, en el resto de las calles, que corresponden a las muestras de saliva.

FIGURA 34.

*Ejemplo de uno de los geles de poliacrilamida con muestras del grupo de casos.*



Se pueden apreciar en la mayoría de las calles dos bandas muy juntas entre sí, a la altura de los 25 kDa. También se aprecia con claridad una banda única a la altura de los 23 kDa. Más tenue e inconstante resulta en este gel una banda que corresponde a la catepsina L, alrededor de los 21 kDa. Estas bandas reproducen la secuencia aportada por el fabricante (Figura 33), aunque los pesos moleculares resultantes son algo menores a los adjudicados en la literatura, que serían 30 kDa para la catepsina B, 25 kDa para la catepsina S y 23 kDa para la catepsina L.

Por último, ninguna banda puede apreciarse a la altura de 32-34 kDa, peso molecular de la catepsina X/Z, por lo que no se pudieron obtener datos de actividad de dicha proteasa.

FIGURA 335.

Ejemplo de otro gel de poliacrilamida con muestras de casos y de controles

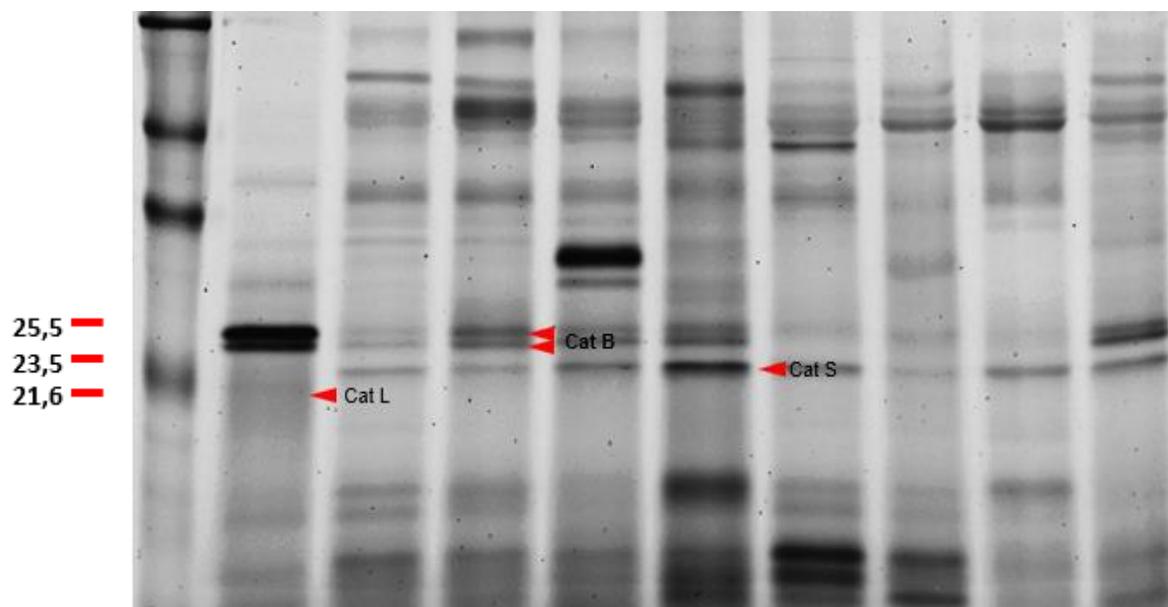
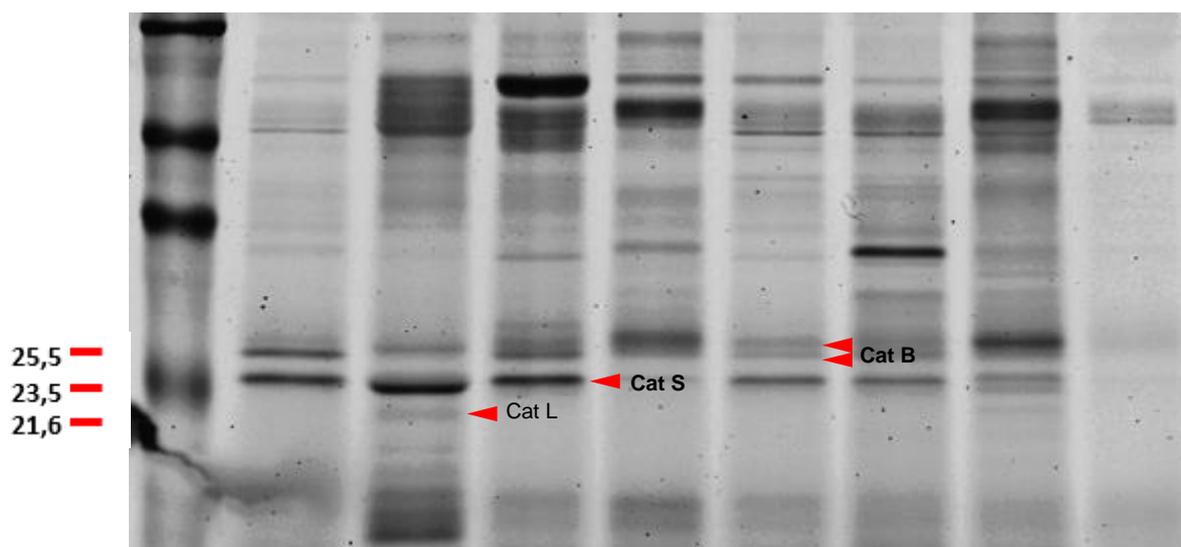


FIGURA 346.

Ejemplo de un nuevo gel de poliacrilamida con muestras de casos y de controles



### 3.1 PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD GLOBAL

A continuación, se cuantificó la actividad de cada una de las catepsinas, y de su total, en función de la fluorescencia de cada una de sus correspondientes bandas, y se expresó como intensidad de densidad óptica. La prueba de Kolmogorov-Smirnov sobre estos descartaba una distribución normal; por tanto, se expresaron en forma de mediana y rango intercuartílico, como puede verse en la Tabla 11.

Tabla 11.

*Intensidad de densidad óptica total para cada una de las 3 catepsinas obtenidas.*

	<b>PESO MOLECULAR EN SPS-PAGE (kDa)</b>	<b>INTENSIDAD DE DENSIDAD ÓPTICA (MEDIANA – RIC)</b>
<i>CATEPSINA B</i>	25	191,3 (77,6 – 336,5)
<i>CATEPSINA S</i>	23	432,8 (232,9 – 899,6)
<i>CATEPSINA L</i>	21	68,8 (21,7 – 200,9)
<i>CATEPSINA B + S + L</i>	-	910,17 (611 – 1434,1)

Nota. RIC = Rango Intercuartílico.

Para una mejor comprensión de los datos obtenidos, se realizaron gráficos de dispersión que muestran la actividad de cada una de las 3 catepsinas por separado en la muestra total estudiada, tanto de casos como de control.

Gráfico 6.

*Gráfico de dispersión que muestra la distribución de la actividad de la catepsina B*

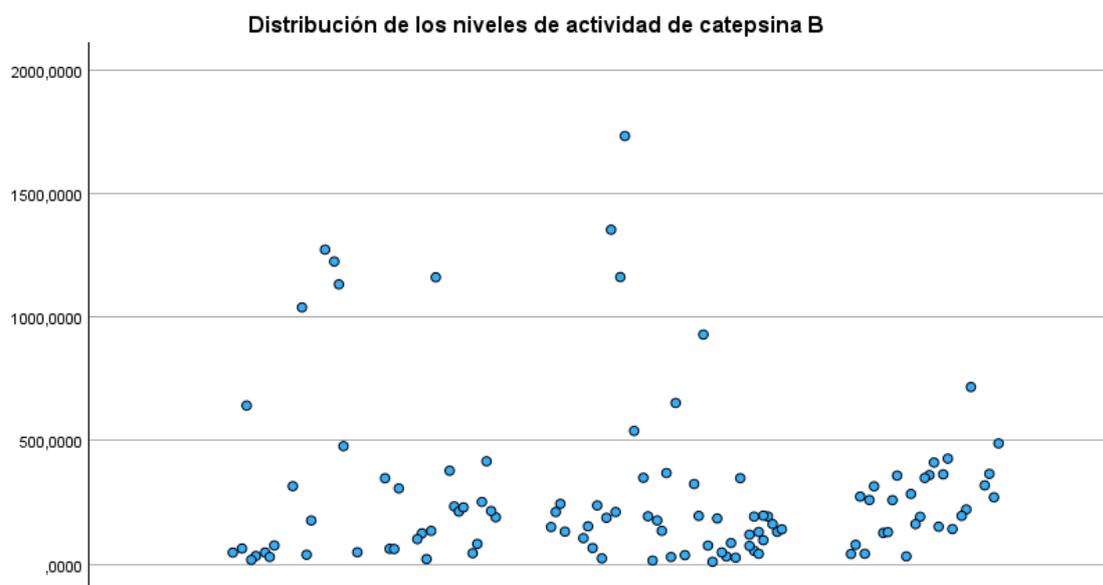


Gráfico 7.

Gráfico de dispersión que muestra la distribución de la actividad de catepsina S salivar

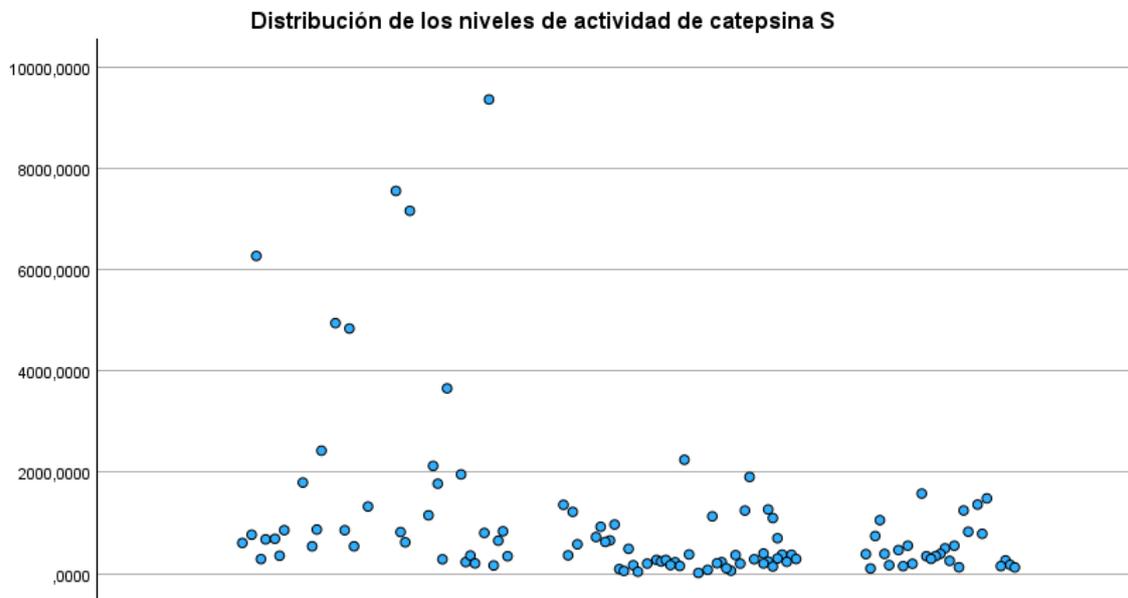
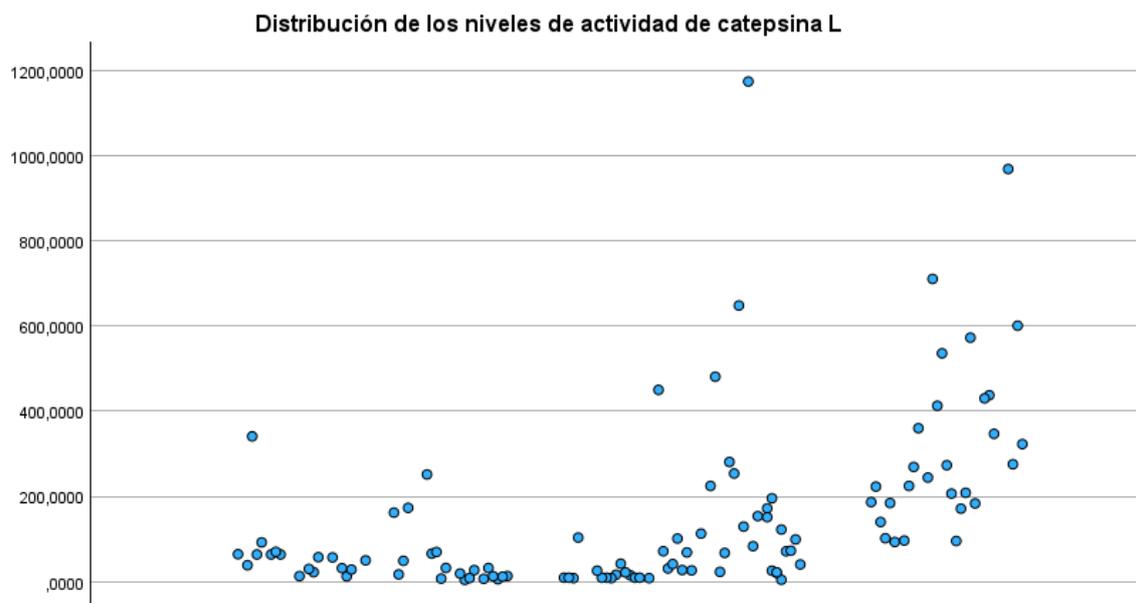


Gráfico 8.

Gráfico de dispersión en función de los niveles de catepsina L salivar



### 3.2 PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD EN GRUPO DE CASOS Y GRUPO CONTROL

Se realizó una comparación entre las medianas de ambos grupos para cada una de las catepsinas estudiadas, empleando test no paramétricos (U de Mann-Whitney), cuyos datos se muestran en la Tabla 12.

*Tabla 12.*

*Intensidad de densidad óptica en el grupo de casos y en el grupo de controles para cada una de las 3 catepsinas obtenidas, y la suma total. Análisis bivariante mediante U de Mann-Whitney*

	<b>CASOS (IOD COMO MEDIANA – RIC)</b>	<b>CONTROLES (IOD COMO MEDIANA – RIC)</b>	<b>VALOR P</b>
<i>CATEPSINA B</i>	190,2 (63,9 – 348,4)	192,4 (127 – 284,5)	0,99
<i>CATEPSINA S</i>	652,3 (272,5 – 1246,8)	301,4 (197,3 – 398,6)	<0,01
<i>CATEPSINA L</i>	41,9 (14,8 – 103,2)	184,2 (96,2 – 275,3)	<0,01
<i>CATEPSINA B + S + L</i>	1059,2 (583,7 – 1808,7)	803 (616,3 – 1047,2)	0,05

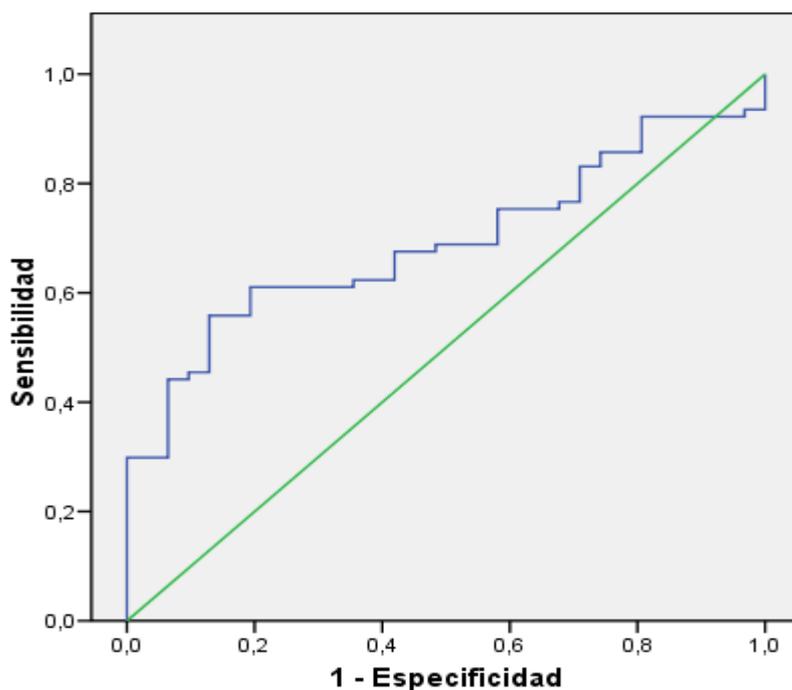
*Nota.* IOD = intensidad de densidad óptica. RIC = rango intercuartílico.

## 4. ANÁLISIS COMPARANDO CASOS Y CONTROLES PARA DETERMINAR DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S ENTRE AMBOS GRUPOS

Se confeccionó una curva ROC para diagnóstico de carcinoma faringolaríngeo empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 9.

Gráfico 9.

Curva ROC para diagnóstico de cáncer Sí/No con los niveles de catepsina S salivar



Nota. Área bajo la curva 0,70.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 13).

Tabla 13.

Índice de Youden para diagnóstico de cáncer Sí/No

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
395,9600	0,6316	0,7187	0,3503
432,8400	0,6316	0,7500	0,3816
<b>479,7450</b>	<b>0,6316</b>	<b>0,7812</b>	<b>0,4128</b>
497,3350	0,6184	0,7812	0,3997
521,8350	0,6053	0,7812	0,3865

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 479,7”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los grupos de casos y de controles, así como en las principales variables epidemiológicas recogidas en ambos grupos (sexo, edad y hábito tabáquico), tal y como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14.

*Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable*

<b>VARIABLE</b>	<b>GRUPO CASOS (N=76)</b>	<b>GRUPO CONTROL (N=32)</b>	<b>VALOR P</b>
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	62,5 (60,1-64,9)	47,7 (43,5-51,8)	<0,01
<b>SEXO – N (%)</b>			<0,01
HOMBRE	72 (94,7%)	17 (53,1%)	
MUJER	4 (5,3%)	15 (46,9%)	
<b>HÁBITO TABÁQUICO – N (%)</b>	74 (97,4%)	11 (34,4%)	<0,01
<b>CATEPSINA S &gt; 479,7</b>			<0,01
SÍ	48 (63,2%)	7 (21,8%)	
NO	28 (36,8%)	25 (78,2%)	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivalente, tal y como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15.

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con Cáncer Sí/NO como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CATEPSINA S SALIVAR &gt; 479,7</b>	0,03	7,3 (1,2-44,6)
<b>EDAD</b>	0,01	0,9 (0,82-0,97)
<b>SEXO</b>	<0,01	16,9 (2,8-101,7)
<b>TABACO</b>	0,02	169,0 (11,1-2569,4)

*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,79.

## 5. ANÁLISIS RELACIONANDO LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR

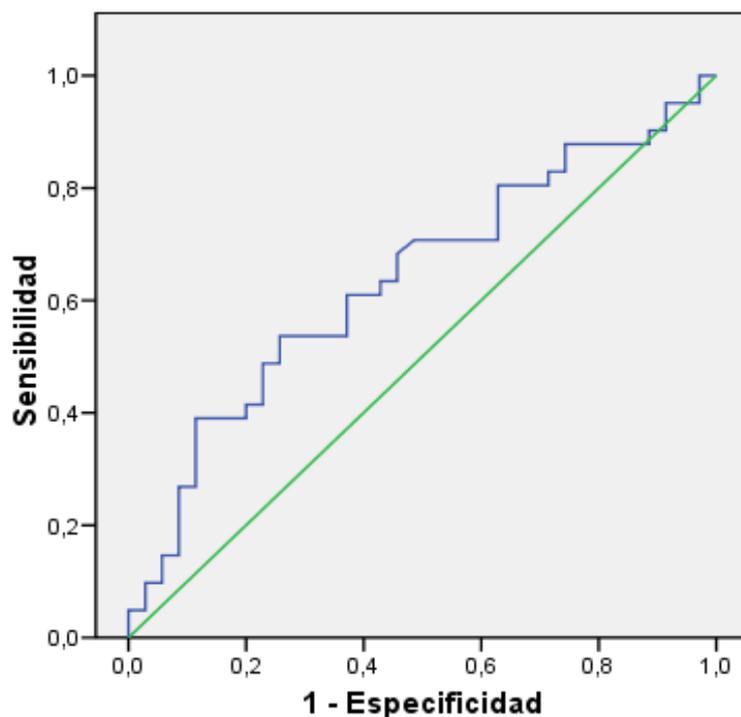
La prueba de Kolmogorov-Smirnov, con la corrección de Lilliefors, para las variables cuantitativas Paquetes-Año, Meses desde inicio síntomas y Estancia hospitalaria; mostró una significancia estadística con  $p < 0,01$ , por lo que consideró que no seguían una distribución normal.

### 5.1 ANÁLISIS COMPARANDO LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO MEDIANTE LA VARIABLE T CLÍNICA AGRUPADA

Se confeccionó una curva ROC para cT inicial vs avanzado, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 10.

*Gráfico 10.*

*Curva ROC para cT Inicial/Avanzado con los niveles de catepsina S salivar*



*Nota.* Área bajo la curva = 0,64.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 16).

Tabla 16.

Índice de Youden para cT Inicial/Avanzado

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
796,7600	0,5366	0,6857	0,2223
813,7900	0,5366	0,7143	0,2509
<b>826,0500</b>	<b>0,5366</b>	<b>0,7429</b>	<b>0,2794</b>
833,7900	0,5122	0,7429	0,2551
848,3400	0,4878	0,7429	0,2307

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 826,05”. Se realizó un análisis bivariante para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con un cT inicial y aquellos con un cT avanzado. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17.

Análisis bivariante mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable

<i>VARIABLE</i>	<i>cT INICIAL (N=35)</i>	<i>cT AVANZADO (N=41)</i>	<i>VALOR P</i>
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,7 (58,2-65,3)	63,1 (59,8-66,4)	0,54
<b>SEXO – N</b>			0,62
<i>HOMBRE</i>	34 (97,1%)	38 (92,7%)	
<i>MUJER</i>	1 (2,9%)	3 (7,3%)	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	35 (30-60)	40 (30,3-50)	0,62
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<i>ODINOFAGIA</i>	0	5 (12,2%)	0,06
<i>DISFAGIA</i>	5 (14,3%)	16 (39%)	0,06
<i>DISFONÍA</i>	26 (74,3%)	38 (92,7%)	0,06
<i>DISNEA</i>	0	8 (19,5%)	<0,01
<i>OTALGIA</i>	0	8 (19,5%)	<0,01
<i>HEMOPTISIS</i>	3 (8,6%)	4 (9,8%)	1

<i>PARESTESIAS FARÍNGEAS</i>	3 (8,6%)	4 (9,8%)	1
<i>TUMORACIÓN CERVICAL</i>	4 (11,4%)	2 (4,9%)	0,41
<b>MESES DESDE INICIO SÍNTOMAS – MEDIANA (RIC)</b>	4 (2-6,3)	6 (4-7,8)	<0,05
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL - N</b>			
<i>GLOTIS</i>	20 (57,1%)	24 (58,5%)	0,90
<i>SUPRAGLOTIS</i>	10 (28,6%)	12 (29,3%)	0,95
<i>SUBGLOTIS</i>	0	2 (4,9%)	0,50
<i>HIPOFARINGE</i>	4 (11,4%)	3 (7,3%)	0,70
<i>OROFARINGE</i>	1 (2,9%)	0	-
<b>CATEPSINA S &gt; 826,1</b>			0,01
<i>SÍ</i>	9 (25,7%)	22 (53,7%)	
<i>NO</i>	26 (74,3%)	19 (46,3%)	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 18.

*Tabla 18.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con cT Inicial/Avanzado como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CATEPSINA S SALIVAR</b>	0,02	3,6 (1,2-10,8)
<b>DISNEA</b>	0,99	-
<b>OTALGIA</b>	0,99	-
<b>MESES DESDE INICIO SÍNTOMAS</b>	0,37	1,1 (0,92-1,25)

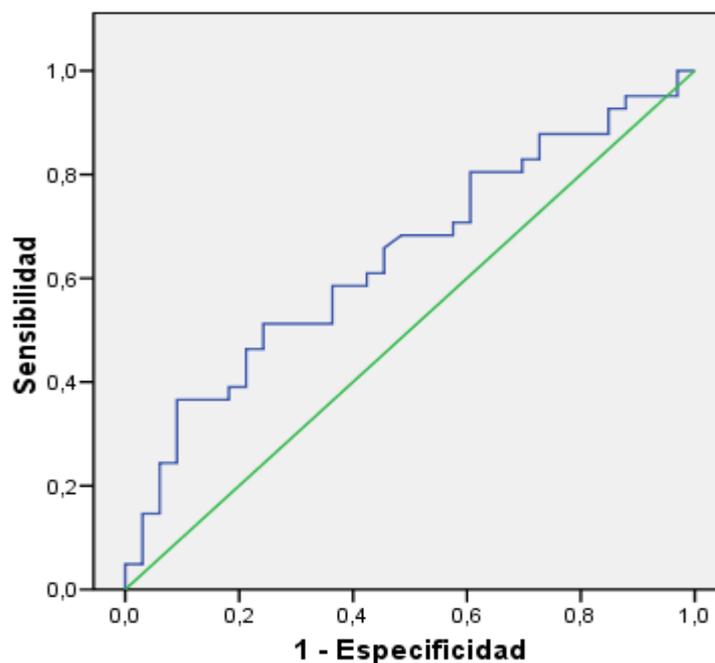
*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,43.

