



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Estudio Clínico y Aplicación Diagnóstica y Pronóstica
de los Biomarcadores Proteómicos Salivares en el
Cáncer Epidermoide Faringolaríngeo

D. Juan Pablo Pelegrín Hernández

2015

Universidad de Murcia

Estudio clínico y aplicación diagnóstica y
pronóstica de los biomarcadores
proteómicos salivares en el cáncer
epidermoide faringolaríngeo

Tesis Doctoral dirigida por:
Diego Hellín Meseguer
Juan Cabezas Herrera

Juan Pablo Pelegrín Hernández
Murcia, Septiembre de 2015

*A mi familia por enseñarme
la humildad y el esfuerzo...*

*... a Laura, por ser
mi apoyo e inspiración.*

Agradecimientos

Al Dr. Diego Hellín Meseguer, director de esta Tesis Doctoral, por sus consejos, su infinita confianza, su total disposición y su apoyo incondicional. Al Dr. Juan Cabezas Herrera codirector, por el esfuerzo depositado en este proyecto.

A mi madre y a mi tía, por su alegría, su eterno compromiso y porque gracias a ellas he conseguido alcanzar todas mis metas personales y profesionales. A mi hermano Ramón, mi gran referencia y a mi padre por la seguridad que siempre me ha dado.

A mi abuela, por la ilusión que le produce esta tesis.

A Laura, por su apoyo diario, su comprensión y por hacerme la vida tan fácil.

A todos los compañeros y amigos del Servicio de Otorrinolaringología del HCUVA por enseñarme a disfrutar de esta bonita especialidad en el día a día. Al resto de profesionales de consulta, planta y quirófano.

A Alejandra Pérez y al resto de mis compañeros durante la residencia.

A todos los compañeros del Departamento de Oftalmología, Optometría, Otorrinolaringología y An. Patológica por su buena disposición; al Dr. D. Alfonso Medina Banegas por enseñarme la exigencia y la excelencia. A José A. Díaz Manzano por su incansable labor docente y su desinteresada ayuda durante todo el período de mi residencia.

Al Departamento de Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología por su colaboración, ofreciéndome la posibilidad de participar en una de sus líneas de investigación. Al Dr. Francisco Sánchez Bueno, tutor de esta tesis.

A José Manuel Mondejar, por la gran amistad que nos une y los buenos momentos que me ha regalado en quirófano.

Al FFISS, en especial a Guadalupe Ruíz, por su apoyo estadístico y motivacional.

A todos los compañeros del Servicio de Docencia y Formación, por ofrecerme la posibilidad de vivir una experiencia única junto a ellos como Jefe de Residentes.

A mis compañeros de carrera por hacer de la medicina un hobby y a mis amigos de Lorca y del tenis por hacerme disfrutar de la vida.

*A todos mis amigos y familia, a los que os
debo muchas horas que he estado resguardado del mundo exterior...*

*Gracias a todos por hacer
de este trabajo una ilusión....*

Abreviaturas

ABPP: Perfiles de Proteínas Basados en Actividad

ACS: American Cancer Society

ADH: Alcohol Deshidrogenasa

AECC: Asociación Española contra el Cáncer

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ANOVA. Análisis de la Varianza de una Vía

ASA: American Society of Anesthesiologist

AUC: Área bajo la curva

CECC: Cáncer Epidermoide de Cabeza y Cuello

CHEP: Laringectomía Parcial Supracricoidea con cricohioideoepiglottopexia

CHP: Laringectomía Parcial Supracricoidea con cricohiodopexia

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

EG: Error Global

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

FP: Fluorfosfonatos

HCUVA: Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca

IK: Índice de Karnofsky

INC: Instituto Nacional del Cáncer

ICC: índice de Comorbilidad de Charlson

IW: índice de Wald

IY: índice de Yoiden

LS: Laringectomía Supraglótica

LT: Laringectomía Total

LVP: Laringectomía Vertical Parcial

OMS: Organización Mundial de la Salud

PET-TC: Tomografía por Emisión de Positrones

QT: Quimioterapia

RGE: Reflujo Gastroesofágico

RNM: Resonancia Nuclear Magnética

ROC: Receiver Operating Characteristic
RT: Radioterapia
SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica
SG: Supervivencia Global
SH: Serina Hidrolasas
SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad
TAMRA: Fluoróforo Tetrametilrodamina
TC: Tomografía Computarizada
VADS: Vía Aerodigestiva Superior
VC: Vaciamiento Cervical
VCF: Vaciamiento Cervical Funcional
VCFB: Vaciamiento Cervical Funcional Bilateral
VCR: Vaciamiento Cervical Radical
VEB: Virus de Epstein-Barr
VG: Valor Global
VPH: Virus del Papiloma Humano
VPN: Valor Predictivo Negativo
VPP: Valor Predictivo Positivo