## 5.2. ANÁLISIS COMPARANDO LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO MEDIANTE LA VARIABLE T ANATOMOPATOLÓGICA AGRUPADA

Se confeccionó una curva ROC para pT inicial vs avanzado, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 11.

Gráfico 11.

Curva ROC para T Anatomopatológica Inicial / Avanzada con los niveles de catepsina S salivar



Nota. Área bajo la curva = 0,64

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 19).

Tabla 19.

Índice de Youden para pT Inicial/Avanzado

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
796,7600	0,5122	0,6970	0,2092
813,7900	0,5122	0,7273	0,2395
<b>826,0500</b>	<b>0,5122</b>	<b>0,7576</b>	<b>0,2698</b>
833,7900	0,4878	0,7576	0,2454
848,3400	0,4634	0,7576	0,2210

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 826,05”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con un pT inicial y aquellos con un pT avanzado. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20.

Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable

<b>VARIABLE</b>	<b>pT INICIAL (N=36)</b>	<b>pT AVANZADO (N=41)</b>	<b>VALOR P</b>
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,8 (57,7-65,9)	62,9 (59,9-65,9)	0,80
<b>SEXO – N</b>			0,62
<i>HOMBRE</i>	32	38	
<i>MUJER</i>	1	3	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	30 (28-60)	40 (31-50)	0,32
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<i>ODINOFAGIA</i>	0	5	0,06
<i>DISFAGIA</i>	3	17	<0,01
<i>DISFONÍA</i>	24	39	<0,01
<i>DISNEA</i>	0	8	<0,01
<i>OTALGIA</i>	0	8	<0,01
<i>HEMOPTISIS</i>	3	3	1
<i>PARESTESIAS FARÍNGEAS</i>	2	5	0,45
<i>TUMORACIÓN CERVICAL</i>	4	2	0,40
<b>MESES DESDE INICIO SÍNTOMAS – N</b>	4 (2-6)	5 (3-7)	0,16
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
<i>GLOTIS</i>	20	23	0,70
<i>SUPRAGLOTIS</i>	8	13	0,48
<i>SUBGLOTIS</i>	1	1	1
<i>HIPOFARINGE</i>	3	4	1
<i>OROFARINGE</i>	1	0	-
<b>CATEPSINA S &gt; 826,1</b>			0,02

POSITIVA	8	21
NEGATIVA	25	20

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 21.

*Tabla 21.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con pT Inicial/Avanzado como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CATEPSINA S SALIVAR</b>	0,02	5,7 (1,3-25,9)
<b>DISFAGIA</b>	0,99	-
<b>DISFONÍA</b>	0,99	-
<b>DISNEA</b>	0,99	-
<b>OTALGIA</b>	0,99	-

*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,72.

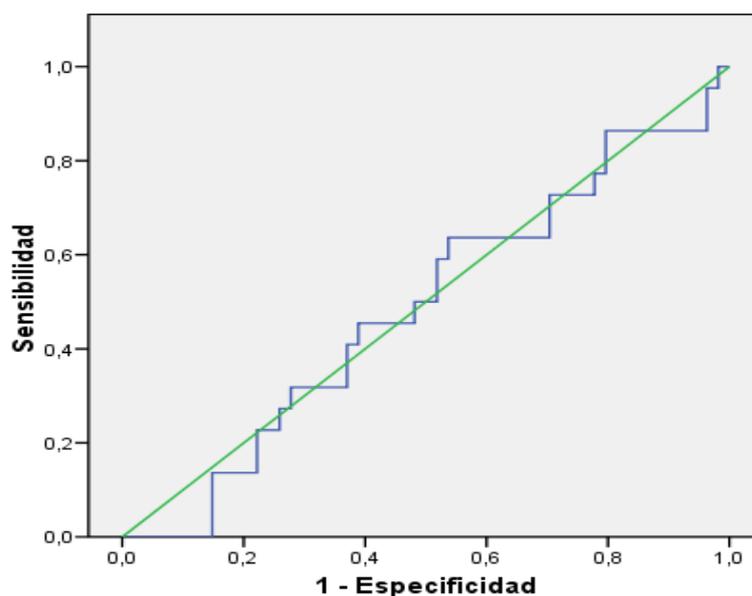
## 6. ANÁLISIS RELACIONANDO LA PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR

### 6.1. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES MEDIANTE LA VARIABLE N CLÍNICA AGRUPADA

Se confeccionó una curva ROC para cN negativo vs positivo, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 12.

*Gráfico 12.*

*Curva ROC para cN Negativo/Positivo con los niveles de catepsina S salivar*



*Nota.* Área bajo de la curva = 0,49.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 22).

*Tabla 22.*

*Índice de Youden para cN Negativo/Positivo*

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
521,8350	0,6364	0,4074	0,0438
561,6550	0,6364	0,4444	0,0808
<b>594,6600</b>	<b>0,6364</b>	<b>0,4630</b>	<b>0,0993</b>
614,1400	0,5909	0,4630	0,0539
624,5600	0,5909	0,4815	0,0724

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 594,66”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con una cN negativa y aquellos con una cN positiva. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23.

Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable

VARIABLE	cN NEGATIVO (N=54)	cN POSITIVO (N=22)	VALOR P
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,6 (58,7-64,6)	64,1 (59,8-68,5)	0,46
<b>SEXO – N</b>			0,32
HOMBRE	50	22	
MUJER	4	0	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	35 (30-50)	45 (35-60)	0,05
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
ODINOFAGIA	3	2	0,62
DISFAGIA	13	8	0,40
DISFONÍA	49	15	0,01
DISNEA	6	2	1
OTALGIA	4	4	0,22
HEMOPTISIS	5	2	1
PARESTESIAS FARÍNGEAS	2	5	0,19
<b>MESES DESDE INICIO SÍNTOMAS – N</b>	5 (2,5-7)	4 (4-7,5)	0,84
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
GLOTIS	38	6	<0,01
SUPRAGLOTIS	10	12	<0,01
SUBGLOTIS	2	0	1
HIPOFARINGE	4	3	0,40
OROFARINGE	0	1	-
<b>CATEPSINA S &gt; 594,7</b>			0,43
SÍ	29	14	

NO	25	8
----	----	---

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 24.

*Tabla 24.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con cN Positivo/Negativo como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>PAQUETES-AÑO</b>	0,68	1 (1-1,02)
<b>DISFONÍA</b>	0,56	1,6 (0,3-7,5)
<b>GLOTIS</b>	0,32	0,4 (0,1-2,4)
<b>SUPRAGLOTIS</b>	0,31	2,4 (0,4-13,1)

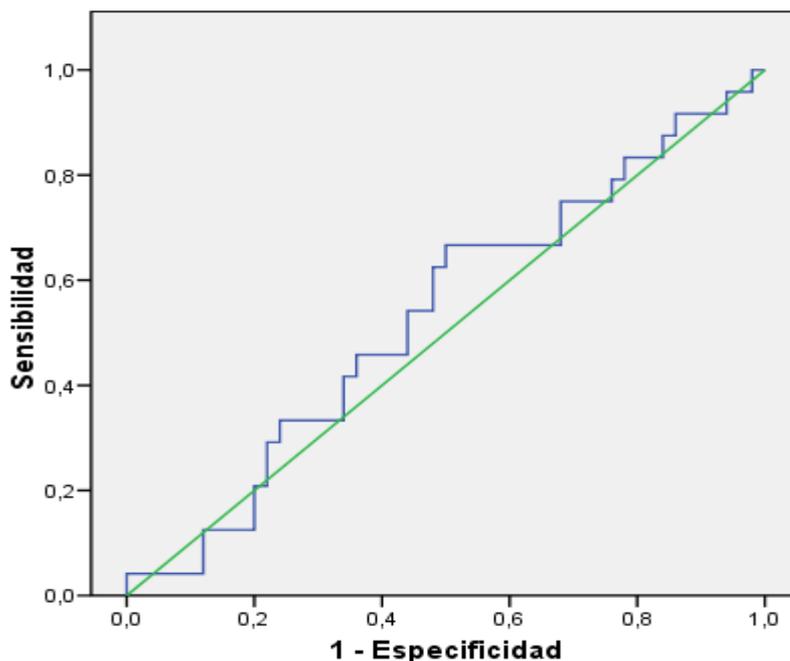
*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,22.

## 6.2. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES MEDIANTE LA VARIABLE N ANATOMOPATOLÓGICA AGRUPADA

Se confeccionó una curva ROC para pN negativo vs positivo, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 13.

*Gráfico 13.*

*Curva ROC para pN Negativo/Positivo con los niveles de catepsina S*



*Nota.* Área bajo la curva = 0,53.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 25).

*Tabla 25.*

*Índice de Youden para pN Negativo/Positivo*

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
521,8350	0,6667	0,4400	0,1067
561,6550	0,6667	0,4800	0,1467
<b>594,6600</b>	<b>0,6667</b>	<b>0,5000</b>	<b>0,1667</b>
614,1400	0,6250	0,5000	0,1250
624,5600	0,6250	0,5200	0,1450

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 594,66”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con una pN negativa y aquellos con una pN positiva. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26.

Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable

<b>VARIABLE</b>	<b>pN NEGATIVO (N=50)</b>	<b>pN POSITIVO (N=24)</b>	<b>VALOR P</b>
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,6 (58,6-64,6)	62,6 (58,3-66,8)	0,93
<b>SEXO – N</b>			0,74
<i>HOMBRE</i>	47	23	
<i>MUJER</i>	3	1	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	40 (30-50)	45 (30-50)	0,50
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<i>ODINOFAGIA</i>	3	2	0,66
<i>DISFAGIA</i>	12	8	0,40
<i>DISFONÍA</i>	45	18	0,09
<i>DISNEA</i>	6	2	1
<i>OTALGIA</i>	4	4	0,42
<i>HEMOPTISIS</i>	5	1	0,66
<i>PARESTESIAS FARÍNGEAS</i>	1	6	<0,01
<b>MESES DESDE INICIO</b>	6 (2,5-7)	4 (3-7)	0,70
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
<i>GLOTIS</i>	36	7	<0,01
<i>SUPRAGLOTIS</i>	9	12	<0,01
<i>SUBGLOTIS</i>	2	0	1
<i>HIPOFARINGE</i>	3	4	0,20
<i>OROFARINGE</i>	0	1	-
<b>CATEPSINA S &gt;594,7</b>			0,18

POSITIVA	25	16
NEGATIVA	25	8

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Inter cuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 27.

*Tabla 27.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con pN Negativo/Positivo como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>PARESTESIAS FARÍNGEAS</b>	0,06	0,1 (0,1-1)
<b>GLOTIS</b>	<0,05	0,2 (0,5-0,9)
<b>SUPRAGLOTIS</b>	0,95	1,1 (0,2-5,2)

*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,30.

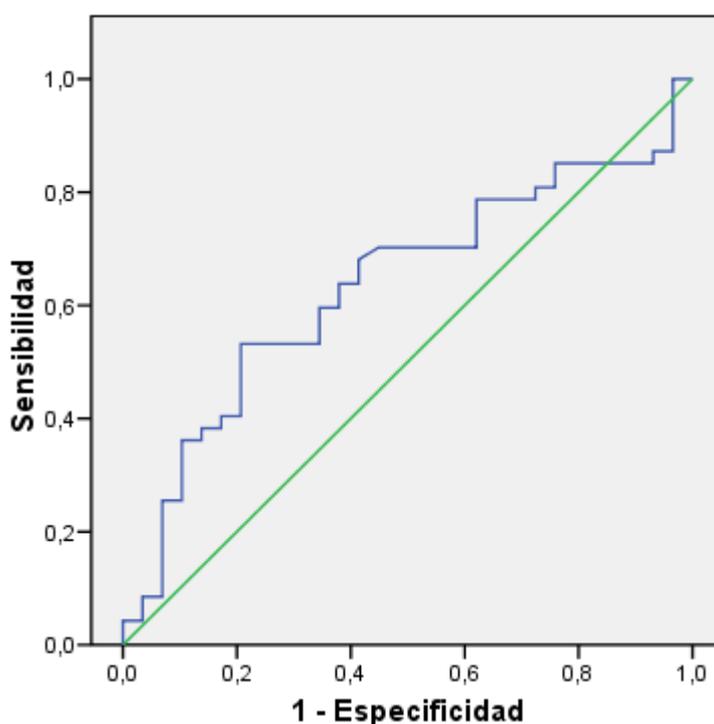
## 7. ANÁLISIS RELACIONANDO EL ESTADIO TUMORAL CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S SALIVAR

### 7.1. ANÁLISIS COMPARANDO EL ESTADIO DEL TUMOR MEDIANTE LA VARIABLE ESTADIO CLÍNICO AGRUPADO

Se confeccionó una curva ROC para estadio clínico inicial vs avanzado, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 14.

Gráfico 14.

Curva ROC para Estadio Clínico Inicial/Avanzado con los niveles de catepsina S salivar



Nota. Área bajo la curva = 0,63

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 28).

Tabla 28.

Índice de Youden para Estadio Clínico Inicial/Avanzado

<b>Catepsina S Salivar</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Índice de Youden</b>
796,7600	0,5319	0,7241	0,2561
813,7900	0,5319	0,7586	0,2905
<b>826,0500</b>	<b>0,5319</b>	<b>0,7931</b>	<b>0,3250</b>
833,7900	0,5106	0,7931	0,3037
848,3400	0,4894	0,7931	0,2825

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 826,05”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con un estado clínico inicial y aquellos con un estadio clínico avanzado. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

*Tabla 29.*

*Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable*

<b>VARIABLE</b>	<b>ESTADIO CLÍNICO INICIAL (N=29)</b>	<b>ESTADIO CLÍNICO AVANZADO (N=47)</b>	<b>VALOR P</b>
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,8 (57,7-65,9)	62,9 (59,9-65,9)	0,67
<b>SEXO – N</b>			1
HOMBRE	28	44	
MUJER	1	3	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	30 (30-60)	40 (30-50)	0,47
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
ODINOFAGIA	0	5	0,15
DISFAGIA	6	15	0,42
DISFONÍA	24	40	0,79
DISNEA	0	8	0,02
OTALGIA	0	8	0,02
HEMOPTISIS	3	4	1
PARESTESIAS FARÍNGEAS	2	5	0,70
TUMORACIÓN CERVICAL	0	6	0,08
<b>MESES DESDE INICIO SÍNTOMAS – N</b>	4 (2-6)	6 (4-7)	0,10
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			0,32
GLOTIS	20	24	0,13
SUPRAGLOTIS	6	16	0,21
SUBGLOTIS	0	2	0,52
HIPOFARINGE	3	4	1
OROFARINGE	0	1	-

<b>CATEPSINA SALIVAR S &gt; 826,05</b>			<b>&lt;0,01</b>
<i>SÍ</i>	6	25	
<i>NO</i>	23	22	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 30.

*Tabla 30.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con Estadio Clínico Inicial/Avanzado como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CATEPSINA S SALIVAR</b>	<0,01	4,6 (1,5-14,7)
<b>DISNEA</b>	0,99	-
<b>OTALGIA</b>	0,99	-

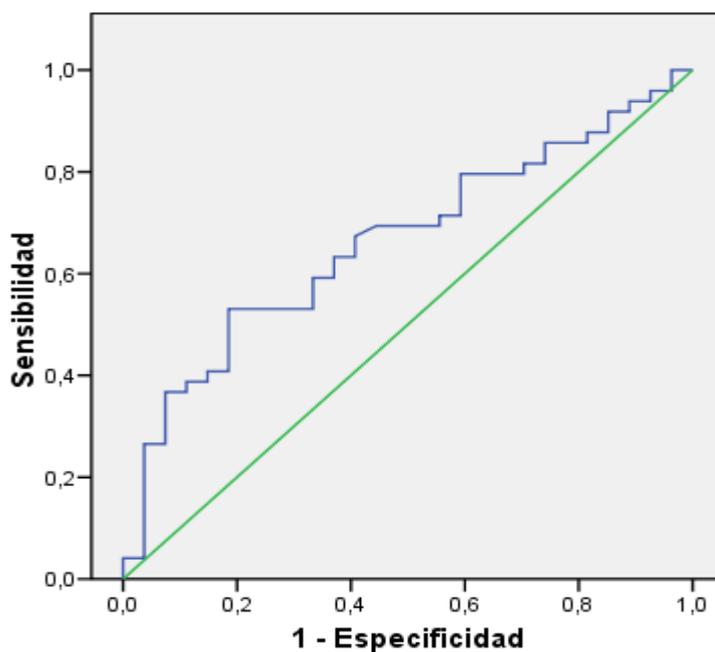
*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,39.

## 7.2. ANÁLISIS COMPARANDO EL ESTADIO DEL TUMOR MEDIANTE LA VARIABLE ESTADIO ANATOMO-PATOLÓGICO AGRUPADO

Se confeccionó una curva ROC para estadio anatomopatológico inicial vs avanzado, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 15.

Gráfico 15.

Curva ROC para Estadio Anatómo-Patológico Inicial/Avanzado con los niveles de catepsina S



Nota. Área bajo la curva = 0,66.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 31).

Tabla 31.

Índice de Youden para Estadio Anatómo-Patológico Inicial/Avanzado

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
796,7600	0,5306	0,7047	0,2714
813,7900	0,5306	0,7778	0,3084
<b>826,0500</b>	<b>0,5306</b>	<b>0,8148</b>	<b>0,3454</b>
833,7900	0,5102	0,8148	0,3250
848,3400	0,4898	0,8148	0,3046

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 826,05”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos con un estado anatomopatológico inicial y aquellos con un estadio anatomopatológico avanzado. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, síntomas, meses desde inicio de los síntomas y localización tumoral. Los resultados se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32.

Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable

VARIABLE	ESTADIO ANATOMO- PATOLÓGICO INICIAL (N=27)	ESTADIO ANATOMO- PATOLÓGICO AVANZADO (N=47)	VALOR P
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,9 (57,6-66,2)	62,8 (59,9-65,7)	0,74
<b>SEXO – N</b>			1
<i>HOMBRE</i>	26	46	
<i>MUJER</i>	1	3	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	30 (25-60)	40 (30-50)	0,35
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<i>ODINOFAGIA</i>	0	5	0,15
<i>DISFAGIA</i>	3	18	0,02
<i>DISFONÍA</i>	22	42	0,63
<i>DISNEA</i>	0	8	0,05
<i>OTALGIA</i>	0	8	0,05
<i>HEMOPTISIS</i>	3	4	0,70
<i>PARESTESIAS FARÍNGEAS</i>	1	6	0,41
<i>TUMORACIÓN CERVICAL</i>	0	6	0,08
<b>MESES DESDE INICIO</b>	4 (2-7)	5 (3-7)	0,30
<b>SÍNTOMAS – N</b>			
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
<i>GLOTIS</i>	19	25	0,10
<i>SUPRAGLOTIS</i>	5	17	0,14
<i>SUBGLOTIS</i>	1	1	1

HIPOFARINGE	2	5	1
OROFARINGE	0	1	-
<b>CATEPSINA S &gt; 826,1</b>			<b>&lt;0,01</b>
POSITIVA	5	26	
NEGATIVA	22	23	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivalente, tal y como se muestra en la Tabla 33.

*Tabla 33.*

*Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con Estadio Anatómico-Patológico Inicial/Avanzado como variable dependiente*

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CATEPSINA S SALIVAR</b>	0,01	4,8 (1,4-16,6)
<b>DISFAGIA</b>	0,03	5,3 (1,2-22,4)
<b>DISNEA</b>	1	-
<b>OTALGIA</b>	1	-

*Nota.* OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,46.

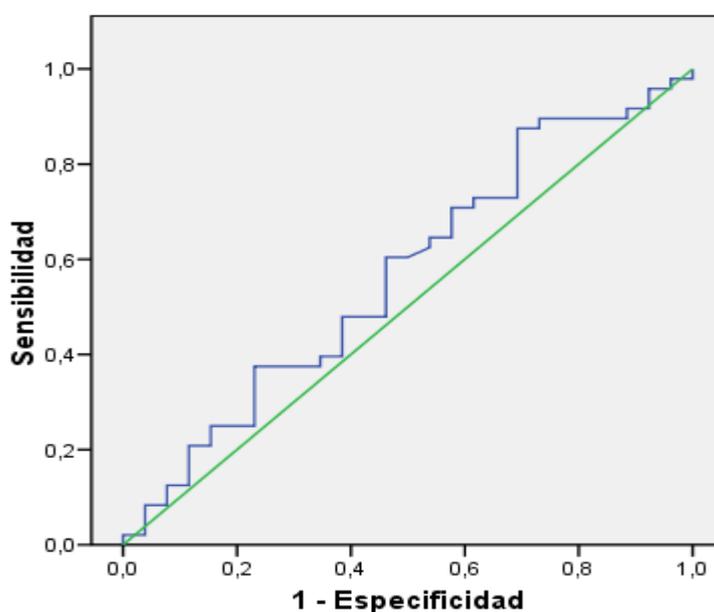
## 8. ANÁLISIS RELACIONANDO LA PRESENCIA DE COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS CON LA ACTIVIDAD DE LA CATEPSINA S

### 8.1. ANÁLISIS DE COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS GLOBALES

Se confeccionó una curva ROC para la presencia de complicaciones postquirúrgicas, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 16.

Gráfico 16.

Curva ROC para Complicaciones Postquirúrgicas Sí/No con los niveles de catepsina S



Nota. Área bajo la curva = 0,69.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 34).

Tabla 34.

Índice de Youden para Complicaciones postquirúrgicas Sí/No

<i>Catepsina S Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
859,3750	0,3750	0,6923	0,0673
866,1900	0,3750	0,7308	0,1058
<b>899,6000</b>	<b>0,3750</b>	<b>0,7692</b>	<b>0,1442</b>
949,2200	0,3542	0,7692	0,1234
1051,9700	0,3333	0,7692	0,1026

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 899,6”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los casos que habían presentado complicaciones postquirúrgicas, y aquellos que no. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, cT, cN, estadio clínico, pT, pN, estadio anatomopatológico, tipo de cirugía, estancia hospitalaria, localización tumoral, gastrostomía, diferenciación tumoral, rotura capsular y traqueotomía previa. Los resultados se muestran en la Tabla 35.

*Tabla 35.*

*Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable, en los pacientes intervenidos quirúrgicamente*

VARIABLE	COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS		VALOR
	SÍ (N=26)	NO (N=48)	P
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,8 (59,0-64,8)	62,4 (58,1-66,7)	0,83
<b>SEXO – N (%)</b>			0,61
HOMBRE	24	46	
MUJER	2	2	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	43 (30-50)	36 (30-50)	0,64
<b>cT AGRUPADA</b>			0,04
INICIAL	8	27	
AVANZADA	18	21	
<b>cN AGRUPADA</b>			0,16
NEGATIVA	16	37	
POSITIVA	10	11	
<b>ESTADIO CLÍNICO AGRUPADO</b>			0,04
INICIAL	6	23	
AVANZADA	20	25	
<b>pT AGRUPADA</b>			<0,01
INICIAL	6	27	
AVANZADA	20	21	
<b>pN AGRUPADA</b>			0,02
NEGATIVA	13	37	
POSITIVA	13	11	
<b>ESTADIO ANATOMO-PATOLÓGICO</b>			<0,01

<b>AGRUPADO</b>			
<i>INICIAL</i>	4	23	
<i>AVANZADO</i>	22	25	
<b>TIPO CIRUGÍA</b>			0,01
<i>MICROCIRUGÍA TRANSORAL LÁSER</i>	0	18	
<i>LARINGUECTOMÍA PARCIAL</i>	6	11	
<i>LARINGUECTOMÍA TOTAL</i>	19	19	
<i>AMIGDALECTOMÍA</i>	0	1	
<b>ESTANCIA HOSPITALARIA – MEDIANA (RIC)</b>	30 (24-39)	10 (3-15)	<0,01
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
<i>GLOTIS</i>	14	29	0,59
<i>SUPRAGLOTIS</i>	10	11	0,16
<i>SUBGLOTIS</i>	0	2	0,54
<i>HIPOFARINGE</i>	2	5	1
<i>OROFARINGE</i>	0	1	-
<b>GASTROSTOMÍA</b>	9	2	<0,01
<b>DIFERENCIACIÓN TUMORAL</b>			0,59
<i>BUENA</i>	6	6	
<i>MODERADA</i>	16	34	
<i>POBRE</i>	4	7	
<i>INDIFERENCIADA</i>	0	1	
<b>ROTURA CAPSULAR</b>	5	5	0,29
<b>TRAQUEOTOMÍA PREVIA</b>	1	2	1
<b>CATEPSINA S &gt; 899,6</b>			0,21
<i>POSITIVA</i>	6	18	
<i>NEGATIVA</i>	20	30	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 36.

Tabla 36.

Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con Complicaciones Postquirúrgicas Sí/No como variable dependiente

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>CT AGRUPADA</b>	0,73	2,2 (0,3-182,9)
<b>ESTADIO CLÍNICO AGRUPADO</b>	0,12	18,6 (0,5-709,1)
<b>PT AGRUPADA</b>	0,46	5,7 (0,6-550,6)
<b>ESTADIO ANATOMO-PATOLÓGICO AGRUPADO</b>	0,30	6,7 (0,2-246,2)
<b>TIPO CIRUGÍA</b>	0,69	1,3 (0,4-4)
<b>ESTANCIA HOSPITALARIA</b>	<0,01	1,2 (1,1-1,3)
<b>GASTROSTOMÍA</b>	0,52	2,0 (0,2-17,1)

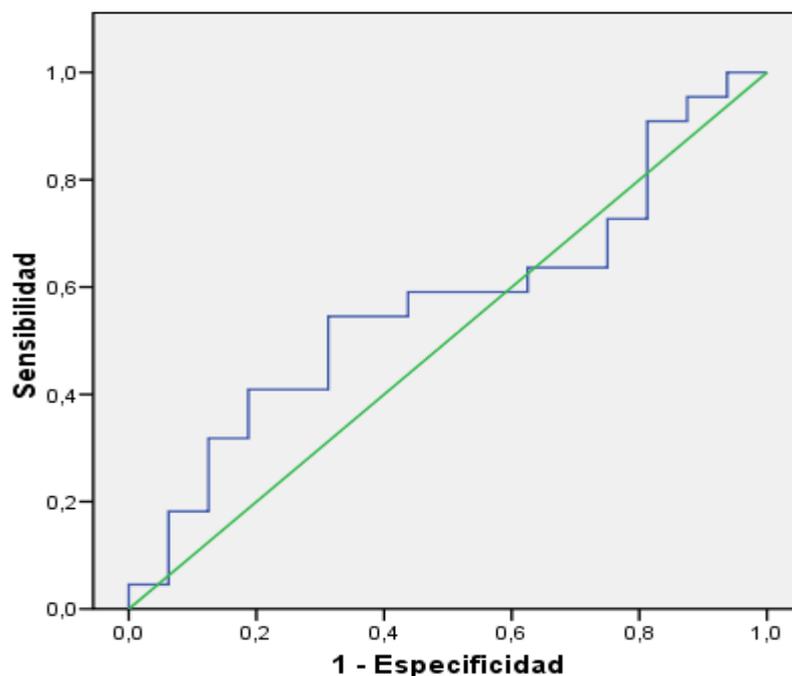
Nota. OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,58.

## 8.2. ANÁLISIS DE LA APARICIÓN DE FÍSTULA SALIVAL FARINGOCUTÁNEA TRAS LA LARINGECTOMÍA TOTAL

Se confeccionó una curva ROC para la presencia de fístula salival faringocutánea en pacientes laringectomizados totales, empleando los niveles de catepsina S salivar, que se muestra en el Gráfico 17.

Gráfico 17.

Curva ROC para Fístula Salival Sí/No con los niveles de catepsina S



Nota. Área bajo la curva = 0,59.

A continuación, se calculó el índice de Youden (Tabla 37).

Tabla 37.

Índice de Youden para Fístula Salival Sí/No

<i>Catepsina Salivar</i>	<i>Sensibilidad</i>	<i>Especificidad</i>	<i>Índice de Youden</i>
848,3400	0,5455	0,5625	0,1080
859,3750	0,5455	0,6250	0,1705
<b>866,1900</b>	<b>0,5455</b>	<b>0,6875</b>	<b>0,2330</b>
899,6000	0,5000	0,6875	0,1875
1029,5800	0,4545	0,6875	0,1420

Una vez obtenido el índice de Youden, se empleó dicho valor de catepsina S salivar para la conformación de la variable cualitativa: “intensidad de densidad óptica de catepsina S > 866,19”. Se realizó un análisis bivalente para comprobar diferencias en dicha variable entre los pacientes laringectomizados totales que habían presentado fístula salival faringocutánea, y aquellos que no. También se analizaron diferencias en las variables clínicas sexo, edad, paquetes-año, cT, cN, estadio clínico, pT, pN, estadio anatomopatológico, tipo de cirugía, estancia hospitalaria, localización tumoral, gastrostomía, diferenciación tumoral, rotura capsular y traqueotomía previa. Los resultados se muestran en la Tabla 38.

Tabla 38.

*Análisis bivalente mediante chi-cuadrado, estadístico exacto de Fisher, T de Student y U de Mann-Whitney según características de cada variable, en los pacientes sometidos a laringectomía total*

VARIABLE	FÍSTULA SALIVAL		VALOR P
	SÍ (N=16)	NO (N=22)	
<b>EDAD – MEDIA (IC95%)</b>	61,8 (57,3-66,3)	62,8 (57,8-67,8)	0,77
<b>SEXO – N (%)</b>			0,37
HOMBRE	14	21	
MUJER	2	1	
<b>PAQUETES-AÑO – MEDIANA (RIC)</b>	40 (31-48)	40 (30-50)	0,84
<b>cT AGRUPADA</b>			0,91
INICIAL	2	3	
AVANZADA	14	19	
<b>cN AGRUPADA</b>			0,98
NEGATIVA	8	17	
POSITIVA	8	5	
<b>ESTADIO CLÍNICO AGRUPADO</b>			0,62
INICIAL	1	3	
AVANZADO	15	19	
<b>pT AGRUPADA</b>			0,75
INICIAL	1	2	
AVANZADA	15	20	
<b>pN AGRUPADA</b>			0,02
NEGATIVA	5	16	

<i>POSITIVA</i>	11	6	
<b>ESTADIO ANATOMO-PATOLÓGICO</b>			0,99
<b>AGRUPADO</b>			
<i>INICIAL</i>	0	1	
<i>AVANZADO</i>	16	21	
<b>ESTANCIA HOSPITALARIA – MEDIANA (RIC)</b>	35 (28-43)	14 (12-20)	<0,01
<b>LOCALIZACIÓN TUMORAL</b>			
<i>GLOTIS</i>	8	16	0,15
<i>SUPRAGLOTIS</i>	6	3	0,13
<i>SUBGLOTIS</i>	0	1	1
<i>HIPOFARINGE</i>	2	2	1
<b>GASTROSTOMÍA</b>	7	1	<0,01
<b>DIFERENCIACIÓN TUMORAL</b>			0,67
<i>BUENA</i>	4	3	
<i>MODERADA</i>	10	16	
<i>POBRE</i>	2	3	
<i>INDIFERENCIADA</i>	0	0	
<b>ROTURA CAPSULAR</b>	5	1	0,07
<b>TRAQUEOTOMÍA PREVIA</b>	1	2	1
<b>CATEPSINA S &gt; 866,2</b>			0,16
<i>POSITIVA</i>	11	10	
<i>NEGATIVA</i>	5	12	

*Nota.* Datos expresados como n (%), media (IC95%) o mediana (RIC) según su distribución. N=frecuencia absoluta. IC95%=Intervalo de confianza al 95%. RIC=Rango Intercuartílico.

Por último, se realizó el análisis multivariante mediante regresión logística binaria con las variables que resultaron significativas en el análisis bivariante, tal y como se muestra en la Tabla 39.

Tabla 39.

Análisis multivariante mediante regresión logística binaria con Fístula Salival Sí/No como variable dependiente

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>pN AGRUPADA</b>	0,06	4,3 (0,9-20,3)
<b>ESTANCIA HOSPITALARIA</b>	0,06	2,9 (0,9-7,8)
<b>GASTROSTOMÍA</b>	0,22	4,6 (0,4-60,2)

Nota. OR=Odds Ratio. IC95%=Intervalo de Confianza al 95%. R<sup>2</sup> de Nagelkerke de 0,51.



# DISCUSIÓN



# 1. OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA POBLACIONAL

## 1.1 OBTENCIÓN DEL GRUPO DE CASOS

La gran mayoría de los pacientes con un carcinoma epidermoide faringolaríngeo son sometidos a una intervención quirúrgica, bien como tratamiento o bien para la obtención de una biopsia que confirme la enfermedad. Se aprovechó el momento inmediato previo a dicha intervención ya que ofrecía las condiciones idóneas para la obtención de la muestra salivar: ayunas de al menos 8 horas, sin cepillado de dientes ni mascado de ninguna sustancia, para evitar la estimulación salival, como aconsejan la mayoría de los autores. (225)

Existió una pequeña proporción de pacientes con certeza sin necesidad de intervención quirúrgica, ni tampoco se sometían a cirugía dentro de su plan terapéutico. Se trataba fundamentalmente de pacientes con carcinomas de orofaringe o de laringe iniciales, en los que se tomaba la biopsia en la propia consulta, y su tratamiento consistía en la radioterapia  $\pm$  quimioterapia. No se incluyeron a estos pacientes en el estudio por la dificultad para lograr una muestra salivar con garantías suficientes.

Se utilizaron las torundas de algodón Salivette®, de la empresa SARSTEDT, pues han sido diseñadas específicamente para la obtención de muestras salivares, y existe abundante bibliografía que apoya su uso, tanto en la práctica clínica habitual (medición de cortisol y otras hormonas en saliva) como en estudios experimentales. (227,228). Dado que la participación en el estudio no conllevaba el sometimiento a ninguna medida invasiva, ni visitas adicionales al centro hospitalario, tuvo una excelente acogida entre los pacientes de nuestra muestra.

Aunque la histología más común en los procesos neoplásicos de la faringe y la laringe es el carcinoma epidermoide, durante la realización del estudio fueron diagnosticados pacientes con otros tipos de cáncer como sarcomas, adenocarcinomas o carcinomas basaloides. Ninguno de ellos se consideró candidato, ya que estas formas neoplásicas presentan una etiopatogenia y un trasfondo molecular diferente al carcinoma epidermoide. También se excluyeron, por los mismos motivos, aquellos pacientes con carcinoma epidermoide de orofaringe P16+.

Fueron igualmente excluidos del estudio cualquier paciente con una condición crónica que pudiera alterar el proteoma salivar, ya fuera una segunda enfermedad oncológica activa, o bien un proceso crónico de base inflamatoria.

Por último, es preciso aclarar el caso especial de las metástasis ganglionares cervicales de carcinoma epidermoide de origen desconocido. En el estudio se incluyeron inicialmente cinco pacientes con dicho proceso. De ellos, en dos casos se

demostró con posterioridad el origen faríngeo de su cáncer, por lo que se mantuvieron en la muestra. En los otros tres casos, no se logró determinar el origen primario del tumor, por lo que fueron retirados del estudio, al no poder garantizar el criterio de inclusión principal de padecer un carcinoma epidermoide con origen en la faringe o la laringe.

## 1.2 OBTENCIÓN DEL GRUPO CONTROL

En la conformación del grupo control, había que prestar atención a un aspecto primordial en el grupo: la ausencia de condiciones patológicas que pudieran alterar el proteoma salivar ya fuera a nivel local en la región de la cabeza y cuello, o a nivel sistémico. Ello podía ser problemático en un servicio de Otorrinolaringología, ya que la mayor parte de los pacientes que acuden presentan algún problema de base inflamatorio o neoplásico.

Finalmente se solventó dicha circunstancia obteniendo los controles de la Unidad de Voz del Servicio de Otorrinolaringología del HCUVA. Esta consulta atiende sobre todo pacientes con trastornos funcionales laríngeos, por lo que no era esperable encontrar alteraciones histológicas o moleculares en la vía aéreo-digestiva superior que pudieran alterar el proteoma salivar. Además, en la propia consulta se realizaba una exploración faringolaríngea completa, que permitía confirmar la ausencia de enfermedad neoplásica o inflamatoria.

Dado que se trataba de pacientes que en su mayoría no serían sometidos a tratamiento quirúrgico, existía el inconveniente de la obtención de la muestra salivar, que debía realizarse en las mismas condiciones que en el grupo de casos. Para ello, estos pacientes eran avisados telefónicamente los días previos a la consulta, y se les planteaba la participación en el estudio. Si aceptaban, se les pedía que acudieran en ayunas, sin cepillado de dientes ni mascado de ninguna sustancia.

La participación en el grupo control tuvo menor acogida que en el grupo de casos, por las molestias relacionadas con el ayuno y la explicación del procedimiento por telemática.

## 1.3 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DE AMBOS GRUPOS

La edad media en casos fue de 62,4 años, y en controles fue de 47,7 años, netamente inferior. Estas diferencias se explican por cómo se seleccionaron los pacientes en ambos casos. La edad media del grupo de casos concuerda con lo publicado por la mayoría de los autores, que señalan la máxima incidencia del cáncer de cabeza y cuello entre la sexta y la séptima década de vida (5).

Sin embargo, los trastornos funcionales laríngeos habituales que se tratan en una consulta especializada de patología vocal son típicos de edades más tempranas.

Muchos de ellos son reflejos de lesiones congénitas en cuerdas vocales o de malos hábitos vocales, que se manifiestan con el uso prolongado de la voz, típicamente al comenzar a ejercer ciertas profesiones como profesores o comerciales, entre la tercera y la cuarta década de vida.

En cuanto al sexo, la gran mayoría de los pacientes del grupo de casos eran hombres (97,4%) respecto a un porcentaje cercano a la igualdad en el grupo control (53,1% para el sexo masculino). El cáncer de cabeza y cuello es una patología que predomina claramente en el sexo masculino, aunque en los últimos años está aumentando la incidencia en el sexo femenino. La mayoría de los autores actualmente siguen reportando una clara preponderancia en hombres, aunque no en una proporción tan acusada como en nuestro estudio, sino en porcentajes alrededor del 80%. (229). Puede contribuir a este hecho la ausencia en nuestra muestra de pacientes con cáncer de cavidad oral, donde la incidencia en mujeres es superior respecto a la laringe o la hipofaringe (4).

La equiparidad de sexos en el grupo control refleja las características de la consulta en la que se recogieron estos pacientes. Aunque los trastornos funcionales laríngeos son más frecuentes en mujeres jóvenes, con series que hablan incluso de un 80% de prevalencia en el sexo femenino (230), en esa consulta se atienden pacientes que precisan un estudio de voz avanzado, con un abanico relativamente amplio de patologías funcionales subyacentes, que hace que no exista una preponderancia final hacia ningún sexo.

Se interrogó a los pacientes del grupo control por el hábito tabáquico, principal factor de riesgo del cáncer de cabeza y cuello, con una prevalencia del 34,4%. Este dato es superior al que muestran las encuestas de salud realizadas por el Instituto Nacional de Estadística en España, que hablan de un 19,8% de fumadores en 2020 (231). Es posible que en estos pacientes el hábito tabáquico, aunque no estuviera originando patología orgánica laríngea, sí que contribuyera a empeorar sus problemas funcionales, y los llevara a la consulta especializada.

Por último, respecto a los antecedentes personales de cáncer, una proporción no desdeñable del grupo de casos (18,4%) había padecido y superado otro proceso neoplásico con anterioridad, generalmente pulmón o vejiga, enfermedades que se asocian con frecuencia al cáncer de cabeza y cuello al compartir similares factores de riesgo. En el grupo de control, de población más joven y menor proporción de hábito tabáquico, solo había un paciente con antecedente de carcinoma tiroideo.

## 2. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS

### 2.1 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS

La laringe supone el principal órgano de asiento de los tumores de nuestro estudio, con una clara superioridad (89,4%) sobre la hipofaringe (9,2%) y sobre la orofaringe (1,4%). Pese a que constituye la segunda localización más habitual dentro del cáncer de cabeza y cuello, en la mayoría de los estudios las diferencias no son tan manifiestas, con una incidencia de entre 2 y 2,5 veces superior a la hipofaringe y a la orofaringe. (2)

Especialmente señalable es la existencia de un único paciente con carcinoma de orofaringe en la muestra. Este hecho puede explicarse por los siguientes motivos:

- Primero, los criterios de exclusión del estudio eliminan de la muestra a los pacientes con un tumor P16+, que son alrededor de un tercio de los cánceres de orofaringe. (17)
- Como se ha explicado previamente, tampoco se incluyeron en el estudio pacientes no sometidos a intervención quirúrgica. El hecho de que la orofaringe sea altamente susceptible de biopsia en consulta, y que muchos pacientes sean sometidos a tratamientos con quimiorradioterapia; contribuyó sin duda a que no fueran seleccionados para el estudio.
- Por último, también es preciso señalar que en el centro donde se desarrolló este trabajo, los pacientes con carcinoma de orofaringe no siempre eran remitidos a la consulta de Otorrinolaringología, sino que en ocasiones se ocupaba de su tratamiento el servicio de Cirugía Maxilofacial.

También llamativa es la proporción 9:1 de la laringe con respecto a la hipofaringe en nuestra muestra, aunque hay algunos aspectos que conviene tener en cuenta. En primer lugar, existen tumores, sobre todo en estadios avanzados, en los que, por la extensión de la enfermedad, no siempre resulta fácil discernir entre un origen en la supraglotis o en la hipofaringe, sobre todo cuando afectan a zonas limítrofes como el repliegue aritenopiglótico. Es posible, por tanto, que algunos de estos pacientes con un cáncer de hipofaringe fueran catalogados como tumores de supraglotis.

Conviene resaltar también que el HCUVA era centro de referencia, desde algunas áreas de salud, para la microcirugía transoral láser, siendo la mayor parte de ellos tumores de glotis o supraglotis en estadios iniciales. Sin embargo, los tumores de hipofaringe suelen presentarse en estadios más avanzados y requieren de tratamientos con quimiorradioterapia o de cirugías abiertas más agresivas, que sí se realizaban en sus respectivos centros, y por tanto nunca llegaban a nuestro hospital.

Este hecho ha podido favorecer la mayor proporción de tumores laríngeos respecto a hipofaríngeos en nuestra muestra.

Si nos centramos en la laringe y sus sublocalizaciones, los datos de nuestra muestra sí que son comparables a los de la mayoría de los estudios, que señalan un tercio de los casos en la supraglotis, dos tercios en la glotis, y una proporción mínima en la subglotis (21).

Los síntomas referidos por los pacientes son reflejo de la localización de su proceso tumoral. El papel predominante de la disfonía, síntoma presente en la mayoría de los cánceres de laringe salvo en tumores pequeños de supraglotis; concuerda con la alta proporción de carcinomas laríngeos en la muestra. Le sigue en frecuencia la disfagia, síntoma típico de cánceres de hipofarínge o de laringe de cierto tamaño. Otros síntomas como la odinofagia o la otalgia, más propios de la faringe, aparecen en menor medida por la poca proporción de tumores en esta localización.

Resulta interesante observar también los datos referidos a las adenopatías cervicales. Mientras que el paciente percibió una tumoración en el cuello en el 11,8 %, la detección de adenopatías sospechosas por el especialista se elevó hasta el 21,1 %, y el rastreo mediante tomografía computarizada dejó el porcentaje final en 26,3 % de casos con metástasis ganglionares cervicales. Queda patente de este modo la necesidad de una prueba de imagen para un correcto estadiaje; hecho por otro lado firmemente asentado dentro de la oncología de cabeza y cuello.

## 2.2 ANÁLISIS DE LOS PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS REALIZADOS

La cirugía fue la principal herramienta terapéutica de los pacientes de nuestro estudio. La laringectomía total fue la técnica empleada en aproximadamente la mitad de los pacientes, y corresponde a aquellos con tumores localmente avanzados de laringe y de hipofarínge. Aunque acarrea una importante morbilidad para el paciente, la mayoría de los autores coinciden en su necesidad en estos casos. Los protocolos de preservación de órgano basados en la quimioterapia y radioterapia ofrecen menores tasas de éxito y acarrear un alto riesgo de pérdida de la función laríngea, que obliga posteriormente a la extirpación de la laringe (232). Por eso, en nuestro centro, estos pacientes eran tratados con laringectomía total primaria.

Por otro lado, las técnicas de laringectomía parcial abierta han experimentado un franco retroceso en la última década. Empleadas generalmente para aquellos tumores que sobrepasaban los límites de una cirugía transoral, pero en los que se deseaba evitar la laringectomía total, han sido sustituidas en su mayor parte por los protocolos de preservación de órgano. En nuestro estudio, aún juegan un papel importante (23% de los casos). Dos factores han contribuido a ello:

1. Primero, las muestras analizadas en este estudio se empezaron a recoger en 2011, cuando los protocolos de preservación de órgano no se asentaban en nuestro centro.
2. En segundo lugar, la existencia de cirujanos con amplia experiencia en estas técnicas decantó la balanza hacia ellas, particularmente en casos donde son especialmente útiles, como los tumores de laringe que afectan a la comisura anterior.

Por último, la microcirugía transoral láser fue la protagonista en aquellos tumores localmente iniciales de laringe o de hipofaringe. Aunque la radioterapia en monoterapia presenta tasas de curación similares (47), en nuestro centro se empleaba la microcirugía endolaríngea para toma de biopsia intraoperatoria, confirmación del proceso oncológico y tratamiento mediante exéresis láser en un mismo acto quirúrgico, evitando demoras que pudieran tener un impacto negativo en la morbimortalidad del paciente.

El vaciamiento cervical electivo se asoció en todos los casos de tumores localmente avanzados, tuvieran o no adenopatías clínicamente sospechosas; así como en tumores más localizados, pero con sospecha de metástasis ganglionar cervical en el estudio preoperatorio. Ello hizo que se asociara a todos los casos de laringectomía total, y a algunos casos concretos subsidiarios de laringectomía parcial.

Aunque no hay dudas acerca de la realización del vaciamiento cervical ante adenopatías patológicas, sí que existen autores que rechazan este procedimiento ante cuellos cN0, independientemente del tamaño o localización del tumor (57). En nuestro servicio se realizó atendiendo a las indicaciones clásicas, ya que se priorizó la necesidad de una estadificación completa del proceso oncológico y la exéresis de las metástasis ganglionares cervicales ocultas, que se estiman hasta en un 30% (56).

### 2.3 ANÁLISIS DE LAS COMPLICACIONES POSTQUIRÚRGICAS

Las complicaciones postquirúrgicas deben separarse en función de la técnica quirúrgica para un mejor análisis. Hay que señalar que no existieron complicaciones en los casos tratados mediante microcirugía transoral láser. Esto contrasta con la tasa de complicaciones reportada por muchos autores, que está entre el 10% y el 20%, e incluye la hemorragia, la disnea y el enfisema cervical, entre otras (233)(234). Ninguna de ellas se presentó en los pacientes de nuestro estudio. Esto se debe probablemente a que muchos tumores T2 o T3 de laringe, subsidiarios de microcirugía transoral láser para otros autores, fueron tratados en nuestro centro mediante laringectomía parcial debido a la experiencia que existía. Precisamente en estos tumores más avanzados es donde los autores reportan el mayor número de complicaciones.

En cuanto a las laringectomías parciales, destacan 4 casos de disfagia y un caso de hemorragia postoperatoria, que requirió revisión quirúrgica; de un total de 17

intervenciones. La disfagia corresponde fundamentalmente a una alteración en la seguridad por pérdida de parte de la estructura laríngea, y está presente hasta en un 40% de los casos (235). Nuestras tasas de disfagia fueron significativamente menores (23,5%). Para explicar este hecho, hay que tener en cuenta que existen varias técnicas de laringectomía parcial, asociándose a disfagia con mayor fuerza aquellas que implican la extirpación de la epiglotis (laringectomía horizontal supraglótica o laringectomía supracricoidea con cricohiopexia). En nuestro estudio, estas técnicas tienen poca representación, en favor de técnicas como la laringectomía frontolateral, que preserva la epiglotis y reduce la disfagia.

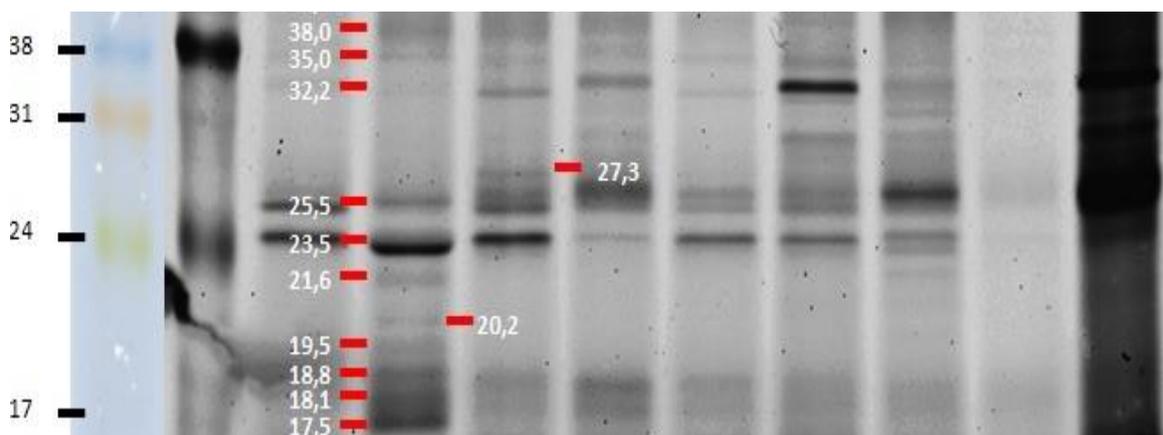
Por último, la laringectomía total tiene en la fístula salival faringocutánea su complicación más frecuente y estudiada. En nuestro estudio se presentó en un 42%, tasas que se sitúan por encima del 10-25% de la mayoría de los autores, aunque hay estudios que la describen hasta en un 57% de los casos (48). Un déficit en la rehabilitación de estos pacientes pudo haber contribuido a una tasa alta de fístula salival (los niveles bajos de hemoglobina y albúmina preoperatorios son un factor de riesgo demostrado), ya que los programas de rehabilitación se desarrollaron en nuestro centro posteriormente al tratamiento de muchos de estos pacientes. También pudo contribuir el origen tumoral en la hipofaringe en el 24% de las laringectomías totales realizadas, factor que también aumenta el riesgo de fístula salival.