Índice

1. Introducción	7
1.1 El cáncer	7
1.1.1. Concepto	7
1.1.2. Origen del cáncer	7
1.1.3. Epidemiología del cáncer	9
1.1.3.1. Situación global	9
1.1.3.2. Situación nacional	9
1.2 Cáncer Epidermoide de Cabeza y Cuello (CECC)	10
1.2.1. Definición y localización anatómica	10
1.2.2. Epidemiología del CECC	11
1.2.2.1. Epidemiología del cáncer de laringe	11
1.2.2.2. Epidemiología del cáncer oral y faríngeo	12
1.2.3 Factores etiológicos asociados al CECC	13
1.2.3.1. Tabaco	14
1.2.3.2. Alcohol	14
1.2.3.3. Situación socioeconómica	16
1.2.3.4. Factores dietéticos	16
1.2.3.5. Agentes Infecciosos	17
1.2.3.5.1. Virus Epstein Bars (VEB)	17
1.2.3.5.2. Virus del Papiloma Humano (VPH)	17
1.2.4. Historia natural y estudio anatomopatológico	18
del cáncer de faringolaríngeo	
1.2.4.1. Estados precancerosos	18
1.2.4.1.1. Sistemas de Clasificación	19
1.2.4.2. Anatomía Patológica del cáncer faringolaríngeo	22
1.2.5. Principios anatómicos, fundamentos y extensión local	23
del cáncer faringolaríngeo	
1.2.5.1. Anatomía del órgano faríngeo:	23
Orofaringe e hipofaringe	
1.2.5.2. Anatomía y extensión tumoral del órgano laríngeo	24
1.2.6. Extensión ganglionar y capacidad metastásica	28
del cáncer faringolaríngeo	
1.2.6.1. Afectación ganglionar	28
1.2.6.2. Capacidad metastásica y expansiva	29
1.2.7. Diagnóstico y estadificación	30
del cáncer epidermoide faringolaríngeo	
1.2.7.1. Diagnóstico clínico	30
1.2.7.2 Diagnóstico por imagen	31

1.2.8. Clasificación TNM y estadificación	32
1.2.8.1. Definición y principios generales	32
1.2.8.2. Categorías	34
1.2.8.3. Clasificación TNM y estadiaje en el cáncer de laringe y faringe	35
1.2.8.3.1. Clasificación T	35
1.2.8.3.2. Clasificación N	38
1.2.8.3.3. Clasificación M	38
1.2.8.3.4. Estadios tumorales	39
1.2.9. Factores pronósticos del CECC	40
1.2.9.1. Relacionados con el enfermo	40
1.2.9.2. Relacionados con la enfermedad	40
1.2.9.3. Relacionados con el tratamiento	42
1.2.10. Tratamiento del cáncer faringolaríngeo	42
1.2.10.1. Enfermedad precoz	43
1.2.10.2. Enfermedad Avanzad	45
1.2.11. Biología molecular en el cáncer faringolaríngeo	46
1.2.11.1. Utilidad del fluido salivar en el cáncer faringolaríngeo	46
1.2.11.2. Serína Hidrolasas y cáncer	47
1.2.11.3. Aplicaciones biológicas de la técnica ABPP para SH.	48
1.2.11.4. Perfiles de actividad de SH en cáncer	49
1.2.11.5. Propiedades de la saliva como fluido diagnóstico	50
1.2.11.6. Diagnósticos en la saliva	52
1.2.11.7. Perfiles ABPP en muestras de saliva de pacientes con Cáncer Faringolaríngeo.	52
2. Justificación, Hipótesis y Objetivos	55
2.1. Justificación del estudio	55
2.2. Hipótesis	55
2.3. Objetivos	56
2.3.1. Objetivo General	56
2.3.2. Objetivos Específicos	56
3. Material y Métodos	59
3.1. Diseño del estudio	59
3.1.1. Tipo de estudio	59
3.2 Población de referencia	59
3.2.1. Población diana	59
3.2.2. Población de estudio	60
3.2.3. Muestra	60