Otras complicaciones tras la laringectomía total tuvieron tasas mucho menores. La hemorragia postoperatoria tuvo lugar en 2 pacientes (5,2%) y la infección en otros 2 (5,2%), ambos porcentajes que concuerdan con los presentes en la literatura (52).

### 3. ANÁLISIS DEL PERFIL DE PROTEÍNAS BASADO EN ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS SALIVARES

FIGURA 37.

Ejemplo de uno de los geles realizados. En la primera calle se muestran las referencias del peso molecular en kilodaltons (kDa) que representa cada una de las bandas.



El gel que aparece en la Figura 37 incluye tanto muestras de grupo control como de grupo de casos y es un excelente ejemplo para mostrar la actividad de las catepsinas B, S y L. Se puede reconocer en la mayor parte de los geles un patrón constante representado por una doble banda a la altura de los 25 kDa, después una banda intensa a los 23 kDa aproximadamente, y por último una banda mucho más tenue a los 21 kDa. Esta es la distribución esperada según el fabricante (Figura 33), aunque el peso molecular es ligeramente inferior al que se puede hallar en la literatura.

La doble banda de la catepsina B puede verse en las calles número 3, 4, 5, 6 y 7 del gel de la Figura 37; mientras que la banda de la catepsina S es la más intensa y constantes de todas, lo que concuerda con los valores de intensidad óptica elevados que se obtuvieron.

Es llamativo como la banda correspondiente a la catepsina L, a la altura aproximada de los 21 kDa, aparece de manera tenue e inconstante, lo que está en relación con los valores de fluorescencia bajos que se obtuvieron en todos los geles.

### 3.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD GLOBAL DE LAS CATEPSINAS SALIVARES

TABLA 40.

*Intensidad de densidad óptica total de las 3 catepsinas analizadas*

<b>INTENSIDAD DE DENSIDAD ÓPTICA (MEDIANA – RIC)</b>	
<b>CATEPSINA B</b>	191,3 (77,6 – 336,5)
<b>CATEPSINA S</b>	432,8 (232,9 – 899,6)
<b>CATEPSINA L</b>	68,8 (21,7 – 200,9)

*Nota.* RIC = Rango Intercuartílico

Los datos obtenidos de intensidad de densidad óptica total (tanto en las muestras del grupo de casos como del grupo control) pueden verse resumidos en la Tabla 40 y aportan información muy relevante.

Al analizarlos de manera global, destaca la elevada actividad de la catepsina S en comparación con las catepsinas B y L. Dado que son datos procedentes de pacientes sanos y enfermos, podría teorizarse que esta elevación obedece a una presencia natural de la catepsina S en saliva, que sería más abundante en este medio que los otros representantes de su familia.

No obstante, el estudio del proteoma salivar humano no apoya esta hipótesis, pues ninguna catepsina está presente en la saliva normal en cantidades reseñables, ocupando este papel principal inmunoglobulinas, lisozima y otras proteínas del sistema inmune (208, 236). De hecho, la catepsina que más ha sido estudiada en el contexto de las enfermedades periodontales y del cáncer oral, y cuya presencia en la saliva de individuos sanos sí que ha podido ser demostrada, es la catepsina B (222, 223). Sin embargo, la actividad de la catepsina S en nuestro estudio tuvo una mediana de más del doble que la catepsina B, y 7 veces más que la catepsina L. Ello invita a pensar que la catepsina S tenga un papel más relevante en el proceso oncológico faringolaríngeo de nuestros pacientes.

Hay que destacar que en las 3 catepsinas existen casos de valores muy elevados de intensidad de densidad óptica, que llegan a multiplicar por 10 el valor de su

mediana. Se han revisado estos casos para asegurar que no se deba a errores en el experimento. Corresponden todos ellos a muestras del grupo de casos, y a pacientes con tumores en estadios avanzados.

## 3.2 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS CATEPSINAS SALIVARES ENTRE AMBOS GRUPOS

La Tabla 41, resumen de los datos aportados previamente, separa la actividad de las 3 catepsinas analizadas entre el grupo de casos y el grupo control.

TABLA 41.

*Intensidad de densidad óptica separada por casos y controles. Análisis bivalente mediante U de Mann-Whitney*

	<b>CASOS (IOD COMO MEDIANA – RIC)</b>	<b>CONTROLES (IOD COMO MEDIANA – RIC)</b>	<b>VALOR P</b>
CATEPSINA B	190,2 (63,9 – 348,4)	192,4 (127 – 284,5)	0,99
CATEPSINA S	652,3 (272,5 – 1246,8)	301,4 (197,3 – 398,6)	<0,01
CATEPSINA L	41,9 (14,8 – 103,2)	184,2 (96,2 – 275,3)	<0,01

*Nota.* IOD = intensidad de densidad óptica. RIC = rango intercuartílico.

### 3.2.1 Comparación de la actividad de la catepsina B entre ambos grupos

Destaca en primer lugar la ausencia, a simple vista, de diferencias en cuanto a la actividad de la catepsina B entre ambos grupos. Esto resulta muy llamativo pues esta es una de las catepsinas que más ha sido estudiada dentro del cáncer de cabeza y cuello.

Desde la década de los 90 ya se documentaron aumentos de catepsina B en el tejido tumoral del carcinoma de cabeza y cuello, en el que se estudiaban de manera conjunta carcinomas de cavidad oral, faringe y laringe (191). Más adelante, ya se demostró, en el carcinoma oral, una relación entre la sobreexpresión de catepsina B y un estadio tumoral avanzado; e incluso se llegó a demostrar *in vitro* que la inhibición de la catepsina B disminuía la capacidad de las células tumorales de invadir los tejidos adyacentes (199). Incluso esta relación ha sido reforzada recientemente analizando la catepsina B en la saliva de pacientes con carcinoma oral (224).

Debe señalarse que todos los estudios citados realizaban experimentos de cuantificación de proteína (ELISA), mientras que nuestro estudio se basa en la actividad de las enzimas, lo que puede contribuir a las diferencias señaladas.

Pero aún es más importante tener en cuenta que, aunque forma parte del cáncer de cabeza y cuello, el diseño de nuestro estudio hace que puedan existir diferencias importantes en una muestra salivar de carcinoma oral, con respecto a las nuestras, que provienen de la faringe y de la laringe. La mayoría de los autores que han investigado biomarcadores salivares en el cáncer oral lo han hecho con la lógica presunción de que obtenían material de una saliva que estaba en permanente contacto con el tumor, por lo que sus componentes podrían ser un reflejo del microambiente tumoral. Dicho de otro modo, es muy factible que la catepsina B se vierta a la saliva que baña el tumor y pueda por tanto ser detectada en ella.

Esta circunstancia no es probable que se de en la faringe y en la laringe. Hay que recordar que la saliva es producida por las glándulas salivares mayores y menores, cuyos conductos desembocan en la cavidad oral. Desde allí, la saliva pasa a la faringe, momento en el cual podría estar en contacto con el lecho tumoral en caso de tumores que se originen o extiendan hacia la orofaringe o la hipofaringe; pero inmediatamente después es deglutida.

Por tanto, aunque el carcinoma epidermoide faringolaríngeo presentase un aumento de la catepsina B, como es de suponer por los estudios globales sobre cáncer de cabeza y cuello realizados en los 90 y otros más específicos de la laringe realizados más adelante (205), esta elevación no se vería reflejada en la saliva, al no estar en contacto directo con las células tumorales, o ser imposible recoger de manera sencilla una saliva que haya pasado previamente por el lecho tumoral.

### 3.2.2 Comparación de la actividad de la catepsina L entre ambos grupos

El análisis de la catepsina L muestra una menor actividad en el grupo de los casos con respecto a los controles. La catepsina L es otra de las proteasas en las que se demostraron niveles elevados en el tejido tumoral del cáncer de cabeza y cuello con respecto al tejido sano (191), así como en otros cánceres, como el endometrio (180). Más aún, se han podido relacionar los niveles elevados de catepsina L en el tejido tumoral de carcinoma oral con mayor presencia de metástasis ganglionares cervicales e incluso con una menor supervivencia global (202).

Sin embargo, como ya comentamos al hablar de la catepsina B, nuestras muestras salivares no estuvieron en contacto directo con el tumor. Las catepsinas que se hallan en el microambiente tumoral del carcinoma epidermoide faringolaríngeo acaban, a través de los vasos sanguíneos y el drenaje linfático, en el torrente sanguíneo del paciente, y de ahí son excretadas por las glándulas salivares a la cavidad oral, de donde se toma la muestra. Mientras que la catepsina B es una proteasa que ejecuta sus funciones en el medio extracelular, la catepsina L se encarga de la proteólisis intracelular en el interior de los lisosomas. Este hecho puede explicar que

no se detecte actividad elevada de catepsina L procedente del tumor en un ambiente como la saliva, y sí de la catepsina B.

No obstante, sigue llamando la atención los niveles más elevados de catepsina L en la saliva de personas sanas, sin ninguna condición neoplásica ni inflamatoria sistémica ni local. A este respecto, es posible que el estado de inmunodepresión ocasionado por el tumor faringolaríngeo, así como las alteraciones de la mucosa oral provocadas por el consumo de tabaco y alcohol, disminuyan el sistema inmune asociado a mucosas de la cavidad oral, y exista una menor actividad de catepsina L, ya que es una proteasa íntimamente ligada a la respuesta inmune innata (178).

### 3.2.3 Comparación de la actividad de la catepsina S entre ambos grupos

La catepsina S muestra un claro incremento de su actividad en los pacientes enfermos respecto a los sanos, con una mediana de intensidad de densidad óptica que dobla al de los sanos. Estos datos van a favor de un posible rol de la catepsina S como biomarcador en el carcinoma faringolaríngeo, por lo que se ha realizado un análisis más detallado y extenso, que se expone en los siguientes apartados.

## 4. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE FARINGOLARÍNGEO

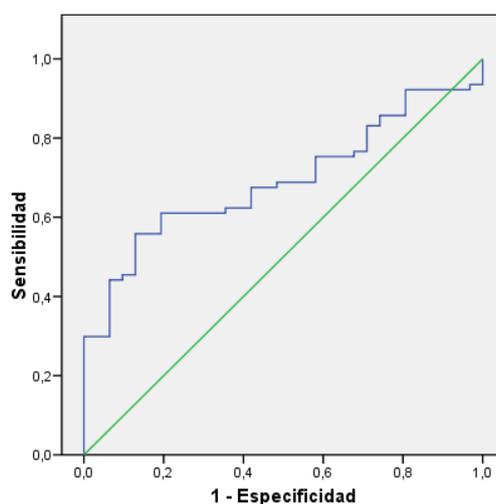
### 4.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA FARINGOLARÍNGEO

A la hora de analizar las catepsinas en saliva y su posible rol como biomarcador en el carcinoma epidermoide faringolaríngeo, uno de los principales obstáculos a salvar es la escasez de investigaciones previas sobre las catepsinas en la saliva, como se ha expuesto en la introducción de este estudio. No existen en la literatura actualmente estudios que describan los valores normales de las distintas catepsinas en saliva, ni en términos de cantidad de proteína ni de actividad.

Es por ello por lo que la curva ROC supone una herramienta adecuada para este contexto, ya que nos permite contrastar la capacidad discriminativa de la catepsina S como prueba diagnóstica en el carcinoma epidermoide faringolaríngeo y establecer el punto de corte para una sensibilidad y especificidad máximas.

*Gráfico 18.*

*Curva ROC para diagnóstico de cáncer Sí/No con la actividad de la catepsina S salivar*



La curva ROC confeccionada, que se muestra aquí nuevamente en el Gráfico 18 para facilitar la exposición de sus resultados, se confeccionó con los niveles de catepsina S salivar con el objetivo de establecer un punto de corte a partir del cual se considerara como positivo para carcinoma epidermoide faringolaríngeo. Se calculó para ello el Índice de Youden (0,41) y se estableció el punto de corte en unos niveles de actividad de catepsina S de **479,75** de intensidad de densidad óptica (iod).

Es de vital importancia comentar aquí que el área bajo la curva (AUC), parámetro que evalúa el rendimiento diagnóstico de una prueba, fue de **0,70**. Es a partir de este punto cuando muchos autores consideran que un test diagnóstico puede tener utilidad, aunque otros elevan este punto de corte hasta un AUC de 0,75 (237).

De este modo, estamos creando una prueba diagnóstica para carcinoma epidermoide faringolaríngeo, de tal modo que consideraremos positivo para cáncer unos niveles de actividad de catepsina S en saliva superiores a 479,75 de intensidad de densidad óptica, y negativo para cáncer unos niveles de actividad inferiores.

Este test diagnóstico tiene una sensibilidad del 63% y una especificidad del 78%, lo que aplicado a la población de nuestro estudio resulta en un valor predictivo positivo (VPP) del 87% y un valor predictivo negativo (VPN) del 48%.

Al analizar las características del nuevo test creado, llama la atención el alto valor predictivo positivo, lo que implica, en términos más sencillos, que si obtenemos un resultado positivo de catepsina S salivar (que hemos establecido en una actividad superior a 479,75 de iod), es altamente probable que nuestro paciente padezca un carcinoma epidermoide faringolaríngeo. Menos esclarecedor es un resultado negativo en la prueba, que solo podríamos considerar auténtico en la mitad de los casos, y acarrea un porcentaje alto de falsos negativos.

## 4.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON EL CARCINOMA FARINGOLARÍNCEO

A la hora de proceder a los análisis estadísticos para comprobar la validez de la extrapolación de estos resultados a la población general, se tuvieron las características epidemiológicas de los grupos casos y control, y se incluyeron en el análisis bivalente. De tal modo, se concluyó que existían diferencias estadísticamente significativas en la edad de los pacientes ( $p < 0,01$ ); en el sexo ( $p < 0,01$ ), debido a una proporción mayor de varones en el grupo de casos; en el hábito tabáquico ( $p < 0,01$ ), dado que la mayoría de los pacientes del grupo de casos son fumadores; y en la catepsina S salivar como test diagnóstico ( $p < 0,01$ ).

Las diferencias en edad, sexo y hábito tabáquico no son sorprendentes, teniendo en cuenta cómo se obtuvieron ambos grupos, pero deben considerarse porque pueden actuar como factores de confusión entre sí, y con la catepsina S salivar. Por ello se realizó el análisis multivariante, que arrojó unas odds ratio (OR) con intervalo de confianza al 95% (IC95%) de **0,9 (0,82-0,97)** con  $p = 0,01$  para la edad; de **16,9 (2,8-101,7)** con  $p < 0,01$  para el sexo; de **169,0 (11,1-2569,4)** con  $p = 0,02$  para el hábito tabáquico; y de **7,3 (1,2-44,6)** con  $p = 0,03$  para la catepsina S salivar como test diagnóstico.

Estos resultados confirman las diferencias entre ambos grupos en las variables estudiadas. Esto es importante debido a que existen estudios *in vitro* que hablan a favor de un incremento en la actividad de algunas catepsinas (B, D y L) por la mera exposición al humo del tabaco (206), y si esto fuera así, el tabaco podría haber constituido un factor de confusión en este análisis. Sin embargo, con los datos extraídos, podemos afirmar que un resultado positivo en la prueba de la catepsina S salivar se asocia de manera independiente con la presencia del carcinoma epidermoide faringolaríngeo.

No existe ningún estudio en la literatura que analice el papel de la catepsina S en el carcinoma epidermoide faringolaríngeo. Sin embargo, sí que sabemos que en otros cánceres como el gástrico, esta enzima juega un papel fundamental en la invasión local de los tejidos por el tumor, pues es capaz de degradar la matriz extracelular, modular la inflamación y la respuesta inmune (183). En los pacientes con este tipo de cáncer, así como en el cáncer colorrectal, se han demostrado concentraciones séricas elevadas, lo que lo hace un biomarcador de fácil acceso (184, 185). Por ello, resulta factible que la catepsina S juegue un papel parecido en el carcinoma epidermoide faringolaríngeo, y al pasar al suero sanguíneo, una parte de ella sea excretada a través de la saliva, donde puede detectarse de modo aún más sencillo y cómodo para los pacientes que en el suero.

Otro argumento a favor de este papel de la catepsina S en el cáncer faringolaríngeo es que se conocen otras proteínas de la superfamilia de las catepsinas que actúan del mismo modo, como la catepsina B, que favorece la proliferación, invasión y migración de las células del cáncer de laringe (205). Sin embargo, ningún autor ha demostrado concentraciones elevadas de catepsina B en el suero de estos pacientes, igual que no lo hemos demostrado en la saliva en este estudio.

Hay que recordar que otros autores sí que han demostrado aumentos de catepsina B en saliva, y establecido una prueba diagnóstica en base a ella (224), pero lo han hecho exclusivamente en casos de carcinoma de cavidad oral, donde la saliva está en íntimo contacto con el tumor; no así en ningún otro cáncer de cabeza y cuello.

Este comportamiento distinto de la catepsina B, más estudiada y con un papel en la carcinogénesis más asentado, con respecto a la S, puede deberse a una característica única de la catepsina S en su familia: su pH óptimo de actuación entre 5,5 y 6,5, mientras que el resto de las catepsinas actúan mejor en ambientes más ácidos (182). Esto facilita que resista mejor en su forma activa el paso al suero sanguíneo y a la saliva (cuyo pH es de entre 6 y 7 (207), y así se detecta en esos fluidos.

### 4.3 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO PARA CARCINOMA FARINGOLARÍNGEO

El carcinoma faringolaríngeo no posee en la actualidad ningún biomarcador diagnóstico de uso clínico, como ocurre con otras neoplasias como la mama, la próstata o las vías biliares. Su detección suele basarse en la exploración clínica realizada por el especialista en la consulta. Aunque el diagnóstico en sí no suele ser un problema para el otorrinolaringólogo, debido a la experiencia y los recursos que tiene disponibles, no se deben menospreciar las ventajas de disponer de un biomarcador para esta enfermedad.

Hay que tener en cuenta que los síntomas iniciales del carcinoma faringolaríngeo suelen ser valorados inicialmente por un médico de familia, que será el que decidirá si el cuadro clínico precisa la valoración por el especialista en ORL. Estos síntomas, como la disfonía o las parestesias faríngeas, pueden confundirse con frecuencia con patologías banales, y hacer que el cáncer pase desapercibido hasta etapas más avanzadas. El médico de familia no tiene medios endoscópicos para explorar la laringe y la hipofaringe, pero sí podría obtener una muestra de saliva del paciente para determinar la actividad de la catepsina S, y tener un argumento más a favor o en contra de derivar al paciente al especialista en ORL.

La sensibilidad de la prueba diagnóstica descrita (63%) no es lo suficientemente alta como para plantear un programa de cribado en la población general. Sin embargo, al tener un VPP del 87%, sí que podría estudiarse su empleo en aquellos grupos de pacientes en los que la prevalencia del cáncer faringolaríngeo es alta, como por ejemplo, los grandes fumadores. Incluso podría tratar de relacionarse con otros biomarcadores, de modo que conjuntamente se mejorase la exactitud de la prueba diagnóstica, como ocurre actualmente en cáncer gástrico con la combinación de la catepsina S sérica y los marcadores tradicionales CEA y CA-19,9 (184). Todo ello con la ventaja de la facilidad de obtención de la muestra en la saliva, que evita la venopunción al paciente.

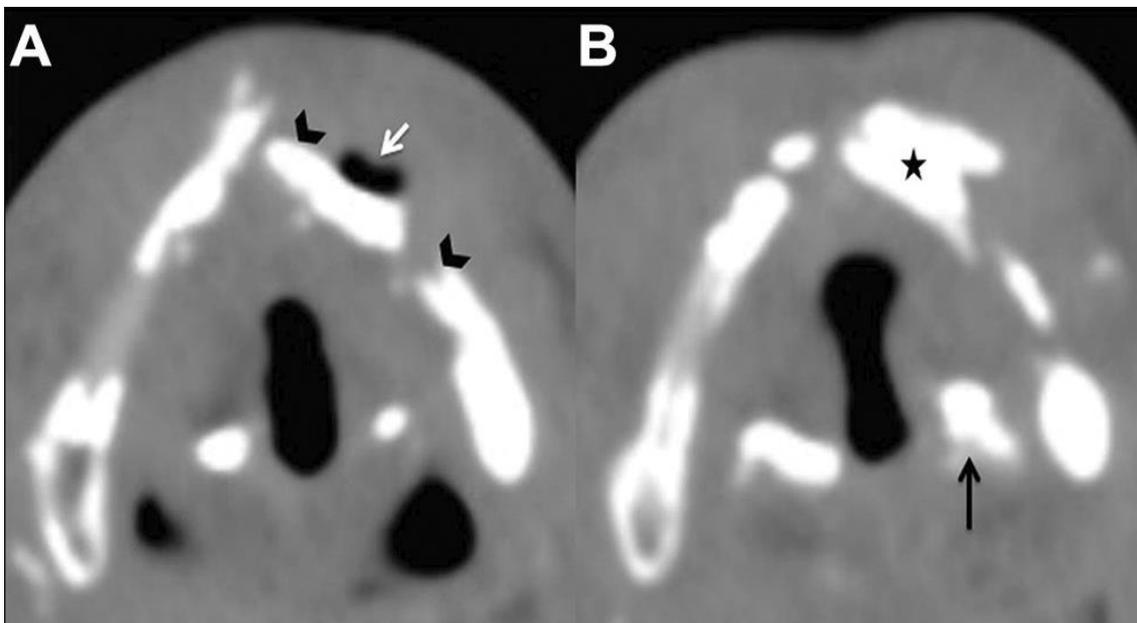
Pero un biomarcador diagnóstico también puede serle útil al propio otorrinolaringólogo, especialmente en la detección precoz de las recidivas de un paciente que ya ha sido tratado de un carcinoma faringolaríngeo. De hecho, uno de los principales usos de los biomarcadores en oncología es la monitorización de sus niveles con dicho objetivo. Aunque el diagnóstico inicial del carcinoma no suele ser un desafío para el especialista, puede ser muy complejo detectar una recidiva en pacientes con radioterapia. Los cambios provocados en la mucosa faringolaríngea tras un tratamiento intensivo con radioterapia o quimiorradioterapia dificultan la exploración otorrinolaringológica y hacen que se dependa mucho más de pruebas

complementarias como la TC o la RM. Incluso en ellas, muchas veces no es posible distinguir entre lesiones tumorales o cambios postratamiento, más aún si tenemos en cuenta las lesiones por radionecrosis. En la Figura 38 pueden visualizarse unas imágenes de TC de un paciente con antecedente de carcinoma laríngeo tratado con radioterapia. La destrucción y la esclerosis del cartílago tiroides serían altamente sugerentes de una recidiva del carcinoma, pero se trataba de una radionecrosis (238).

FIGURA 38

*Imágenes de TC que muestran destrucción del cartílago tiroides.*

*Cheng S. et al. (2019). Computed tomography demonstrated fragmentation and collapsed of the thyroid cartilage (arrow head) with gas bubble (arrow) infiltrating surrounding soft tissue. B, There was irregular sclerosis of fragmented thyroid cartilage (asterisk) and arytenoid cartilage (arrow). [Figura] Recuperado de: Cheng, S.-Y., Chen, P.-J., & Chu, Y.-H. (2019). Delayed Radionecrosis of the Larynx. Ear, Nose & Throat Journal, 98(1), 23–24. <https://doi.org/10.1177/0145561319825739>*



En estos pacientes, una monitorización de los niveles de catepsina S desde el momento del diagnóstico inicial podría ser muy útil. Su elevación ante los hallazgos visualizados en la Figura 38 darían fuerza a la posibilidad de una recidiva del tumor; mientras unos valores que se mantuvieran negativos apoyarían la radionecrosis.

No obstante, es indudable que se necesitan más investigaciones para analizar el comportamiento de la catepsina S ante las recidivas tumorales, y también la posible influencia de la radioterapia sobre los biomarcadores salivares.