3.3. Definición de grupos de trabajo	61
3.4. Variables del estudio	62
3.5. Recogida de los datos	64
3.6. Obtención y preparación de las muestras biológicas	64
3.7. Metodología en la detección de proteínas con sondas salivares	66
3.7.1. Perfiles de proteínas basados en actividad, ABPP	66
3.7.2. Detección de Serina Hidrolasas con FP-TAMRA	69
3.8. Análisis estadísticos de los datos	70
3.8.1. Estadística descriptiva	70
3.8.2. Estadística inferencial	71
3.8.2.1. Variables cualitativas	71
3.8.2.1. Variables cuantitativas con tendencia a la normalidad	67
3.8.3. Estudio estadístico de la supervivencia	71
3.8.4. Análisis Cluster, por conglomerados jerárquicos	72
3.8.5. Estudio de validación de una prueba diagnóstica	72
3.9. Nivel de significación	75
3.10. Programa informático y análisis	75
3.11. Cumplimiento normas éticas y legales	75
3.12. Limitaciones del estudio	76
4. Resultados	79
4.1. Análisis descriptivo de las variables de la muestra	79
4.1.1. Características sociodemográficas de los pacientes	79
4.1.2. Características clínicoepidemiológicas	84
4.1.3. Características del tumor primario	92
4.1.4. Imagen radiológica y correlación clinicopatológica de las regiones ganglionares	107
4.1.5. Manejo y tratamiento de los pacientes de la muestra	110
4.1.6. Estancia hospitalaria y complicaciones relacionadas con la enfermedad tumoral	119
4.1.7. Evolución de la enfermedad tumoral	121
4.1.8. Características anatomopatológicas	130
4.2. Estudio de las Sondas Salivares ABPP para la detección de perfiles SH y libre de enfermedad en función de los grupos proteómicos salivares	135
4.2.1. Definición de los grupos control y patológico	135
4.2.2. Análisis y estimación de la supervivencia global	137
4.2.3. Agrupaciones salivares	142
4.2.4. Asociaciones clinicomoleculares	143
4.2.5. Análisis del pronóstico y de la evolución, en función de las agrupaciones salivares	150

4.2.5.1. Evolución clínica reflejada en las sondas salivares	150
4.2.5.2. Análisis pronóstico de las sondas ABPP	151
4.2.6 Validez de las sondas salivares en el diagnóstico precoz y avanzado del cáncer faringolaríngeo	153
4.3. Análisis de la Supervivencia Global y Libre de Enfermedad	161
4.2.1 Estudio de la Supervivencia Global	161
4.2.2. Estudio de la Supervivencia Libre de Enfermedad	164
4.4. Análisis de los factores pronósticos relacionados con el CECC	165
4.4.1 Análisis univariante de la SG	165
4.4.2. Análisis univariante de la SLE	182
4.4.3. Análisis Multivariante de la SG	184
5. Discusión	189
5.1. Discusión acerca de los aspectos clínicos	189
5.2. Discusión sobre la utilidad de las sondas salivares con marcaje FP-TAMRA en el diagnóstico y pronóstico del cáncer faringolaríngeo	223
6. Conclusiones	237
7. Proyectos de futuro	241
8. Bibliografía	245
8.1. Recursos Digitales	283
Anexos	

1. Introducción

El mejor momento del día es ahora...

Pierre Bonnard

1.1 El cáncer

1.1.1. Concepto

El cáncer no es sólo una enfermedad sino, como describe el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, 2015), es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la existencia de una proliferación anormal de células. Lo que confiere malignidad a esta proliferación celular es su crecimiento incontrolado con capacidad para invadir órganos, tejidos y diseminarse a distancia por vía linfática o sanguínea.

1.1.2. Origen del cáncer

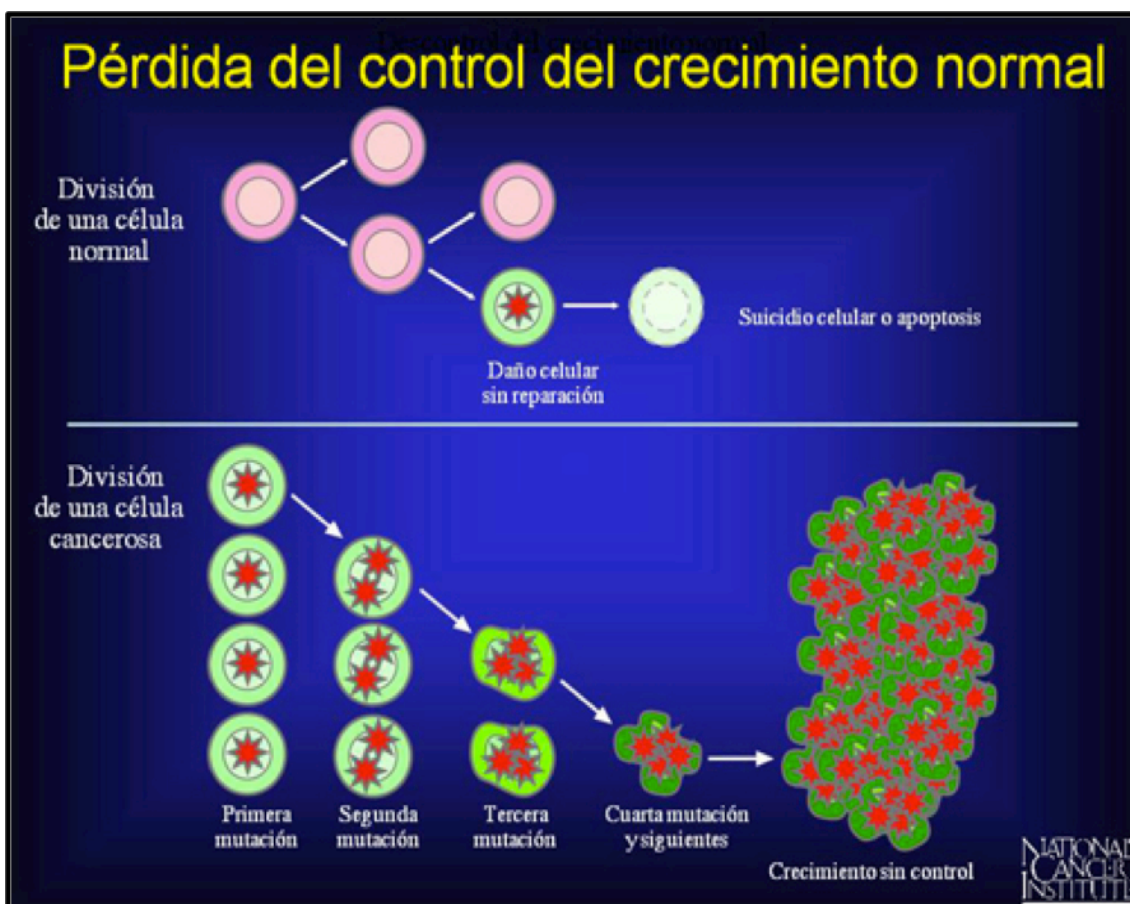
Todos los cánceres comienzan a partir de una célula, por lo tanto, tienen un origen monoclonal. La división celular (Cavenee y cols., 1995) está controlada por dos sistemas: uno estimulador y otro inhibidor, de su equilibrio depende la normalidad de los tejidos y los órganos. Para que una célula normal se transforme en tumoral, cambiando su fenotipo, es necesario una modificación en su ADN. El proceso por el cual una célula normal adquiere la capacidad de invasión de otros tejidos se denomina, según la Asociación Española contra el Cáncer (AECC, 2015), **carcinogénesis** y puede durar años, presentando unas fases bien definidas:

- **Primera fase:** comienza cuando las sustancias responsables de producir las transformaciones (agentes cancerígenos) actúan sobre la célula modificando su material genético (mutación ADN) iniciando así un periodo de multiplicación a una velocidad superior a la normal. Como menciona Martin de Civetta y cols. (2011) la célula normal se transforma en una célula “anárquica”, produciendo una situación irreversible pero insuficiente para desarrollar el cáncer.
- **Fase de promoción:** las células transformadas comienzan con nuevas mutaciones superando los mecanismos moleculares de defensa, de los que depende la replicación normal: apoptosis o muerte celular programada,

proteínas anticiclina, proteínas del complejo NER y acortamiento de telómeros.

- **Fase de progresión:** las células promocionadas adquieren la capacidad de invasión, tanto a nivel local infiltrando los tejidos, como a distancia, proceso conocido como metástasis. Estarían implicados en este proceso factores de angiogénesis, capaces de estimular la producción de vasos para aportar el oxígeno necesario ante el incremento metabólico adyacente que, como refleja Colville-Nash y cols. (1997) constituye el requisito indispensable para el inicio de la cascada metastásica.

Figura 1. Gráfico que refleja la pérdida de control del crecimiento normal de una célula (INC, 2015).