## 5. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

### 5.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST PREDICTIVO DE LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

Otro uso que pueden tener los biomarcadores es como marcadores predictivos de ciertas características del proceso oncológico útiles para el manejo clínico de los pacientes.

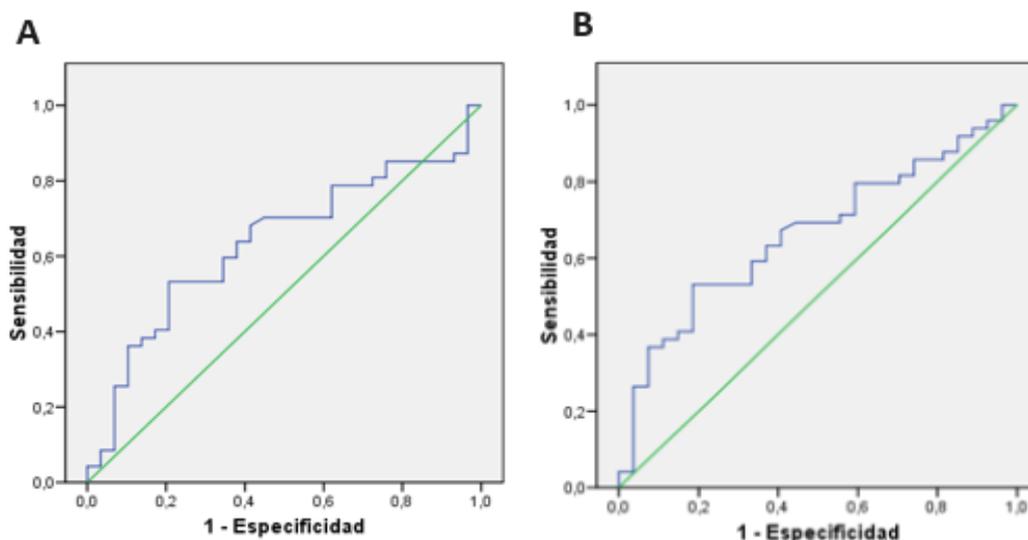
De ellos, la extensión del tumor primario es una de las variables más importantes ya que condiciona el tratamiento que se llevará a cabo y tiene un impacto pronóstico. No suele determinarse mediante el tamaño del tumor primario, sino atendiendo al apartado “T” del sistema de clasificación TNM. Aunque este guarda cierta correlación con el citado tamaño tumoral en los casos de la hipofaringe y la orofaringe, no así en la laringe (39), por lo que no es sinónimo hablar de extensión del tumor y de volumen tumoral. No obstante, es indudable que, a mayor cantidad de células tumorales, más probabilidad de una extensión avanzada del proceso oncológico. Por tanto, es más probable que las proteínas del microambiente tumoral, ya sean aquellas que produce el propio cáncer, o las derivadas del daño a los tejidos o de la respuesta inmune frente al tumor; estén presentes en concentraciones mayores.

A la hora de hablar del T de un tumor, siempre existen dos versiones. En primer lugar, aquel que se determina mediante la exploración clínica y las pruebas complementarias, a la que se denomina T clínica (cT); y el que resulta del análisis anatomopatológico de la pieza extirpada, a la que se denomina T anatomopatológica (pT) (39). Es evidente que la pT refleja mejor la extensión real del tumor, pero solo puede obtenerse tras su extirpación completa, y por tanto, muchas veces es preciso el uso de la cT para las decisiones que se toman en el tratamiento de los pacientes, al menos hasta que se dispone de toda la información.

Aunque según la 8a edición de la AJCC, manual utilizado para estadificar los tumores en nuestro estudio, la T puede adquirir 4 valores diferentes (T1, T2, T3 y T4), con subclasificaciones en algunos, para este estudio se agrupan en dos categorías: T inicial (T1 y T2) y T avanzado (T3 y T4). Generalmente, los tumores T1 o T2 suelen corresponder a tumores pequeños, que se han detectado de forma temprana, y con mucha frecuencia son subsidiarios de tratamientos en monoterapia y con pocas secuelas. Por el contrario, los tumores T3 o T4 son tumores más voluminosos y que suelen requerir tratamientos más agresivos con alta probabilidad de secuelas.

Gráfico 19.

Curvas ROC para T inicial/avanzado con los niveles de catepsina S salivar. A: con la variable T clínica. B: con la variable T anatomopatológica



De este modo, se diseñaron curvas ROC para T Inicial/Avanzado con los niveles de catepsina salivar. El Gráfico 19 muestra ambas curvas, que tuvieron la misma área bajo la curva: **0,64**. El índice de Youden calculado fue muy similar, y arrojó el mismo punto de corte para ambos casos: **826,05** de iod. De este modo, las nuevas pruebas diagnósticas creadas determinan unos niveles de actividad de catepsina S salivar por encima de 826,05 como correspondientes a un tumor primario avanzado, y unos niveles por debajo, a un tumor primario inicial.

Tabla 42.

Valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de los dos test diagnóstico creados en base a las curvas ROC

VARIABLE	s	e	VPP	VPN
cT	54%	74%	71%	58%
pT	51%	76%	72%	56%

Nota. s = sensibilidad. e = especificidad. VPP = valor predictivo positivo. VPN = valor predictivo negativo.

La Tabla 42 muestra las características de las dos pruebas creadas. Ambos test se analizan conjuntamente porque existen muy pocas diferencias entre ambos, porque en solo 2 pacientes la extensión del tumor primario se estadificó erróneamente en el estudio preoperatorio del tumor, y se vio modificada tras el análisis histopatológico de la pieza quirúrgica.

Hay que destacar, al igual que en la prueba creada en el apartado anterior para diagnóstico de carcinoma epidermoide faringolaríngeo, al valor predictivo positivo como principal virtud, aunque se queda en unos niveles inferiores, del 71-72%. Esto significa que, si obtenemos un resultado de actividad de catepsina S en saliva superior a 826,05 iod, tenemos un 71% de posibilidades de que el tumor tenga una cT avanzada, y un 72% de posibilidades de que corresponda a una pT avanzada. El valor predictivo negativo resultante es más discreto, e implica que un resultado negativo en el test solo tiene un 56-58% de posibilidades de corresponder a una T inicial.

## 5.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

Analizar la relación entre los niveles de catepsina S salivar según la nueva prueba creada, y la extensión del tumor primario implica la creación de dos grupos según esta última variable: los iniciales y los avanzados, con la T clínica y con la patológica. Se compararon ambos grupos en función de todas las variables epidemiológicas y clínicas que se consideraron de relevancia.

Epidemiológicamente, ambos grupos eran muy homogéneos. En primer lugar, en cuanto al tamaño de ambos: 35 tumores con cT inicial vs 41 tumores con cT avanzada; y 33 tumores con pT inicial vs 41 tumores con pT avanzada. Hay que destacar que en 2 pacientes no se pudo establecer el T anatomopatológico dado que no fueron sometidos a exéresis quirúrgica de su tumor.

### 5.2.1 Análisis en función en la cT

Centrándonos en la comparación entre grupos empleando la cT, estos no presentan diferencias estadísticamente significativas en la edad de sus miembros ( $p=0,54$ ); en sexo ( $p=0,62$ ); ni en hábito tabáquico empleando el número de paquetes-año ( $p=0,62$ ), por lo que epidemiológicamente son grupos similares. Tampoco presentaban diferencias en cuanto a la localización del tumor: glotis ( $p=0,90$ ), supraglotis ( $p=0,95$ ), subglotis ( $p=0,50$ ) e hipofaringe ( $p=0,70$ ) no se encuentran más representados en uno de los grupos respecto al otro. En cuanto a los síntomas, ninguno se asociaba con un grupo en concreto a excepción de la disnea ( $p<0,01$ ) y la otalgia ( $p<0,01$ ), con diferencias significativas a favor del grupo de T avanzada, algo que no resulta sorprendente ya que son síntomas propios de tumores localmente extendidos. También había diferencias significativas en los meses desde el inicio de los síntomas ( $p<0,05$ ). Por último, apareció una asociación estadísticamente significativa con la actividad de la catepsina S salivar ( $p=0,02$ ).

Todas las variables citadas pierden su significación estadística tras la realización del análisis multivariante, a excepción de la catepsina S salivar, que posee una OR con

IC95% de **3,6 (1,2-10,8)** con  $p=0,02$ , y puede por tanto relacionarse de manera independiente con una cT avanzada.

### 5.2.2 Análisis en función en la pT

Realizando este mismo análisis con la pT, los grupos resultantes fueron homogéneos en cuanto a edad ( $p=0,80$ ), sexo ( $p=0,62$ ), paquetes-año ( $p=0,32$ ) y localización tumoral ( $p=0,70$  para la glotis,  $p=0,48$  para la supraglotis,  $p=1$  para la subglotis, y  $p=1$  para la hipofaringe). Los síntomas, en cambio, presentaron diferencias estadísticamente significativas para la disfagia ( $p<0,01$ ), la disfonía ( $p<0,01$ ), la disnea ( $p<0,01$ ) y la otalgia ( $p<0,01$ ). La catepsina S salivar también mostró asociación estadística con la pT, con una  $p=0,01$ .

Destaca aquí la aparición de la disfagia y la disfonía asociados a una pT avanzada, cuando no lo estaban a la cT (aunque quedaban muy cercanos a la significación estadística, con una  $p=0,06$ ). Está claro que la dificultad para la deglución estará más presente en un tumor voluminoso, o que se extienda a varias áreas circundantes; respecto a uno más localizado. En cuanto a la disfonía, suele estar ausente en la mayoría de los tumores iniciales salvo en los de glotis; pero aparece casi de manera constante en los tumores localmente avanzados, ya sea por extensión directa a la glotis o por alteración del nervio recurrential.

Sin embargo, los resultados en relación con los síntomas no son muy relevantes dado que pierden su significación estadística con el análisis multivariante ( $p=0,99$  para todos ellos). La única variable que se relaciona con la T del tumor una vez suprimidos los factores de confusión es nuevamente la catepsina S salivar con una OR e IC95% de **5,7 (1,5-25,9)** con  $p=0,02$ .

### 5.3 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA CATEPSINA S COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA EXTENSIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

Se puede concluir que una actividad de catepsina S en saliva superior a 826,05 se asocia a una extensión mayor del tumor primario. Estos datos concuerdan con los obtenidos en la saliva de pacientes afectados de carcinoma oral, en los que unos niveles elevados de catepsina B se asociaron con una cT avanzada (224). Hay que destacar que no es la misma catepsina que la estudiada por nosotros, y que se trataban de estudios de cuantificación de proteína, no de actividad enzimática.

La extensión del tumor primario es un dato que suele obtenerse sin demasiada dificultad de la exploración física y las pruebas complementarias. No obstante, hay determinadas situaciones concretas en las que un biomarcador que predijera una T avanzada podría ser útil.

Los tumores de la comisura anterior y los tumores que se extienden hacia el ventrículo laríngeo son dos casos especiales en los que el diagnóstico clínico mediante endoscopia laríngea puede infraestimar la gravedad de la situación, ya que al ojo del otorrinolaringólogo pueden simular pequeñas lesiones mucosas localizadas, cuando en realidad están escondiendo un tumor de un tamaño considerable en el espacio prelaríngeo (atravesando el cartílago tiroideo a nivel de la comisura) o en el ventrículo laríngeo. Una TC o RM de laringe visualizaría por completo el tumor, pero generalmente en la práctica clínica no se solicitan pruebas de imagen hasta que se ha realizado la toma de biopsia en el quirófano y se ha confirmado que se trata de un carcinoma epidermoide. En este contexto, unos niveles de actividad de catepsina S salivar elevados podría ayudar al especialista a sospechar que una lesión aparentemente pequeña pueda ocultar una enfermedad más extendida y grave.

Además, dada la relación hallada entre catepsina S salivar y tumores primarios avanzados, podría plantearse la posibilidad de que también existieran diferencias entre las lesiones laríngeas benignas, las lesiones precancerosas y el carcinoma. No obstante, se necesitan investigaciones adicionales que amplíen nuestro estudio. La presencia de concentraciones diferentes de metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) entre pacientes sanos, con lesiones premalignas orales y con cáncer oral (220), es otro dato a favor de que no sería imposible un comportamiento similar con las catepsinas y el carcinoma faringolaríngeo.

## 6. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LAS METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES

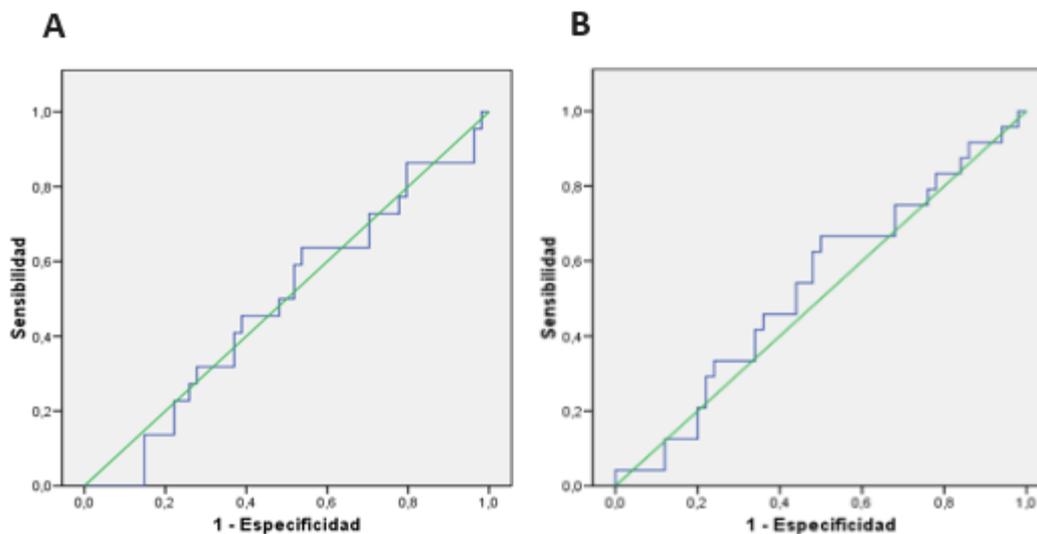
### 6.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST PREDICTIVO DE LAS METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES

Las metástasis ganglionares cervicales son otros de los factores pronósticos más importantes, y resulta fundamental su estudio para determinar el tratamiento más adecuado. El estadiaje mediante la N del sistema TNM otorga múltiples categorías en función del número, tamaño y localización de las adenopatías patológicas, pero en el presente estudio se han agrupado en dos categorías (N positiva y N negativa), dado que el objetivo es obtener un marcador predictivo para la presencia de metástasis ganglionares.

Nuevamente, dispondremos de los datos referentes a la N clínica, aquella que se basa en la exploración clínica y las pruebas complementarias; y la N anatomopatológica, basada en el análisis histopatológico de los ganglios extirpados durante el vaciamiento cervical.

*Gráfico 20.*

*Curvas ROC para N Negativo/Positivo con los niveles de catepsina S salivar. A: con la variable N clínica. B: con la variable N anatomopatológica*



Se muestra una comparación de ambas curvas ROC en el Gráfico 20. Lo primero que llama la atención, respecto al resto de curvas ROC presentadas hasta ahora, es la práctica superposición de la curva respecto a la línea diagonal (denominada línea de

no-discriminación), con unas áreas bajo la curva de 0,49 para la N clínica y de 0,53 para la N anatomopatológica.

El índice de Youden resultante fue similar para ambas curvas, y arrojó el mismo punto de corte para ambas pruebas diagnósticas: una actividad de catepsina S salivar por encima de **594,7** de iod se considera positivo para metástasis ganglionar cervical, y una actividad por debajo de ese valor se considera negativo.

*Tabla 43.*

*Valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de los dos test diagnóstico creados en base a las curvas ROC*

<b>VARIABLE</b>	<b>s</b>	<b>e</b>	<b>VPP</b>	<b>VPN</b>
<b>cN</b>	63%	46%	32%	75%
<b>pN</b>	67%	50%	39%	75%

Unas áreas bajo la curva tan próximas a 0,5 delatan a un test con muy poca capacidad de discriminación, cercana a la del azar. Esto se traduce en los pobres parámetros obtenidos, que pueden verse en la Tabla 43. El VPP de menos del 40% traduce la escasa probabilidad de que un resultado positivo de un paciente corresponda realmente a un tumor con metástasis ganglionares cervicales.

No obstante, sí que llama la atención el VPN del 75% que caracteriza a ambas pruebas. Ello implica una no desdeñable posibilidad de que un resultado negativo se ajuste un paciente sin metástasis ganglionar cervical, pero como ya hemos comentado, estos datos deben tomarse con cuidado dada la escasa capacidad de discriminación que han arrojado estos dos test.

## 6.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON LAS METÁSTASIS GANGLIONARES CERVICALES

Los pacientes con metástasis ganglionares cervicales de nuestra muestra eran marcadamente inferiores a aquellos sin adenopatías patológicas, concretamente suponen 22 con N positiva respecto a 54 con N negativa, si atendemos a la N clínica; y 24 positivos respecto a 50 negativos, si atendemos a la N anatomopatológica. Recordemos que existen dos pacientes que no pudieron ser sometidos a extirpación quirúrgica de su tumor, por lo que no pudieron ser incluidos en el análisis de la N anatomopatológica. Además, otros dos pacientes pasaron de negativo a positivo tras el análisis histopatológico del vaciamiento cervical, es decir, que se trataban de metástasis cervicales ocultas.

### 6.2.1 Análisis en función de la cN

En cuanto al resto de variables epidemiológicas y clínicas, en el análisis bivalente entre grupos basados en la cN, no hubo diferencias significativas en la edad de los pacientes ( $p=0,46$ ), ni en el sexo ( $p=0,32$ ). Sin embargo, destaca la relación entre un mayor número de paquetes-año y la presencia de metástasis ganglionares cervicales ( $p=0,05$ ). Dado que el número de paquetes-año hace referencia tanto a la cantidad de cigarrillos fumados diarios, como a la cantidad de años fumando, es posible que estos grandes fumadores menospreciaran los síntomas iniciales del proceso tumoral y eso les hiciera consultar más tarde, cuando el tumor ya había causado las metástasis. También es posible que la mayor exposición al carcinógeno genere tumores más agresivos, con mayor capacidad de diseminación adenopática.

En cuanto a la localización tumoral, hubo diferencias significativas en la glotis, que era más común en los pacientes sin metástasis ganglionar ( $p<0,01$ ); y en la supraglotis, más abundante en pacientes con metástasis ganglionar ( $p<0,01$ ). La subglotis ( $p=1$ ) y la hipofaringe ( $p=0,40$ ) no mostraban diferencias entre los grupos. Estos datos son fáciles de explicar, ya que es ampliamente conocido el escaso drenaje linfático de la glotis, y la amplia tendencia a la diseminación linfática de los tumores de supraglotis (37). De hecho, se relaciona con la relación que se halló entre la presencia de disfonía y la ausencia de metástasis ganglionares cervicales, que con toda probabilidad se debe al mayor número de tumores de glotis en el grupo cN negativa.

Por último, la actividad de la catepsina S salivar no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p=0,43$ ).

Las 4 variables con significación estadística en el análisis bivalente (paquetes-año, localización glótica, localización supraglótica y disfonía) perdieron esta condición al ser sometidas al análisis multivariante, por lo que no se puede concluir una relación entre las metástasis ganglionares cervicales y ninguna de ellas de manera independiente.

### 6.2.2 Análisis en función de la pN

Los grupos creados en función de la pN resultaron homogéneos en cuanto a edad ( $p=0,95$ ), sexo ( $p=0,74$ ), y también en cuanto al número de paquetes-año ( $p=0,50$ ). Esto contrasta con el análisis anterior, basado en la cN, donde se encontraba relación entre la severidad del hábito tabáquico y la presencia de metástasis ganglionares cervicales. Dado que la pN es un parámetro que refleja mejor la extensión real del tumor, hay que ser prudente a la hora de afirmar que un mayor consumo de tabaco puede favorecer tumores con más adenopatías metastásicas. Hay autores que sí hallan relación entre la agresividad tumoral y el tabaco, comparándolos con pacientes no fumadores en cáncer oral (239), pero no hay datos en la literatura que relacionen un mayor hábito tabáquico con una mayor agresividad tumoral en pacientes fumadores.

La localización tumoral volvió a mostrar diferencias a favor de la localización glótica en el grupo sin metástasis ( $p < 0,01$ ), y a favor de la localización supraglótica en el grupo con metástasis ganglionares ( $p < 0,01$ ), por los motivos antes mencionados. En cuanto a los síntomas el único que aparece asociado con una pN positiva es la presencia de parestesias faríngeas. Aunque se trata de un síntoma muy inespecífico, que en ocasiones puede ser llegar a ser difícil de definir incluso por los propios pacientes, suele estar presente en los tumores de supraglotis o de hipofaringe, donde la disfonía no domina la clínica hasta etapas avanzadas. Estos tumores tienen mayor capacidad de diseminación linfática que la glotis, incluso con tumores primarios pequeños, lo que puede explicar la mayor aparición de este síntoma en el grupo de pacientes con pN positiva.

La actividad de la catepsina S salivar, al igual que ocurría al analizarla en función de la cN, no mostró diferencias significativas (0,18), por lo que no se puede hablar de una mayor actividad de la enzima en los pacientes con metástasis ganglionar cervical.

Por último, en el análisis multivariante, la localización glótica se reveló como un factor protector para la presencia de metástasis ganglionares cervicales, ya que presenta una OR con IC95% de **0,2 (0,5-0,9)** con  $p < 0,05$ . No era así en el análisis en función de la cN, pero como ya hemos comentado, la pN es un parámetro que plasma mejor la extensión del proceso oncológico.

### 6.3 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE METÁSTASIS GANGLIONARES

Un marcador predictivo de metástasis ganglionares cervicales en el carcinoma faringolaríngeo tendría gran utilidad en los pacientes cN0, ya que, como hemos comentado en otros apartados, actualmente existen dos opciones: la vigilancia estrecha del cuello (57); o la realización del vaciamiento cervical de manera electiva (56). De este modo, la elevación del biomarcador podría llevarnos a decantarnos por la realización del vaciamiento cervical; y un resultado negativo favorecería la vigilancia estrecha del cuello.

Existen algunos indicios de que las catepsinas podrían tener ese papel predictor. Por ejemplo, los análisis de catepsina D en tejido tumoral de cabeza y cuello se mostraron como un factor de riesgo independiente para la presencia de metástasis ganglionar (195). También la catepsina L en tejido ha sido correlacionada del mismo modo (201).

Sin embargo, los resultados obtenidos con la catepsina S salivar no permiten su uso en este sentido, debido a la escasa capacidad de discriminación del test creado y a la imposibilidad de relacionar la actividad de la proteasa con la presencia de metástasis ganglionares cervicales.

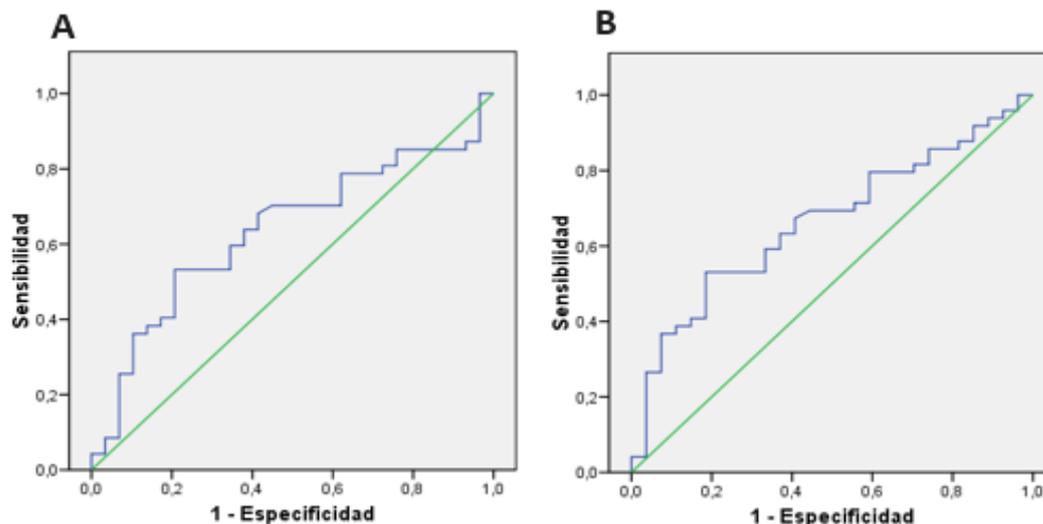
## 7. LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DEL ESTADIO TUMORAL

### 7.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST PREDICTIVO DEL ESTADIO TUMORAL

El estadio tumoral es uno de los parámetros que más se analizan en los estudios oncológicos, y es debido a su elevado impacto en el pronóstico de los pacientes. Se construye en base a los valores del sistema de estadificación TNM, y al igual que en cada uno de los constructos que lo forman, existe un estadio clínico y un estadio anatomopatológico. Los seis diferentes estadios se agruparon en una sola variable con dos posibles valores: estadio inicial (para los estadios I y II) y estadio avanzado (para los estadios III, IVA, IVB y IVC).

Gráfico 21.

Curvas ROC para N Negativo/Positivo con los niveles de catepsina S salivar. A: con la variable estadio clínico. B: con la variable estadio anatomopatológico



Para su análisis, se construyeron las curvas ROC del mismo modo que en apartados anteriores, y que pueden verse juntas en el Gráfico 21. Las áreas bajo la curva resultantes fueron de 0,63 al emplear el estadio clínico, y de 0,66 al emplear el estadio anatomopatológico. Los índices de Youden revelaron el mismo punto de corte para ambos test: unos niveles de actividad de catepsina S salivar de **826,05 iod**. Por tanto, una actividad de catepsina S salivar por encima de 826,05 corresponde con un tumor en estadio inicial; y una actividad por debajo, a un tumor en estadio avanzado.

Tabla 44.

Valores de sensibilidad, especificidad, y valores predictivos de los dos test diagnóstico creados en base a las curvas ROC

VARIABLE	s	e	VPP	VPN
<b>Estadio Clínico</b>	53%	79%	81%	51%
<b>Estadio Anatomico- Patológico</b>	53%	82%	84%	49%

Llama la atención en alto valor predictivo positivo de los test creados, que en el caso del basado en el estadio anatomopatológico, alcanza un 84%, y hace que un número importante de los resultados positivos que obtengamos al aplicar el test se correspondan realmente a un paciente con estadio tumoral avanzado. Menos conclusiones se pueden sacar ante un resultado negativo, ya que solo la mitad de ellos van a producirse en pacientes sanos.

## 7.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON EL ESTADIO TUMORAL

La distribución por grupos en función del estadio resultaba en una notable mayoría para los estadios avanzados: 29 iniciales vs 47 avanzados en función del estadio clínico; y 27 iniciales vs 47 avanzados en función del estadio anatomopatológico.

### 7.2.1 Análisis en función del estadio clínico

Los dos grupos se mostraron homogéneos en sus características epidemiológicas, ya que no existían diferencias en la edad ( $p=0,67$ ), sexo ( $p=1$ ) ni número de paquetes-año ( $p=0,47$ ). Tampoco era diferente la proporción de las distintas localizaciones tumorales: localización glótica ( $p=0,13$ ), localización supraglótica ( $p=0,21$ ), localización subglótica ( $p=0,52$ ), y localización hipofaríngea ( $p=1$ ). Sin embargo, sí que existieron diferencias a favor del estadio tumoral avanzado para la presencia de los síntomas de disnea ( $p=0,02$ ) y de otalgia ( $p=0,02$ ).

Estos datos concuerdan con los obtenidos durante el análisis de la extensión del tumor primario, en los que tampoco una localización tumoral se mostró más frecuente en grupo respecto a otro; y en los que también la disnea y la otalgia se mostraron asociados a un tumor más extendido. La disnea es debida a un compromiso de la vía aérea superior, y es preciso generalmente un tumor con un grado de extensión importante para ocasionarla, aunque no es imposible que un tumor glótico pequeño pero extendido hacia ambas cuerdas vocales pueda ocasionar cierto grado de disnea. La otalgia, por su parte, en su síntoma casi constante a partir de cierta extensión

tumoral, pero también puede hallarse en tumores pequeños de ciertas localizaciones concretas como la base lingual o la hipofaringe. Sorprende que otros síntomas como la odinofagia o la disfagia no aparezcan relacionados con un estadio tumoral avanzado, ya que también suelen depender de la extensión del cáncer, pero en nuestro estudio no alcanzan la significación estadística ( $p=0,15$  para la odinofagia, y  $p=0,43$  para la disfagia).

Por último, la actividad de catepsina S salivar por encima de 826,05 sí que se relaciona claramente con estadios avanzados de la enfermedad ( $p<0,01$ ).

El análisis multivariante posterior eliminó a la disnea y a la otalgia como factores asociados de manera independiente con el estadio tumoral, probablemente el efecto como factor de confusión que puede estar ejerciendo la localización tumoral. No obstante, se confirmó que la actividad de catepsina S salivar es un factor de riesgo independiente para un estadio clínico avanzado, ya que presentó una OR con IC95% de **4,6 (1,5-14,7)** con  $p<0,01$ .

#### 7.2.2 Análisis en función del estadio anatomopatológico

El estadio anatomopatológico es en realidad el más fiable, ya que el margen de error de los estudios histopatológicos es mucho menor que el de los estudios clínicos. Los dos grupos creados se mostraban igualmente homogéneos en sus características demográficas, al no haber diferencias en edad ( $p=0,74$ ), sexo ( $p=1$ ) ni paquetes-año (0,35). La localización tumoral vuelve a no ser un factor asociado, aunque hay que destacar que la localización glótica, con una  $p=0,10$ , se acerca a la significación estadística a favor de los tumores en estadio inicial.

Respecto a los síntomas, vuelve a haber diferencias significativas a favor del estadio tumoral avanzado la disnea y la otalgia ( $p=0,05$  para ambas), pero se añade a ellas la disfagia ( $p=0,02$ ). Como decíamos al analizar el estadio clínico, para que un tumor ocasione disfagia debe tener un volumen que ejerza el suficiente efecto masa o afectar a la inervación motora de la faringe, ambas cosas propias de estadios avanzados. Son resultados similares a los obtenidos al analizar la pT del tumor.

Por su parte, una actividad de catepsina S por encima del punto de corte creado (826,05) volvió a asociarse con los estadios avanzados de la enfermedad ( $p<0,01$ ).

El análisis multivariante vuelve a resultar no significativo para la disnea y la otalgia, pero la disfagia se mantiene como factor de riesgo independiente para un estadio anatomopatológico avanzado, con una OR con IC95% de **5,3 (1,2-22,4)** con  $p=0,03$ .

Finalmente, la actividad de catepsina S salivar mantuvo su significancia estadística merced a su OR con IC95% de **4,8 (1,4-16,6)** con  $p < 0,01$ , con lo que se yergue como factor de riesgo independiente para un estadio anatomopatológico avanzado. Este comportamiento de la catepsina S es similar al obtenido, por ejemplo, en cáncer colorrectal, donde sus niveles séricos se han asociado con estadios avanzados de la enfermedad (185).

### 7.3 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DEL ESTADIO TUMORAL

Como ocurría al hablar de la T del proceso oncológico, el estadiaje tumoral no suele ser complicado de obtener en base al sistema TNM. Sin embargo, un biomarcador que predijera un estadio tumoral avanzado podría ser útil para los especialistas que tratan al paciente de diversas formas.

En primer lugar, el cáncer de cabeza y cuello suele estadificarse en función de la T y la N, pero no se suelen realizar estudios en busca de las metástasis a distancia, dado el bajo porcentaje de ellas. Sin embargo, sabemos que hay ciertas localizaciones como los tumores bajos de hipofaringe donde son más probables. En este contexto, unos valores elevados del biomarcador podrían decantarnos por ampliar el estudio de extensión, aunque estemos ante un tumor con una T y una N propias de estadios iniciales.

Pero sin duda, la mayor importancia de un biomarcador de estadio tumoral avanzado es su potencial pronóstico. El estadio tumoral es uno de los principales aspectos que va a marcar el pronóstico de los pacientes (se diseñó, de hecho, con ese propósito). Ya hay estudios que han conseguido otorgar importancia pronóstica a algunas catepsinas, como por ejemplo, la catepsina K en el tejido de tumores de glándulas salivares mayores, cuyos niveles elevados se asocian a peor supervivencia libre de enfermedad (177). Y también la catepsina L elevada en tejido de cáncer oral se ha relacionado con peor supervivencia global (201). Sin embargo, se trata de marcadores en tejido tumoral, más complicados de obtener que la muestra de saliva que proponemos en nuestro estudio. No obstante, para afirmar que la actividad de catepsina S salivar constituye un marcador pronóstico son necesarios nuevos experimentos con ese objetivo.

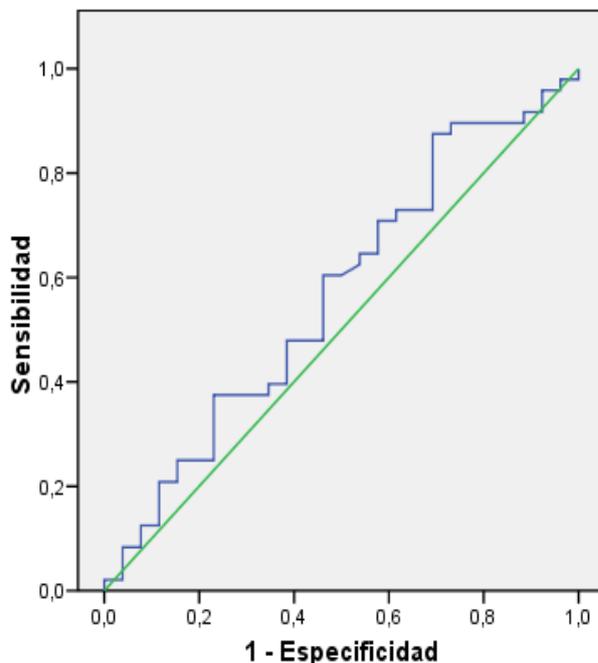
## 8. LA CATEPSINA S COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

La cirugía para el tratamiento del carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, especialmente procedimientos extensos como la laringectomía total, está asociada con un riesgo significativo de complicaciones postquirúrgicas. Estas complicaciones pueden variar desde problemas menores hasta condiciones que amenazan la vida del paciente, afectando significativamente su recuperación y calidad de vida.

### 8.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST PREDICTIVO DE LA APARICIÓN DE COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

Gráfico 22.

Curva ROC para complicaciones postquirúrgicas Sí/No



Un biomarcador que detectara a los pacientes más vulnerables de sufrir estas complicaciones antes de que tenga lugar tendría una gran importancia. Para evaluar el potencial de la catepsina S salivar en dicho aspecto, se diseñó una curva ROC (que puede visualizarse en el Gráfico 22). El área bajo la curva fue de 0,69. Se calculó el índice de Youden y se estableció el punto de corte en una actividad de catepsina S salivar de **899,60**. De este modo, valores por encima se considerarían pacientes candidatos a sufrir una tasa de complicaciones postoperatorias mayor; y unos valores por debajo agruparían a los pacientes sin este riesgo añadido.

El nuevo test predictivo así creado posee una sensibilidad del 38%, una especificidad del 77%, un valor predictivo positivo del 25% y un valor predictivo negativo del 60%. Las mayores virtudes de este test, aunque no alcanzan unos valores satisfactorios, son una especificidad media-alta y un valor predictivo negativo moderado.

Se puede afirmar que un resultado negativo en el test tiene una probabilidad moderada de corresponder a un paciente sin alto riesgo de complicaciones. Dado que es bastante factible que un paciente sin riesgo aumentado de complicaciones de negativo en el test ( $e=77\%$ ), esta prueba podría tener cierto valor precisamente

cuando un paciente diese negativo en ella, para descartar una mayor tasa de complicaciones. Por su parte, un valor positivo en el test no aporta información que pueda ser tenida en cuenta, debido a los bajos valores de sensibilidad y VPP.

## 8.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON LAS COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS

Se crearon dos grupos en función de la presencia de complicaciones para analizar la relación entre ellos de la catepsina S salivar, y del resto de variables que pudieran estar involucradas. Se incluyeron aquí varias variables nuevas como la necesidad de gastrostomía, la estancia hospitalaria o el grado de diferenciación tumoral, que podrían tener relevancia clínica en un contexto de análisis de complicaciones postquirúrgicas.

El grupo con complicaciones postquirúrgicas constaba de 26 pacientes, frente a los 48 del grupo sin complicaciones. Epidemiológicamente, eran grupos sin diferencias en cuanto a la edad ( $p=0,83$ ), sexo ( $p=0,61$ ) ni paquetes-año ( $p=0,64$ ). Tampoco existían diferencias en la localización tumoral, ni en el grado de diferenciación tumoral.

Sin embargo, al comparar ambos grupos en función del estadiaje de los tumores, obtuvimos diferencias significativas en cuanto a la extensión del tumor primario (tanto con la cT, con una  $p=0,04$ ; como con la pT, con una  $p<0,01$ ) y también en cuanto al estadio tumoral (tanto el estadio clínico, con una  $p=0,04$ ; tanto el estadio anatomopatológico, con una  $p<0,01$ ). Las diferencias siempre asocian la presencia de complicaciones con una T o un estadio avanzados, lo que es fácil de comprender debido a que los tumores más extendidos suelen requerir cirugías más largas y complejas, donde es más probable que se produzcan complicaciones.

De hecho, otra de las variables que se asocia a las complicaciones es, precisamente, el tipo de cirugía realizada, con una  $p<0,01$ . Esto se debe al análisis conjunto de un procedimiento como la microcirugía transoral láser, donde no se registraron complicaciones; y otras intervenciones más difíciles como las laringectomías parcial o total.

La estancia hospitalaria de los pacientes también se vio claramente incrementada en el grupo con complicaciones ( $p<0,01$ ), así como la necesidad de gastrostomía para la alimentación ( $p<0,01$ ). Son datos esperables debido a ambos factores son consecuencia directa de complicaciones como la infección, la disfagia o la fístula salival, que obligan a permanecer más tiempo hospitalizado al paciente hasta que se resuelvan, y puede comprometer la alimentación oral, obligando a insertar una sonda de gastrostomía.

Otros factores como la rotura capsular de las adenopatías metastásicas ( $p=0,29$ ) o la necesidad de una traqueotomía previa ( $p=1$ ); no mostraron diferencias

significativas, aunque hay que señalar que solo existieron 3 pacientes en total con traqueotomía previa (uno en el grupo de pacientes complicados, y dos en el que no), con lo que no se pueden extraer demasiadas conclusiones al respecto.

Finalmente, en cuanto a la catepsina S salivar, unos valores por encima del punto de corte establecido en el test (899,60) no mostraron relación con la aparición de complicaciones ( $p=0,21$ ).

Muchas de las variables comentadas en este análisis se relacionan íntimamente entre sí, y esto se traduce en una pérdida de significación estadística en el análisis multivariante. El único factor de riesgo independiente para la aparición de complicaciones es la estancia hospitalaria, con una OR con IC95% de **1,2 (1,1-1,3)** con  $p<0,01$ . Sin embargo, es una información poco relevante dado que, como ya hemos dicho, este aumento de la estancia hospitalaria es consecuencia directa de la aparición de complicaciones.

Los datos extraídos del análisis no permiten relacionar los niveles de catepsina S salivar con la aparición de complicaciones postoperatorias, por lo que no se pueden extraer conclusiones para su aplicación práctica en ese sentido.

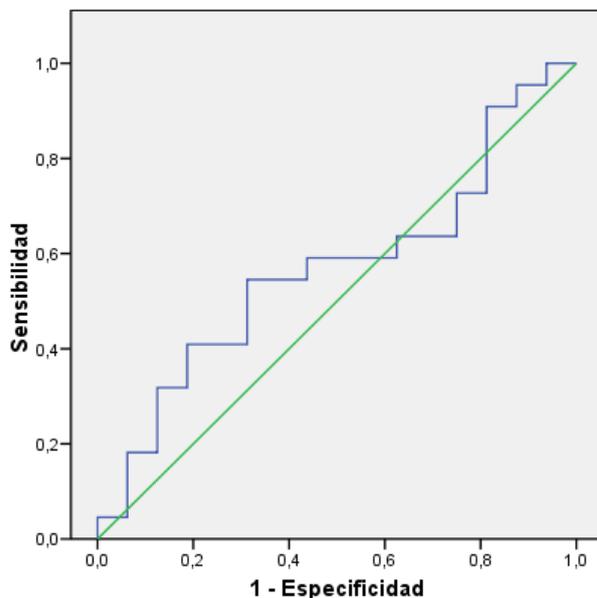
## 9. LA CATEPSINA S COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE LA APARICIÓN DE FÍSTULA SALIVAL TRAS LA LARINGECTOMÍA TOTAL

De todas las complicaciones existentes de las múltiples cirugías empleadas para tratar el cáncer de cabeza y cuello, la fístula salival faringocutánea tras la laringectomía total es una de las más estudiadas y sobre la que más se ha escrito, y pese a todo, continúa siendo una de las más habituales en la práctica clínica.

### 9.1 LA CATEPSINA S SALIVAR COMO TEST PREDICTIVO DE LA APARICIÓN DE FÍSTULA SALIVAL

Gráfico 23.

Curva ROC para fístula salival Sí/No



El Gráfico 23 muestra la curva ROC creada para evaluar la capacidad de la catepsina S salivar de detectar pacientes con alto riesgo de sufrir fístula salival. El área bajo de la curva fue de 0,59. Se calculó el índice de Youden y se estableció el punto de corte en una actividad de **866,2 iod**. Una actividad por encima de este valor marcaría a un paciente con alto riesgo de desarrollo de fístula salival; y un resultado por debajo, aquellos sin riesgo aumentado.

El nuevo test predictivo así creado posee una sensibilidad del 55%, una especificidad del 69%, un valor predictivo positivo del 52% y un valor predictivo negativo del 71%. Como ocurría con el test para predecir complicaciones postoperatorias globales, no se trata de un test muy robusto.

El VPN tiene la suficiente entidad como para considerar relevante un resultado negativo en el test, ya que más de dos tercios corresponden realmente a pacientes sin un riesgo aumentado de padecer una fístula salival en su postoperatorio. Los valores bajos de VPP y de sensibilidad no permiten otorgar demasiado valor a un resultado positivo en el test.

## 9.2 LA CATEPSINA S SALIVAR Y SU RELACIÓN CON LA FÍSTULA SALIVAL

El análisis en esta ocasión se limitó a los 38 pacientes que habían sido intervenidos de laringectomía total, y se formaron dos grupos: por un lado, los 16 que habían presentado fístula salival faringocutánea en su postoperatorio; y, por otro lado, los 22 que no la habían padecido.

Los dos grupos resultaron homogéneos en cuanto a la edad ( $p=0,77$ ), el sexo (0,37), y los paquetes-año ( $p=0,84$ ). No existían tampoco diferencias en cuanto a la localización tumoral, los síntomas ni el grado de diferenciación tumoral.

Analizando los estadios tumorales en ambos grupos, destacaba, al contrario que en el análisis de las complicaciones globales, la ausencia de diferencias entre extensión del tumor primario (cT con  $p=0,91$ ; y pT con  $p=0,75$ ); y el estadio tumoral (estadio clínico con  $p=0,62$  y estadio anatomopatológico con  $p=0,99$ ). Esto resulta lógico dado que estamos limitando el análisis a pacientes laringectomizados totales, y esta cirugía se indica la mayoría de las veces en tumores avanzados. De hecho, solo un paciente con pT inicial fue sometido a esta cirugía, y ninguno con un estadio anatomopatológico inicial.

Destaca, eso sí, las diferencias significativas que obtienen en cuanto a la pN ( $p=0,02$ ), con una relación inversa: una pN positiva se asocia a la presencia de fístula salival. Aunque la presencia de metástasis ganglionares cervicales no es un factor de riesgo asentado para el desarrollo de fístula salival, hay varios aspectos que podrían explicar la relación. En primer lugar, la presencia de adenopatías obliga a realizar un vaciamiento cervical (unilateral o bilateral, según cada caso) junto a la laringectomía total. Esto alarga el tiempo quirúrgico, lo que ya de por sí es un predictor independiente de complicaciones en cualquier intervención quirúrgica; y además, puede hacer que los cirujanos lleguen más cansados a la sutura de la neofaringe, que suele ser de los últimos pasos de esta cirugía, pero el más crucial de todos. Además, las metástasis ganglionares se asocian a tumores más extensos, que pueden involucrar a parte de la hipofaringe y obligar a una resección parcial de la misma, lo que de por sí es un factor de riesgo conocido para fístula salival (49).

La estancia hospitalaria y la necesidad de gastrostomía se relacionaron directamente la fístula salival ( $p<0,01$  para ambas), pero, como comentamos en el análisis anterior, esto es debido a que ambas cosas son consecuencia directa de la fístula saliva, que obliga a permanecer en el hospital hasta su resolución y le impide la nutrición oral, precisando la gastrostomía.

La existencia de una traqueotomía previa no se relaciona con la presencia de fístula salival, aunque no olvidemos que solo existen 3 pacientes en la muestra con

esta variable. La rotura capsular de las adenopatías se queda cerca de la significación estadística ( $p=0,07$ ). En este sentido, se podría teorizar que una adenopatía metastásica rota podría suponer unos niveles elevados de catepsina y otras proteasas en las partes blandas del cuello, que quedarían en parte en el lecho tras la cirugía, y podrían favorecer la fístula salival. No obstante, serían necesarios más estudios para demostrar esta hipótesis.

Por último, la actividad de catepsina S salivar por encima del punto de corte obtenido previamente (886,2) no muestra diferencias significativas entre ambos grupos ( $p=0,16$ ). Es de destacar que el nivel de significación estadístico es menor que cuando se analizaron las complicaciones de manera global ( $p=0,21$ ), pese a haber reducido sustancialmente el tamaño de la muestra (de 74 a 38), dado que solo se analizan pacientes laringectomizados totales. Es posible, por tanto, que una muestra mayor de estos pacientes obtuviera diferencias significativas entre ambos grupos.

El análisis multivariante final descartó a la gastrostomía como un factor independiente para la fístula salival ( $p=0,22$ ). La pN y la estancia hospitalaria quedaron muy próximas a la significación estadística, con unas OR con IC95% de **4,3 (0,9-20,5)** con  $p=0,06$  para la pN; y **2,9 (0,9-7,8)** con  $p=0,06$  para la estancia hospitalaria. Por tanto, aunque no se pueden considerar con estos datos factores de riesgo independiente para la fístula salival, probablemente lo fueran aumentando el tamaño muestral.

### 9.3 APLICACIÓN CLÍNICA DE LA CATEPSINA S SALIVAR COMO BIOMARCADOR PREDICTIVO DE FÍSTULA SALIVAL

Se conocen varios marcadores predictivos de la aparición de fístula salival. Algunos de los cuales son intrínsecos al paciente (niveles de albúmina, niveles de hemoglobina, comorbilidades), que se pueden mejorar con programas de prehabilitación. Otros son intrínsecos a la intervención quirúrgica (sutura vertical, márgenes afectos por tumor), que se pueden mejorar con una técnica quirúrgica. No obstante, es muy probable que existan otros factores intrínsecos del propio tumor, ya que, pese a tener en cuenta los factores antes mencionados, la fístula salival sigue estando presente en proporciones notables.

Podrían existir tumores que expresasen mayor cantidad de proteasas al medio, y que estas, en el postoperatorio inmediato, favorecieran la aparición de fístula. Esto sería de gran utilidad para el cirujano, que podría adoptar medidas más intensas para limitar este riesgo. Sin embargo, nuestro estudio no permite adjudicar a la catepsina S salivar este papel, aunque, como ya hemos dicho, puede que investigaciones con mayor número de pacientes arrojasen otros resultados.

## 10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente estudio tiene algunas limitaciones que conviene tener en cuenta. En primer lugar, las diferencias epidemiológicas entre el grupo de pacientes con carcinoma faringolaríngeo y el grupo control pueden afectar a los resultados, aunque se realizaron análisis multivariantes para evitar los sesgos provocados por posibles factores de confusión.

Por otro lado, hay que recordar que el presente estudio se centra en los pacientes que fueron intervenidos quirúrgicamente, dejando fuera a los que se trataron con quimiorradioterapia. También deja fuera a los carcinomas p16 positivos. Puede que estos tumores tengan alguna característica concreta que no se ha podido analizar.

Debe señalarse también que los test predictivos creados para analizar la extensión del tumor y el estadio clínico no son excesivamente robustos, pese a que sí se encontraron diferencias significativas al emplearlos en los análisis posteriores. Es posible que un aumento del tamaño muestral contribuyera a aumentar la validez interna y externa de estos test, y ampliara sus posibles usos clínicos.

Este aumento del tamaño muestra se volvió imposible al desaparecer del mercado la sonda empleada en el experimento. Se trató de contactar con la empresa distribuidora e incluso con autores que la habían empleado en sus trabajos, pero resultó imposible su obtención, y con ello la realización de más geles de poliacrilamida.

## 11. NUEVAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Dada la ausencia de investigaciones previas que analizaran la relación entre las catepsinas en saliva y el cáncer de cabeza y cuello, este estudio puede suponer el punto de partida de numerosas líneas de investigación, especialmente teniendo en cuenta el auge actual de la saliva como medio de estudio en la oncología.

A corto plazo, sería muy interesante analizar el papel de la catepsina S ante las recidivas de la enfermedad tumoral, para tratar de obtener un marcador que ayudase en su detección precoz. En este sentido, sería también muy importante analizar previamente el posible efecto de la radioterapia y la quimioterapia sobre los niveles de catepsinas salivares, dado que las glándulas salivares son órganos muy afectados por estos tratamientos y podría verse alterada la excreción de estas proteínas a través de la saliva.