1.1.3. Epidemiología del cáncer

1.1.3.1. Situación global

El cáncer es una de las enfermedades más comunes y graves de la medicina clínica y una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según estadísticas ofrecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), en 2012 causó un total de 8,2 millones de defunciones. La mayor mortalidad, por orden de frecuencia, se produce en el cáncer de pulmón, hígado, estómago, colon y mama. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, constituye la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general y, alrededor del 70%, de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. El proyecto GLOBOCAN de la OMS (GLOBOCAN, 2012), encargado de proporcionar estimaciones contemporáneas de la incidencia, mortalidad y prevalencia de los principales tipos de cáncer, estima que los casos anuales de cáncer aumentarán considerablemente, pasando de 14 millones en el año 2002 a 22 millones en las próximas dos décadas.

1.3.1.2. Situación nacional

La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM, 2014) publica anualmente las cifras relacionadas con la epidemiología del cáncer en España, en función de los informes publicados por GLOBOCAN, organismo especializado para el cáncer de la OMS. Los datos de incidencia del cáncer en España en 2012 fueron de 215.534 casos, con una tasa estandarizada por edad de 215,5 casos por 100.000 habitantes por año, y un riesgo de presentar cáncer antes de los 75 años de 25,1%.

Los 5 cánceres más frecuentes en España en 2012 fueron los siguientes, por orden de incidencia: próstata, pulmón, colorrectal, vejiga y estómago en el sexo masculino y, mama, colorrectal, cuerpo de útero, pulmón y ovario en el femenino.

Con respecto a la mortalidad por cáncer en España en 2012, el número de muertes fue de 102.762 casos, con una tasa estandarizada por edad de 98,1 casos por 100.000 habitantes por año, y un riesgo de fallecer por cáncer antes de los 75 años de 10,2%.

1.2. Cáncer Epidermoide de Cabeza y Cuello (CECC)

1.2.1 Definición y localización anatómica

Se define el CECC como el grupo de tumores malignos que se originan en la mucosa de las vías aerodigestivas superiores (VADS), y que representan alrededor del 90% de los cánceres de cabeza y cuello (Greenlee y cols., 2001). Según Lefebvre y cols. (1996) podemos distinguir tres grupos:

- **Grupo cavidad oral, faringe y laringe:** habitualmente reflejan carcinomas epidermoides con mayor o menor grado de diferenciación, íntimamente relacionados con el tabaco y el alcohol.
- **Grupo fosas nasales-cavidades nasosinusales:** se desarrollan en el epitelio de revestimiento de las fosas nasales y senos paranasales. Raramente se encuentran influenciados por el tabaco.
- **Grupo nasofaringe:** representados por carcinomas epidermoides, a menudo poco diferenciados, sin relación etiológica con el tabaco y el alcohol, pero sí con el Virus de Epstein-Barr (VEB).

Se excluyen, por lo tanto, de esta clasificación los cánceres que afectan a las glándulas salivares mayores (parótida, submaxilar y sublingual) y a la glándula tiroides. En la clasificación de CECC no se incluyen tumores que producen algunas alteraciones en la piel, tejidos blandos y óseos.

Las localizaciones más frecuentemente dañadas son la cavidad oral, faringe y laringe, que constituyen el objeto de estudio de este trabajo.

1.2.2. Epidemiología del CECC

El CECC representa el sexto cáncer por frecuencia en todo el mundo (Gil y cols., 2009), con una incidencia mundial anual de 700.000 pacientes (Parkin y cols., 2005). En 2013, en Estados Unidos hubo una estimación de 53.640 nuevos casos de tumores de cabeza y cuello (cavidad oral, faringe y laringe), de los cuales el 95% correspondieron a CECC. Las tasas de supervivencia a los cinco años han permanecido estables en las últimas tres décadas para los cánceres de cavidad bucal y faringe, con cifras que se encuentran alrededor del 65%; a diferencia de estas cifras, el cáncer de laringe ha presentado cambios en su forma de tratamiento y con ello, cifras decrecientes de supervivencia a los cinco años en las últimas tres décadas, con cifras que varían desde el 66% (1975-1977) al 63% (2002-2008) (American Cancer Society, 2013).

La incidencia en nuestra zona geográfica es notablemente más elevada que en el resto de Europa. Ferlay y cols. (2010), en su informe GLOBOCAN, describieron al estado español como una de las regiones del mundo con una incidencia más elevada de CECC. En el año 2002 se diagnosticaron en España un total de 11.513 nuevos pacientes con CECC, de los cuales 10.154 fueron diagnosticados en hombres (88,2%) y 1.359 en mujeres (11,8%).