Los análisis de supervivencia en función de la actividad de la catepsina S, y de otras de su familia, también podrían ser muy útiles a la hora de tratar de encontrar un nuevo marcador pronóstico en cáncer de cabeza y cuello.

El estudio de otras catepsinas en saliva como la D, la C o la K sería muy aconsejable, dado que las tres están muy relacionadas con procesos oncológicos a otros niveles, como la mama, el colon o el estómago.

Por último, este estudio de las catepsinas en saliva, que se ha realizado por perfil de actividad, podría ser complementado con estudios que cuantificasen la proteína. Es muy posible que varias de las catepsinas pierdan su actividad enzimática en un medio como la saliva, pero mantengan su cadena polipeptídica íntegra y puedan ser detectadas con otro tipo de técnicas como el ELISA, arrojando nuevos datos.

# CONCLUSIONES



# 1. CONCLUSIONES

A tenor de los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos establecer las siguientes conclusiones:

- La actividad de la catepsina S salivar se encuentra elevada en los pacientes con un carcinoma epidermoide faringolaríngeo p16 negativo respecto a los pacientes sanos.
- La actividad de la catepsina L salivar se encuentra disminuida en los pacientes con un carcinoma epidermoide faringolaríngeo p16 negativo respecto a los pacientes sanos.
- No existen diferencias en la actividad de la catepsina B entre los pacientes con un carcinoma epidermoide faringolaríngeo p16 negativo y los pacientes sanos.
- La actividad de la catepsina S puede ser usada como prueba diagnóstica estableciendo el punto de corte en 479,75 de intensidad de densidad óptica.
- La actividad de la catepsina S puede ser usada como prueba predictiva para un tumor primario avanzado estableciendo el punto de corte en 826,05 de intensidad de densidad óptica
- La actividad de la catepsina S no aporta validez como prueba predictiva de metástasis ganglionares cervicales.
- La actividad de la catepsina S puede ser usada como prueba predictiva de un estadio clínico avanzado estableciendo el punto de corte en 826,05 de intensidad de densidad óptica.
- La actividad de la catepsina S no aporta validez como prueba predictiva de complicaciones postquirúrgicas en cirugía faringolaríngea, ni de fístula salival en pacientes laringectomizados totales.



# **BIBLIOGRAFÍA**



1. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(2):122–37.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
3. Mesía R, Pastor M, Grau JJ, Del Barco E. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (HNC) 2013. *Clinical and Translational Oncology.* 2013;15(12):1018–24.
4. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol.* 2014;50(5):387–403.
5. Rettig EM, D'Souza G. Epidemiology of Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015;24(3):379–96.
6. Posner MR. Head and Neck Cancer. *Goldman's Cecil Medicine: Twenty Fourth Edition.* 2011;1:1257–64.
7. Rahman QB, Iocca O, Kufta K, Shanti RM. Global Burden of Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2020;32(3):367–75.
8. Ram H, Sarkar J, Kumar H, Konwar R, Bhatt MLB, Mohammad S. Oral Cancer: Risk Factors and Molecular Pathogenesis. *J Maxillofac Oral Surg.* 2011;10(2):132–7.
9. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer Epidemiology consortium. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 2009;18(2):541–50.
10. Yete S, D'Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology (Switzerland).* 2018;94(3):133–41.
11. Raj AT, Patil S, Gupta AA, Rajkumar C, Awan KH. Reviewing the role of human papillomavirus in oral cancer using the Bradford Hill criteria of causation. *Disease-a-Month.* 2019;65(6):155–63.
12. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: A meta-analysis (1988-2007). *Annals of Oncology.* 2008;19(10):1681–90.
13. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: A meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011;47(11):1048–54.
14. Westra WH, Lewis JS. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Oropharynx. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):41–7.

15. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind C. TNM Classification of Malignant Tumours Eight Edition. CIREC - Open Access Proceedings Journal. 2014;2017(July):1–67.
16. Devins KM, Tetzlaff MT, Baloch Z, LiVolsi VA. The evolving landscape of HPV-related neoplasia in the head and neck. *Hum Pathol*. 2019;94:29–39.
17. Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology*. 2017;28(10):2386–98.
18. Zhai L, Tumban E. Gardasil-9: A global survey of projected efficacy. *Antiviral Res*. 2016;130:101–9.
19. Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 2019;11(10).
20. Chaturvedi AK, D’Souza G, Gillison ML, Katki HA. Burden of HPV-positive oropharynx cancers among ever and never smokers in the U.S. population. *Oral Oncol*. 2016;60:61–7.
21. Salvador-Coloma C, Cohen E. Multidisciplinary care of laryngeal cancer. *J Oncol Pract*. 2016;12(8):717–24.
22. Steuer CE, El-Deiry M, Parks JR, Higgins KA, Saba NF. An update on larynx cancer. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(1):31–50.
23. Bosetti C, Garavello W, Gallus S, Vecchia C La. Effects of smoking cessation on the risk of laryngeal cancer: An overview of published studies. *Oral Oncol*. 2006;42(9):866–72.
24. Bosetti C, Gallus S, Franceschi S, Levi F, Bertuzzi M, Negri E, et al. Cancer of the larynx in non-smoking alcohol drinkers and in non-drinking tobacco smokers. *Br J Cancer*. 2002;87(5):516–8.
25. Lee JK, Lee KH, Kim SA, Kweon SS, Cho SH, Shim HJ, et al. P16 As a Prognostic Factor for the Response To Induction Chemotherapy in Advanced Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Oncol Lett*. 2018;15(5):6571–7.
26. Eells AC, Mackintosh C, Marks L, Marino MJ. Gastroesophageal reflux disease and head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*. 2020;41(6):102653.
27. Dogantemur S, Ozdemir S, Uguz A, Surmelioglu O, Dagkiran M, Tarkan O, et al. Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in advanced stage laryngeal cancer patients and prognostic significance: Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in laryngeal cancer. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020;86(3):351–7.
28. Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2017;123(9):1566–75.

29. Eckel HE, Staar S, Volling P, Sittel C, Damm M, Jungehuelsing M. Surgical treatment for hypopharynx carcinoma: Feasibility mortality and results. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery*. 2001;124(5):561–9.
30. Garneau JC, Bakst RL, Miles BA. Hypopharyngeal cancer: A state of the art review. *Oral Oncol*. 2018;86(September):244–50.
31. Kim SY, Park B, Lim H, Kim M, Kong IG, Choi HG. Increased risk of larynx cancer in patients with gastroesophageal reflux disease from a national sample cohort. *Clinical Otolaryngology*. 2019;44(4):534–40.
32. Sasaki CT, Doukas SG, Costa J, Vageli DP. Biliary reflux as a causal factor in hypopharyngeal carcinoma: New clinical evidence and implications. *Cancer*. 2019;125(20):3554–65.
33. Chen YP, Chan ATC, Le QT, Blanchard P, Sun Y, Ma J. Nasopharyngeal carcinoma. *The Lancet*. 2019;394(10192):64–80.
34. El-Naggar A et al. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 2017.
35. Seeburg DP, Baer AH, Aygun N. Imaging of Patients with Head and Neck Cancer: From Staging to Surveillance. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2018;30(4):421–33.
36. Abraham J. Imaging for Head and Neck Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):455–71.
37. Zhang Y, Yu J, Zhu H. Risk factors for cervical lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma: A retrospective population–based study. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2022 Oct 1;123(5):e484–8.
38. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE, Haigentz M, Woolgar JA, Triantafyllou A, et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma. Part I. Basic aspects. *Oral Oncol*. 2012 Sep 1;48(9):775–9.
39. Huang SH, O’Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(7).
40. Dillon JK, Brown CB, McDonald TM, Ludwig DC, Clark PJ, Leroux BG, et al. How does the close surgical margin impact recurrence and survival when treating oral squamous cell Carcinoma? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2015;73(6):1182–8.
41. Shanti RM, O’Malley BW. Surgical Management of Oral Cancer. *Dent Clin North Am*. 2018;62(1):77–86.
42. Brown JS, Rogers SN, McNally DN, Boyle M. A modified classification for the maxillectomy defect. *Head Neck*. 2000 Jan;22(1):17–26.
43. Christopoulos E, Carrau R, Segas J, Johnson JT, Myers EN, Wagner RL. Transmandibular approaches to the oral cavity and oropharynx. A functional assessment. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992 Nov;118(11):1164–7.

44. Jiska Cohen-Mansfield, Maha Dakheel-Ali, MDb, Marcia S. Marx, PhD, Khin Thein, MDb, and Natalie G. Regier P, Waage et al. Current Role of Surgery in the Management of Oropharyngeal Cancer. *Physiol Behav.* 2017;176(1):139–48.
45. Baird BJ, Sung CK, Beadle BM, Divi V. Treatment of early-stage laryngeal cancer: A comparison of treatment options. *Oral Oncol.* 2018 Dec;87:8–16.
46. Thomas L, Drinnan M, Natesh B, Mehanna H, Jones T, Paleri V. Open conservation partial laryngectomy for laryngeal cancer: a systematic review of English language literature. *Cancer Treat Rev.* 2012 May;38(3):203–11.
47. Tang ZX, Gong JL, Wang YH, Li ZH, He Y, Liu YX, et al. Efficacy comparison between primary total laryngectomy and nonsurgical organ-preservation strategies in treatment of advanced stage laryngeal cancer a meta-analysis. *Medicine (United States).* 2018;97(21):1–6.
48. Chotipanich A, Wongmanee S. Incidence of Pharyngocutaneous Fistula After Total Laryngectomy and Its Relationship With the Shapes of Mucosa Closure: A Meta-Analysis. *Cureus.* 2022;14(9).
49. Rao KN, Arora RD, Singh A, Nagarkar NM, Aggarwal A. Pharyngocutaneous Fistula Following Primary Total Laryngectomy: a Meta-analysis. *Indian J Surg Oncol.* 2022 Dec;13(4):797–808.
50. Michael RC, Das S, Mani S, Arunagiri S, Thomas R, VEDIAPPAN RS, et al. Pharyngocutaneous Fistula Following Primary and Salvage Laryngectomy: Aetiology and Predictive Factors. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2022 Oct;74(Suppl 2):2139–48.
51. Langaroudi MM, Jafari M, Safari R, Ivraghi MS, Mazarei A. Evaluation of the Incidence of Pharyngocutaneous Fistula after Total Laryngectomy. *Iran J Otorhinolaryngol.* 2023;35(3):141–6.
52. Herranz J, Sarandeses A, Fernández MF, Barro C V, Vidal JM, Gavilán J. Complications after total laryngectomy in nonradiated laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000 Jun;122(6):892–8.
53. M. S, D. M, M. Z, D. S, P. S. Primary and salvage total laryngectomy. Influential factors, complications, and survival. *Journal of BUON.* 2015;20(2):527–39.
54. Goepfert RP, Hutcheson KA, Lewin JS, Desai NG, Zafereo ME, Hessel AC, et al. Complications, hospital length of stay, and readmission after total laryngectomy. *Cancer.* 2017 May;123(10):1760–7.
55. Psychogios G, Mantsopoulos K, Bohr C, Koch M, Zenk J, Iro H. Incidence of occult cervical metastasis in head and neck carcinomas: development over time. *J Surg Oncol.* 2013 Mar;107(4):384–7.

56. Bayır Ö, Toptaş G, Saylam G, İzgi TC, Han Ü, Keseroğlu K, et al. Occult lymph node metastasis in patients with laryngeal cancer and relevant predicting factors: a single-center experience. *Tumori*. 2022 Oct;108(5):439–49.
57. Deganello A, Gitti G, Meccariello G, Parrinello G, Mannelli G, Gallo O. Effectiveness and pitfalls of elective neck dissection in N0 laryngeal cancer. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2011 Aug;31(4):216–21.
58. Richards PS, Peacock TE. The role of ultrasound in the detection of cervical lymph node metastases in clinically NO squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Imaging*. 2007;7(1):167–78.
59. Nieuwenhuis EJC, Castelijns JA, Pijpers R, van den Brekel MWM, Brakenhoff RH, van der Waal I, et al. Wait-and-see policy for the N0 neck in early-stage oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using ultrasonography-guided cytology: is there a role for identification of the sentinel node? *Head Neck*. 2002 Mar;24(3):282–9.
60. Pouvreau P, Coste F, Ramin L, Daste A, De Monès E, Dupin C. [Organ preservation in oropharyngeal cancers treatment: What arguments for radiotherapy?]. *Cancer Radiother*. 2022 Oct;26(6–7):760–5.
61. Leblanc A, Thomas TV, Bouganim N. Chemoradiation for Locoregionally Advanced Laryngeal Cancer. *Otolaryngol Clin North Am*. 2023 Apr;56(2):285–93.
62. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clinical and Translational Oncology*. 2021;23(5):913–21.
63. Gatta G, Capocaccia R, Botta L, Mallone S, De Angelis R, Ardanaz E, et al. Burden and centralised treatment in Europe of rare tumours: results of RARECAREnet—a population-based study. *Lancet Oncol*. 2017;18(8):1022–39.
64. Saroul N, Puechmaille M, Lambert C, Hassan AS, Biau J, Lapeyre M, et al. Prognosis in Head and Neck Cancer: Importance of Nutritional and Biological Inflammatory Status. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. 2022;166(1):118–27.
65. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(1):11–26.
66. Hammarström Sten. The carcinoembryonic antigen CEA family: ( ) structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues Sten. *Cancer Biology*. 1999;9:67–81.
67. Kern S. Why your new cancer biomarker may never work: Recurrent patterns and remarkable diversity in biomarker failures Scott. *Cancer Res*. 2012;72:6097–101.
68. Dahlstrand HM, Lindquist D, Björnstål L, Ohlsson A, Dalianis T, Munck-Wikland E, et al. P16INK4a correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. *Anticancer Res*. 2005;25(6 C):4375–83.

69. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrrri A. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(6):412–23.
70. Lewis JS, Chernock RD, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Gao G, et al. Partial p16 staining in oropharyngeal squamous cell carcinoma: Extent and pattern correlate with human papillomavirus RNA status. *Modern Pathology.* 2012;25(9):1212–20.
71. Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Leonardi E, Farnedi A, Foschini MP. Immunohistochemical expression of p16 INK4A protein in oral lichen planus. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology.* 2011;112(2):222–7.
72. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56(16):3630–3.
73. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261–9.
74. Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(27):4142–8.
75. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Peadamallu CS, Stricker T, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. Vol. 21, *Clinical Cancer Research.* 2015. 632–641 p.
76. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006;24(17):2666–72.
77. Byeon HK, Ku M, Yang J. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer. *Exp Mol Med.* 2019;51(1).
78. Zhang J, Saba NF, Chen G, Shin DM. Targeting HER (ERBB) signaling in head and neck cancer: An essential update. *Mol Aspects Med.* 2015;45:74–86.
79. Bonner J. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. 2006;567–78.
80. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *New England Journal of Medicine.* 2008;359(11):1116–27.
81. Giralt J, Trigo J, Nuyts S, Ozsahin M, Skladowski K, Hatoum G, et al. Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): A randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(2):221–32.

82. Vermorken JB, Stöhlmacher-Williams J, Davidenko I, Licitra L, Winquist E, Villanueva C, et al. Cisplatin and fluorouracil with or without panitumumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck (SPECTRUM): An open-label phase 3 randomised trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(8):697–710.
83. Yu JSL, Cui W. Proliferation, survival and metabolism: The role of PI3K/AKT/ mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development (Cambridge).* 2016;143(17):3050–60.
84. Marquard FE, Jücker M. PI3K/AKT/mTOR signaling as a molecular target in head and neck cancer. *Biochem Pharmacol.* 2020;172:113729.
85. Forbes SA, Tang G, Bindal N, Bamford S, Dawson E, Cole C, et al. COSMIC (the Catalogue of Somatic Mutations In Cancer): A resource to investigate acquired mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(SUPPL.1):652–7.
86. Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangaeng S, García AM, et al. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: Emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clinical Cancer Research.* 2007;13(17):4964–73.
87. Maira SM, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(2):317–28.
88. Bowles DW, Senzer N, Hausman D, Peterson S, Vo A, Walker L, et al. A multicenter phase 1 study of PX-866 and cetuximab in patients with metastatic colorectal carcinoma or recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs.* 2014;32(6):1197–203.
89. Fury MG, Lee NY, Sherman E, Ho AL, Rao S, Heguy A, et al. A phase 1 study of everolimus + weekly cisplatin + intensity modulated radiation therapy in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013;87(3):479–86.
90. Massarelli E, Lin H, Ginsberg LE, Tran HT, Lee JJ, Canales JR, et al. Phase II trial of everolimus and erlotinib in patients with platinum-resistant recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology.* 2015;26(7):1476–80.
91. Palucka AK, Coussens LM. The Basis of Oncoimmunology. *Cell.* 2016;164(6):1233–47.
92. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: From tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev.* 2011;241(1):104–18.
93. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Vandecasteele K, Rottey S, Ferdinande L. TILs in Head and Neck Cancer: Ready for Clinical Implementation and Why (Not)? *Head Neck Pathol.* 2017;11(3):354–63.

94. Nghia Nguyen MD. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2016;
95. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):311–35.
96. Hoesli R, Birkeland AC, Rosko AJ, Issa M, Chow KL, Michmerhuizen NL, et al. Proportion of CD4 and CD8 tumor infiltrating lymphocytes predicts survival in persistent/recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2018 Feb;77:83–9.
97. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261–8.
98. Ahmadzadeh M, Johnson LA, Heemskerk B, Wunderlich JR, Dudley ME, White DE, et al. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*. 2009;114(8):1537–44.
99. Theodoraki MN, Yerneni SS, Hoffmann TK, Gooding WE, Whiteside TL. Clinical significance of PD-L1  $\beta$  exosomes in plasma of head and neck cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(4):896–905.
100. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016;9:5023–39.
101. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(19):1856–67.
102. Burtneß B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, et al. Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2019;394(10212):1915–28.
103. Zhao Z, Ge J, Sun Y, Tian L, Lu J, Liu M, et al. Is E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012;48(9):761–7.
104. Dayan D, Vered M. Is immuno-expression of E-cadherin really a prognostic factor in head and neck cancer? *Oral Oncol*. 2013;49(3):e5.
105. Rodrigo Tapia JP, González Meana M V., García González LA, Coto E, García Pedrero J, Núñez Batalla F, et al. Inactivación de P53 y amplificación de la ciclina D1 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2002;53(4):225–32.

106. Schwartz MK. Tissue cathepsins as tumor markers. *Clinica Chimica Acta*. 1995;237(1–2):67–78.
107. Chen S, Dong H, Yang S, Guo H. Cathepsins in digestive cancers. *Oncotarget*. 2017;8(25):41690–700.
108. Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000;1477(1–2):98–111.
109. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2012;1824(1):68–88.
110. Vidak E, Javoršek U, Vizovišek M, Turk B. Cysteine Cathepsins and their Extracellular Roles: Shaping the Microenvironment. *Cells*. 2019;8(3):264.
111. Katunuma N. Posttranslational Processing and Modification of Cathepsins and Cystatins. *J Signal Transduct*. 2010;2010:1–8.
112. Kirschke H, Wiederanders B, Bromme D, Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochemical Journal*. 1989;264(2):467–73.
113. Goulet B, Baruch A, Moon NS, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, et al. A Cathepsin L Isoform that Is Devoid of a Signal Peptide Localizes to the Nucleus in S Phase and Processes the CDP/Cux Transcription Factor terminal degradation of proteins in the lysosomes, but the specific phenotypes resulting from gene inactivation of . *Mol Cell*. 2004;14:207–19.
114. Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: Regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer*. 2015;15(12):712–29.
115. Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson CM. Cystatins. *Biochem Soc Symp*. 2003;99(70):179–99.
116. Turk V, Turk B, Gunčar G, Turk D, Kos J. Lysosomal cathepsins: Structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul*. 2002;42:285–303.
117. Turk V. NEW EMBO MEMBERS' REVIEW: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*. 2001 Sep 3;20(17):4629–33.
118. Lalmanach G, Saidi A, Bigot P, Chazeirat T, Lecaille F, Wartenberg M. Regulation of the proteolytic activity of cysteine cathepsins by oxidants. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):1–20.
119. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management. *Cells*. 2020;9(7).

120. Vidoni, Chiara; Follo, Carlo; Savino, Miriam; Melone, Mariarosa; Ciro Isidoro. The Role of Cathepsin D in the Pathogenesis of Human Neurodegenerative Disorders. *Med Res Rev.* 2016;86(6):84–92.
121. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2016;32:22–37.
122. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2014;1840(8):2560–70.
123. Wu H, Du Q, Dai Q, Ge J, Cheng X. Cysteine protease cathepsins in atherosclerotic cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(2):111–23.
124. Zhang X, Luo S, Wang M, Shi GP. Cysteinyll cathepsins in cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2020;1868(4):140360.
125. Gunčar G, Pungerčič G, Klemenčič I, Turk V, Turk D. Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO Journal.* 1999;18(4):793–803.
126. Adkison AM, Raptis SZ, Kelley DG, Pham CTN. Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *Journal of Clinical Investigation.* 2002;109(3):363–71.
127. Gao S, Zhu H, Zuo X, Luo H. Cathepsin g and its role in inflammation and autoimmune diseases. *Arch Rheumatol.* 2018;33(4):748–9.
128. Saftig P, Hunziker E, Everts V, Jones S, Boyde A, Wehmeyer O, et al. Functions of Cathepsin K in Bone Resorption. 2002;293–303.
129. Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: Biology, potential clinical utility, and lessons learned. *Endocr Rev.* 2017;38(4):325–50.
130. Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle.* 2007;6(1):60–4.
131. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):161–74.
132. Laufs S, Schumacher J, Allgayer H. Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle.* 2006;5(16):1760–71.
133. Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-morse N, Giraudo E, Tsai F ying, et al. Cathepsin cysteine protease. *Cancer Cell.* 2004;5(May):443–53.
134. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 2006;20(5):543–56.

135. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS. Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(2):1197–202.
136. Hirano T, Manabe T, Takeuchi S. Serum cathepsin B levels and urinary excretion of cathepsin B in the cancer patients with remote metastasis. *Cancer Lett*. 1993;70(1–2):41–4.
137. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, et al. A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma. *Mol Med*. 2000;6(5):450–60.
138. Bian B, Mongrain S, Cagnol S, Langlois MJ, Boulanger J, Bernatchez G, et al. Cathepsin B promotes colorectal tumorigenesis, cell invasion, and metastasis. *Mol Carcinog*. 2016;55(5):671–87.
139. Mitrović A, Mirković B, Sosič I, Gobec S, Kos J. Inhibition of endopeptidase and exopeptidase activity of cathepsin B impairs extracellular matrix degradation and tumour invasion. *Biol Chem*. 2016;397(2):164–74.
140. Szczuka I, Wiśniewski J, Kustrzeba-Wójcicka I, Terlecki G. The effect of 3-bromopyruvate on the properties of cathepsin B in the aspect of metastatic potential of colon cancer cells. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2020;29(8):949–57.
141. Akinyemi AO, Pereira GBS, Rocha FV. Role of Cathepsin B in Cancer Progression: A Potential Target for Coordination Compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 2021;21(13):1612–24.
142. Srisomsap C, Subhasitanont P, Otto A, Mueller EC, Punyarit P, Wittmann-Liebold B, et al. Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*. 2002;2(6):706–12.
143. Kim EK, Song MJ, Jang HH, Chung YS. Clinicopathologic analysis of cathepsin b as a prognostic marker of thyroid cancer. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):1–15.
144. Ebert MPA, Krüger S, Fogeron ML, Lamer S, Chen J, Pross M, et al. Overexpression of cathepsin B in gastric cancer identified by proteome analysis. *Proteomics*. 2005;5(6):1693–704.
145. Aggarwal N, Sloane BF. Cathepsin B: Multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(5–6):427–37.
146. Ma X, Wang Y, Fan H, Zhu C, Chen W, Li Z, et al. Genetic polymorphisms of Cathepsin B are associated with gastric cancer risk and prognosis in a Chinese population. *Cancer Biomark*. 2021;32(2):189–98.
147. Dolenc I, Turk B, Pungercic G, Ritonja A, Turk V. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(37):21626–31.
148. Altorjay A, Paal B, Sohar N, Kiss J, Szanto I, Sohar I. Significance and prognostic value of lysosomal enzyme activities measured in surgically operated adenocarcinomas of the

- gastroesophageal junction and squamous cell carcinomas of the lower third of esophagus. Vol. 11, World Journal of Gastroenterology. 2005. 5751–5756 p.
149. Xiao Y, Cong M, Li J, He D, Wu Q, Tian P, et al. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation. *Cancer Cell*. 2021;39(3):423-437.e7.
  150. Alva AS, Gultekin SH, Baehrecke EH. Autophagy in human tumors: Cell survival or death? [1]. *Cell Death Differ*. 2004;11(9):1046–8.
  151. Khaket TP, Singh MP, Khan I, Bhardwaj M, Kang SC. Targeting of cathepsin C induces autophagic dysregulation that directs ER stress mediated cellular cytotoxicity in colorectal cancer cells. *Cell Signal*. 2018;46(2017):92–102.
  152. Zhang GP, Yue X, Li SQ. Cathepsin C interacts with TNF- $\alpha$ /p38 MAPK signaling pathway to promote proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res Treat*. 2020;52(1):10–23.
  153. Cheng X, Ren Z, Liu Z, Sun X, Qian R, Cao C, et al. Cysteine cathepsin C: a novel potential biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *Cancer Cell Int*. 2022;22(1):1–14.
  154. Chiang KC, Lai CY, Chiou HL, Lin CL, Chen YS, Kao SH, et al. Timosaponin AIII inhibits metastasis of renal carcinoma cells through suppressing cathepsin C expression by AKT/miR-129-5p axis. *J Cell Physiol*. 2019;234(8):13332–41.
  155. Petr Benes, Vaclav Vetvickab and MF. CATHEPSIN D – MANY FUNCTIONS OF ONE ASPARTIC PROTEASE. *Rivista della Tecnologie Tessili*. 2008;68(1):64–76.
  156. Vetvicka V, Vetvickova J, Fusek M. Role of procathepsin D activation peptide in prostate cancer growth. *Prostate*. 2000;44(1):1–7.
  157. Gieselmann V, Hasilik A, Von Figura K. Processing of human cathepsin D in lysosomes in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(5):3215–20.
  158. Kenessey A, Nacharaju P, Ko LW, Yen SH. Degradation of tau by lysosomal enzyme cathepsin D: Implication for Alzheimer neurofibrillary degeneration. *J Neurochem*. 1997;69(5):2026–38.
  159. Steuber T, Heidegger I, Kafka M, Roeder MA, Chun F, Preisser F, et al. PROPOSe: A Real-life Prospective Study of Proclarix, a Novel Blood-based Test to Support Challenging Biopsy Decision-making in Prostate Cancer. *Eur Urol Oncol*. 2022;5(3):321–7.
  160. Francesco Gentile, Evelina La Civita, Bartolomeo Della Ventura MF, Dario Bruzzese, Felice Crocetto PT. A Neural Network Model Combining [-2]proPSA, freePSA, Total PSA, Cathepsin D, and Thrombospondin-1 Showed Increased Accuracy in the Identification of Clinically Significant Prostate Cancer. *Abeloff's Clinical Oncology*, 5/e. 2023;938–44.
  161. Liu QW, Ruan HJ, Chao WX, Li MX, Jiao YL, Ward DG, et al. N-linked glycoproteomic profiling in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2022;28(29):3869–85.

162. Chuaypen N, Sriphoosanaphan S, Vorasittha A, Chaiyarit S, Thongboonkerd V, Tangkijvanich P, et al. Targeted Proteins Reveal Cathepsin D as a Novel Biomarker in Differentiating Hepatocellular Carcinoma from Cirrhosis and Other Liver Cancers. *2022;23:2017–26.*
163. Ding X, Zhang C, Chen H, Ren M, Liu X. Cathepsins Trigger Cell Death and Regulate Radioresistance in Glioblastoma. *Cells. 2022;11(24).*
164. Yoganandarajah V, Patel J, van Schaijik B, Bockett N, Brasch HD, Paterson E, et al. Identification of Cancer Stem Cell Subpopulations in Head and Neck Metastatic Malignant Melanoma. *Cells. 2020 Jan;9(2).*
165. Junho Kang , Yeuni Yu SJ. Prognostic role of high cathepsin D expression in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ther Adv Vaccines. 2020;9(6):259–61.*
166. Huang L, Liu Z, Chen S, Liu Y, Shao Z. A prognostic model for triple-negative breast cancer patients based on node status, cathepsin-D and Ki-67 index. *PLoS One. 2013;8(12):e83081.*
167. Okamoto K, Yu H, Misumi Y, Ikehara Y, Yamamoto K. Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding rat spleen cathepsin E and analysis of the activation of purified procathepsin E. *Arch Biochem Biophys. 1995 Sep;322(1):103–11.*
168. Corbin Pontious MS, Sabrina Kaul MHong. Cathepsin E Expression and Activity: Role in the Detection and Treatment of Pancreatic Cancer. *Gan No Rinsho. 2019;Spec No(7):329–36.*
169. Guner G, Isik A, Karabulut E, Gedikoglu G, Sokmensuer C, Akyol A. Morphologic and Immunohistochemical Appraisal of Primary Gastric Carcinomas. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology. 2018;26(10):e107–15.*
170. Chan S, Wang X, Wang Z, Du Y, Zuo X, Chen J, et al. CTSG Suppresses Colorectal Cancer Progression through Negative Regulation of Akt/mTOR/Bcl2 Signaling Pathway. *Int J Biol Sci. 2023;19(7):2220–33.*
171. R. MK. Cathepsin G-Induced Cell Aggregation of Breast Cancer MCF-7 Decreases Doxorubicin Sensitivity in a Hypoxia-Inducible Factor- Independent Mechanism. *2022.*
172. Sionov RV. Leveling up the controversial role of neutrophils in cancer: When the complexity becomes entangled. *Cells. 2021;10(9).*
173. Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, et al. Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry. 1996;271(21):12511–6.*
174. Brubaker KD, Vessella RL, True LD, Thomas R, Corey E. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *Journal of Bone and Mineral Research. 2003;18(2):222–30.*

175. Zhang C, Liu Z, Wang X, Zhang B, Cui L, Hu Q, et al. Cathepsin K promotes the proliferation of hepatocellular carcinoma cells through induction of SIAH1 ubiquitination and degradation. *iScience*. 2023;26(6):106852.
176. Caliò A, Brunelli M, Gobbo S, Argani P, Munari E, Netto G, et al. Cathepsin k: A novel diagnostic and predictive biomarker for renal tumors. *Cancers (Basel)*. 2021;13(10):1–14.
177. Elhendawy HA, Soliman S. Clinicopathological correlation of Cathepsin K expression in salivary gland carcinomas; relation to patients` outcome. *Diagn Pathol*. 2023;18(1):1–17.
178. Barrett AJ, Kirschke H. Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Methods Enzymol*. 1981;80(C):535–61.
179. Sudhan DR, Siemann DW. Cathepsin L targeting in cancer treatment. *Pharmacol Ther*. 2015;155:105–16.
180. Skrzypczak M, Springwald A, Latrich C, Häring J, Schüler S, Ortmann O, et al. Expression of cysteine protease cathepsin L is increased in endometrial cancer and correlates with expression of growth regulatory genes. *Cancer Invest*. 2012;30(5):398–403.
181. Samaiya M, Bakhshi S, Shukla AA, Kumar L, Chauhan SS. Epigenetic regulation of cathepsin L expression in chronic myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(10):2189–99.
182. Gupta S, Singh RK, Dastidar S, Ray A. Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: Present and future trends. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(3):291–9.
183. Liu WL, Liu D, Cheng K, Liu YJ, Xing S, Chi PD, et al. Evaluating the diagnostic and prognostic value of circulating cathepsin S in gastric cancer. *Oncotarget*. 2016;7(19):28124–38.
184. DA COSTA AC, Santa-Cruz F, Mattos LAR, Aquino MAR, Martins CR, Ferraz ÁAB, et al. Cathepsin s as a target in gastric cancer (Review). *Mol Clin Oncol*. 2020;12(2):99–103.
185. Ghanadi K, Ashorzadeh S, Aliyepoor A, Anbari K. Evaluation of serum levels of cathepsin S among colorectal cancer patients. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022;78(May):103831.
186. Gautam J, Banskota S, Lee H, Lee YJ, Jeon YH, Kim JA, et al. Down-regulation of cathepsin S and matrix metalloproteinase-9 via Src, a non-receptor tyrosine kinase, suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Exp Mol Med*. 2018;50(9).
187. Kos J, Vižin T, Fonović UP, Pišlar A. Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2015;31:76–83.

188. Majc B, Habič A, Novak M, Rotter A, Porčnik A, Mlakar J, et al. Upregulation of Cathepsin X in Glioblastoma: Interplay with  $\gamma$ -Enolase and the Effects of Selective Cathepsin X Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1–20.
189. Fang Y, Zhang D, Hu T, Zhao H, Zhao X, Lou Z, et al. KMT2A histone methyltransferase contributes to colorectal cancer development by promoting cathepsin Z transcriptional activation. *Cancer Med.* 2019;8(7):3544–52.
190. Kos J, Smid A, Krasovec M, Svetic B, Lenarcic B, Vrhovec I, et al. Lysosomal Proteases Cathepsins D , B , H , L and Their Inhibitors Stef ins A and B in Head and Neck Cancer. 1995;376(July):401–5.
191. Kos J, Smid A, Krasovec M, Svetic B, Lenarcic B, Vrhovec I, et al. Lysosomal Proteases Cathepsins D , B , H , L and Their Inhibitors Stef ins A and B in Head and Neck Cancer. 1995;376(July):401–5.
192. Marsigliante S, Resta L, Leo G, Mazzotta D, d'Amore R, Biscozzo L, et al. Expression of cathepsin D in malignant and in the corresponding non-malignant node-negative laryngeal samples: correlation with receptors for androgen, glucocorticoid, oestrogen and progesterone. *Cancer Lett.* 1993;68(2–3):135–42.
193. Marsigliante S, Biscozzo L, Resta L, Leo G, Mottaghi A, Maiorano E, et al. Immunohistochemical and immunoradiometric evaluations of total cathepsin D in human larynx. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30(1):51–5.
194. Zeillinger R, Swoboda H, Machacek E, Nekahm D, Sliutz G, Knogler W, et al. Expression of cathepsin D in head and neck cancer. *Eur J Cancer.* 1992;28(8–9):1413–5.
195. Gandour-Edwards R, Trock B, Donald PJ. Predictive value of cathepsin-D for cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 1999;21(8):718–22.
196. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: Markers for diagnosis and prognosis in cancer. *International Journal of Biological Markers.* 2000;15(1):84–9.
197. Kawamata H, Nakashiro KI, Uchida D, Harada K, Yoshida H, Sato M. Possible contribution of active MMP2 to lymph-node metastasis and secreted cathepsin L to bone invasion of newly established human oral-squamous-cancer cell lines. *Int J Cancer.* 1997;70(1):120–7.
198. Macabeo-Ong M, Shiboski CH, Silverman S, Ginzinger DG, Dekker N, Wong DTW, et al. Quantitative analysis of cathepsin L mRNA and protein expression during oral cancer progression. *Oral Oncol.* 2003;39(7):638–47.
199. Wickramasinghe NS, Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W. Cathepsin B promotes both motility and invasiveness of oral carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 2005;436(1):187–95.

200. Chen MK, Su SC, Lin CW, Tsai CM, Yang SF, Weng CJ. Cathepsin B SNPs elevate the pathological development of oral cancer and raise the susceptibility to carcinogen-mediated oral cancer. *Hum Genet.* 2012;131(12):1861–8.
201. Nakashima T, Yasumatsu R, Masuda M, Clayman GL, Komune S. Prognostic value of cathepsin L and its inhibitor headpin in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Laryngology and Otology.* 2012;126(11):1134–7.
202. Yang WE, Ho CC, Yang SF, Lin SH, Yeh KT, Lin CW, et al. Cathepsin B expression and the correlation with clinical aspects of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2016;11(3):1–11.
203. Huang GZ, Wu QQ, Zheng ZN, Shao TR, Li F, Lu XY, et al. Bioinformatics analyses indicate that cathepsin g (Ctsg) is a potential immune-related biomarker in oral squamous cell carcinoma (oscc). *Onco Targets Ther.* 2021;14:1275–89.
204. Shen Y, Chen H, Gong X, Wang Z, Chen M, Chen D. Identification of lysosome-related genes in connection with prognosis and immune cell infiltration for drug candidates in head and neck cancer. *Open Life Sci.* 2023;18(1):20220660.
205. Li C, Chen L, Wang J, Zhang L, Tang P, Zhai S, et al. Expression and clinical significance of cathepsin B and stefin A in laryngeal cancer. *Oncol Rep.* 2011;26(4):869–75.
206. Zacharias. NSN and W. Cigarette smoke condensate increases cathepsin-mediated invasiveness of oral carcinoma cells. *Bone.* 2008;23(1):1–7.
207. Edgar WM. Saliva and dental health. Clinical implications of saliva: report of a consensus meeting. *Br Dent J.* 1990 Aug;169(3–4):96–8.
208. Humphrey SP, Williamson RT. Saliva Review.Pdf. *J Prosthet Dent.* 2001;85(2):162–9.
209. Drake RR, Cazares LH, Semmes OJ, Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(1):93–100.
210. Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 2003;3(6):1003–15.
211. Farah R, Haraty H, Salame Z, Fares Y, Ojcius DM, Said Sadier N. Salivary biomarkers for the diagnosis and monitoring of neurological diseases. *Biomed J.* 2018 Apr;41(2):63–87.
212. Chojnowska S, Ptaszyńska-Sarosiek I, Kępką A, Knaś M, Waszkiewicz N. Salivary Biomarkers of Stress, Anxiety and Depression. *J Clin Med.* 2021 Feb;10(3).
213. Melguizo-Rodríguez L, Costela-Ruiz VJ, Manzano-Moreno FJ, Ruiz C, Illescas-Montes R. Salivary biomarkers and their application in the diagnosis and monitoring of the most common oral pathologies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):1–17.

214. Kumar P, Gupta S, Das BC. Saliva as a potential non-invasive liquid biopsy for early and easy diagnosis/prognosis of head and neck cancer. *Transl Oncol.* 2024 Feb 1;40.
215. Singh P, Verma JK, Singh JK. Validation of Salivary Markers, IL-1 $\beta$ , IL-8 and Lgals3bp for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in an Indian Population. *Sci Rep.* 2020 Apr;10(1):7365.
216. Kamatani T, Shiogama S, Yoshihama Y, Kondo S, Shirota T, Shintani S. Interleukin-1 beta in unstimulated whole saliva is a potential biomarker for oral squamous cell carcinoma. *Cytokine.* 2013 Nov;64(2):497–502.
217. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity.* 2019 Apr;50(4):1007–23.
218. Kim JH. Interleukin-8 in the Tumor Immune Niche: Lessons from Comparative Oncology. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1240:25–33.
219. Alhamarneh O, Agada F, Madden L, Stafford N, Greenman J. Serum IL10 and circulating CD4(+) CD25(high) regulatory T cell numbers as predictors of clinical outcome and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2011 Mar;33(3):415–23.
220. Stott-Miller M, Houck JR, Lohavanichbutr P, Méndez E, Upton MP, Futran ND, et al. Tumor and salivary matrix metalloproteinase levels are strong diagnostic markers of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011 Dec;20(12):2628–36.
221. Agha-Hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Farmanbar N, Abdollahi M. Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012 Nov;41(10):736–40.
222. Krapfenbauer K, Drucker E, Thurnher D. Identification of tumour-related proteins as potential screening markers by proteome analysis-protein profiles of human saliva as a predictive and prognostic tool. *EPMA J.* 2014;5(1):20.
223. Amenábar JM, Da Silva BM, Punyadeera C. Salivary protein biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020;20(3):305–13.
224. Yassir YA, Al-Judy HJ, Ahmed MAA. Time - Related Salivary Cathepsin B Levels and Periodontal Status in Different Orthodontic Force Magnitudes. *Journal of Baghdad College of Dentistry.* 2015;27(2):115–22.
225. Shabbir A, Waheed H, Ahmed S, Shaikh SS, Farooqui WA. Association of salivary Cathepsin B in different histological grades among patients presenting with oral squamous cell carcinoma. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):1–9.
226. Cohen J, Reed W, Foster MW, Kahmke RR, Rocke DJ, Puscas L, et al. Octreotide may improve pharyngocutaneous fistula healing through downregulation of cystatins: A pilot study. *Laryngoscope Investig Otolaryngol.* 2023;8(1):113–9.

227. Kamodyová N, Celec P. Salivary markers of oxidative stress and Salivette collection systems. *Clin Chem Lab Med*. 2011 Nov;49(11):1887–90.
228. Rabe A, Gesell Salazar M, Fuchs S, Kocher T, Völker U. Comparative analysis of Salivette® and paraffin gum preparations for establishment of a metaproteomics analysis pipeline for stimulated human saliva. *J Oral Microbiol*. 2018;10(1):1428006.
229. Pannu JS, Simpson MC, Adjei Boakye E, Massa ST, Cass LM, Challapalli SD, et al. Survival outcomes for head and neck patients with Medicaid: A health insurance paradox. *Head Neck*. 2021;43(7):2136–47.
230. Tierney WS, Xiao R, Milstein CF. Characterization of Functional Dysphonia: Pre- and Post-Treatment Findings. *Laryngoscope*. 2021 Jun;131(6):E1957–64.
231. INE. Encuesta Europea de Salud en España (ESEE) Año 2020. Madrid: Instituto Nacional de Estadística. 2020;2020:1–15.
232. Badwal JS. Total Laryngectomy for Treatment of T4 Laryngeal Cancer: Trends and Survival Outcomes. *Polish Journal of Surgery*. 2018 Aug 6;91(3):30–7.
233. Chiesa-Estomba CM, Sistiaga-Suarez JA, González-García JA, Larruscain E, Altuna-Mariezcurrera X. Intraoperative Surgical Complications in Transoral Laser CO<sub>2</sub> Microsurgery of the Larynx: An Observational, Prospective, Single-Center Study. *Ear Nose Throat J*. 2021 Sep 24;100(5\_suppl):456S-461S.
234. Paderno A, Lancini D, Bosio P, Del Bon F, Fior M, Berretti G, et al. Transoral Laser Microsurgery for Glottic Cancer in Patients Over 75 Years Old. *Laryngoscope*. 2022 Jan 7;132(1):135–41.
235. Su TT, Sun ZF. [A retrospective study on the assessment of dysphagia after partial laryngectomy]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2017 Nov 7;52(11):812–8.
236. HU S, LOO JA, WONG DT. Human Saliva Proteome Analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Mar 2;1098(1):323–9.
237. Wang H, Wang B, Zhang X, Feng C. Relations among sensitivity, specificity and predictive values of medical tests based on biomarkers. *Gen Psychiatr*. 2021 Mar 10;34(2):e100453.
238. Cheng SY, Chen PJ, Chu YH. Delayed Radionecrosis of the Larynx. *Ear Nose Throat J*. 2019 Jan 28;98(1):23–4.
239. Al Feghali KA, Ghanem AI, Burmeister C, Chang SS, Ghanem T, Keller C, et al. Impact of smoking on pathological features in oral cavity squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther*. 2019;15(3):582–8.

# **ANEXOS**



## 1. ANEXO I: SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN TNM

Se adjuntan los sistema de estadificación TNM de los tumores de orofaringe, hipofaringe y laringe que se han empleado en el presente estudio. Corresponden a la octava edición de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

### 1.1 CÁNCER DE OROFARINGE P16 NEGATIVO

#### **TUMOR PRIMARIO (T)**

- **T1:** 2 cm o menos.
- **T2:** 2-4 cm.
- **T3:** mayor 4 cm o extensión a cara lingual de epiglotis.
- **T4a:** invade laringe, musculatura extrínseca lingual, pterigoideo medial, paladar duro o mandíbula.
- **T4b:** invade apófisis pterigoides, músculo pterigoideo lateral, pared lateral nasofaringe, base cráneo o engloba arteria carótida.

#### **METÁSTASIS CERVICALES (N)**

- **N1:** ganglio único e ipsilateral < 3 cm.
- **N2a:** ganglio único e ipsilateral 3 – 6 cm.
- **N2b:** ganglios múltiples ipsilaterales, menor de 6 cm.
- **N2c:** ganglios bilaterales o contralateral, menor de 6 cm
- **N3a:** ganglio mayor de 6 cm
- **N3b:** cualquier ganglio con extensión extracapsular clínica.

#### **METÁSTASIS A DISTANCIA (M)**

- **M0:** ausencia de metástasis a distancia.
- **M1:** presencia de metástasis a distancia.

ESTADIO	T	N	MI
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T3	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2, T3	N1	M0
<b>IVA</b>	T1, T2, T3	N2	M0
<b>IVA</b>	T4a	N0, N1, N2	M0
<b>IVB</b>	T4b	Cualquier N	M0
<b>IVB</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

## 1.2 EL CÁNCER DE LARINGE

### “T” DE SUPRAGLOTIS

- **T1:** limitado a una subregión, con movilidad cordal normal.
- **T2:** invade mucosa de otra subregión supraglótica, de glotis, o de una región adyacente (vallécula, base lingual, pared medial seno piriforme) SIN fijación laringe.
- **T3:** fija la cuerda vocal y/o invade: área retrocricoidea, grasa paraglótica, espacio preepiglótico y/o lámina interna cartílago tiroides.
- **T4a:** atraviesa cartílago tiroides y/o afecta a músculos profundos de cuello, musculatura profunda de la lengua, tráquea, glándula tiroides o esófago.
- **T4b:** invade espacio prevertebral, mediastino o engloba arteria carótida.

### “T” DE GLOTIS

- **T1:** limitado a cuerda vocal, con o sin afectación de una comisura, y con movilidad normal. (**T1a** si involucra una sola cuerda; **T1b** si afecta a ambas cuerdas).
- **T2:** se extiende a supraglotis o subglotis, y/o con disminución de la movilidad.
- **T3:** fija la laringe y/o invade espacio paraglótico o lámina interna de cartílago tiroides.
- **T4a y T4b:** igual que en cáncer supraglótico.

### “T” DE SUBGLOTIS

- **T1:** limitado a la subglotis.
- **T2:** invade la cuerda vocal, con movilidad normal o disminuida
- **T3:** fija la cuerda vocal.
- **T4a y T4b:** igual que en cáncer supraglótico.

### METÁSTASIS CERVICALES (N)

- **N1:** ganglio único e ipsilateral < 3 cm.
- **N2a:** ganglio único e ipsilateral 3 – 6 cm.
- **N2b:** ganglios múltiples ipsilaterales, menor de 6 cm.
- **N2c:** ganglios bilaterales o contralateral, menor de 6 cm
- **N3a:** ganglio mayor de 6 cm
- **N3b:** cualquier ganglio con extensión extracapsular clínica.

### METÁSTASIS A DISTANCIA (M)

- **M0:** ausencia de metástasis a distancia.
- **M1:** presencia de metástasis a distancia.

ESTADIO	T	N	MI
<i>I</i>	T1	N0	M0
<i>II</i>	T2	N0	M0
<i>III</i>	T3	N0	M0
<i>III</i>	T1, T2, T3	N1	M0
<i>IVA</i>	T4a	N0, N1	M0
<i>IVA</i>	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
<i>IVB</i>	T4b	Cualquier N	M0
<i>IVB</i>	Cualquier T	N3	M0
<i>IVC</i>	Cualquier T	Cualquier N	M1

## 1.3 EL CÁNCER DE HIPOFARINGE

### TUMOR PRIMARIO (T)

- **T1:** limitado a una subregión anatómica y/o menor de 2 cm.
- **T2:** invade mucosa de otra subregión anatómica, o posee un tamaño de entre 2 y 3 cm, todo ello SIN fijación de la laringe.
- **T3:** mayor de 4 cm, o con fijación de la laringe o extensión al esófago.
- **T4a:** invade alguno de las siguientes regiones: cartílagos tiroideos o cricoides, hueso hioides, glándula tiroidea, o tejidos blandos de la región central del cuello.
- **T4b:** invade espacio prevertebral, mediastino o engloba arteria carótida.

### METÁSTASIS CERVICALES (N)

- **N1:** ganglio único e ipsilateral < 3 cm.
- **N2a:** ganglio único e ipsilateral 3 – 6 cm.
- **N2b:** ganglios múltiples ipsilaterales, menor de 6 cm.
- **N2c:** ganglios bilaterales o contralateral, menor de 6 cm
- **N3a:** ganglio mayor de 6 cm
- **N3b:** cualquier ganglio con extensión extracapsular clínica.

### **METÁSTASIS A DISTANCIA (M)**

- **M0:** ausencia de metástasis a distancia.
- **M1:** presencia de metástasis a distancia.

<b>ESTADIO</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>MI</b>
<i>I</i>	T1	N0	M0
<i>II</i>	T2	N0	M0
<i>III</i>	T3	N0	M0
<i>III</i>	T1, T2, T3	N1	M0
<i>IVA</i>	T1, T2, T3	N2	M0
<i>IVA</i>	T4a	N0, N1, N2	M0
<i>IVB</i>	T4b	Cualquier N	M0
<i>IVB</i>	Cualquier T	N3	M0
<i>IVC</i>	Cualquier T	Cualquier N	M1

## 2. ANEXO II: GELES DE ELECTROFORESIS REALIZADOS

Se adjuntan los geles de poliacrilamida de dos dimensiones sometidos a electroforesis (técnica SDS-PAGE) que se han realizado para desarrollar este estudio.