1.2.2.1 Epidemiología del cáncer de laringe

El cáncer de laringe es el tumor maligno más frecuente de cabeza y cuello, excluyendo los tumores de la glándula tiroides. Representa el segundo tumor maligno con mayor frecuencia en el aparato respiratorio después del cáncer de pulmón (ACS, 2006) y constituye el séptimo tumor en cuanto a prevalencia en el sexo masculino. En la Unión Europea, la incidencia en el año 2012 fue de 8,3 casos por 100.000 habitantes, con una mortalidad de 4,3 por 100.000 habitantes (Ferlay y cols., 2013).

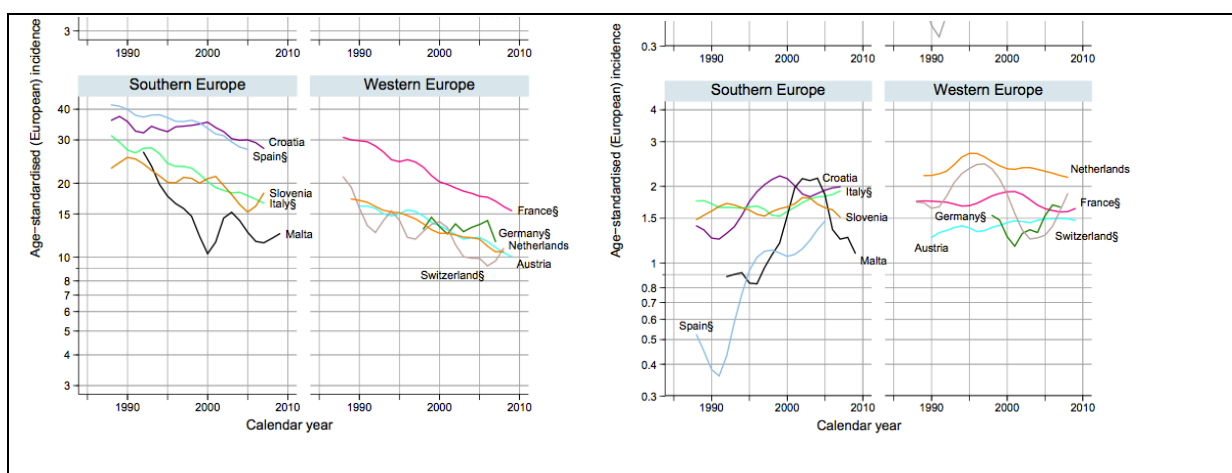
La incidencia de cáncer de laringe estimada en España en el año 2012 fue de 1,1 casos/ 100.000 habitantes para las mujeres y de 12,6 casos /100.000 habitantes para los varones, con una tendencia a disminuir en los varones y a aumentar en las mujeres, lo cual esta en probable relación con un cambio en los hábitos tóxicos de la sociedad (GLOBOCAN, 2012). Atendiendo a las estimaciones publicadas por Ferlay y

cols. (2013) para 40 países en la Unión Europea en 2012, España representa el cuarto país de la UE con una mayor incidencia de cáncer de laringe, con una estimación de 2.914 casos por 100.000 habitantes, tan solo superado por Rusia, Italia y Alemania. Teniendo en cuenta las tasas de mortalidad, ocupa el cuarto lugar en la UE, por detrás de Rusia, Ucrania, Italia y Polonia con cifras de 1235 por 100.000.

Las comunidades Autónomas de Asturias, País Vasco, Murcia y Zaragoza presentan una incidencia superior al resto de las comunidades para los hombres. Sin embargo, la mortalidad es más elevada en Cantabria. En mujeres, la incidencia varía desde 0,2 casos hasta 1,1 casos por 100.000 mujeres, dependiendo de la Comunidad Autónoma.

El cáncer de laringe es más frecuente en edades comprendidas entre los 60 y los 79 años de edad (Markou y cols., 2013). Son más que conocidas las diferencias relacionadas con el sexo, siendo la neoplasia con más alta tasa de hombre/mujer en la mayoría de las poblaciones. Esta relación está cambiando considerablemente; en 1956 la ratio era de 15:1 a favor de los hombres, mientras que los estudios actuales muestran una ratio de 5:1 (Davies y cols., 2006); tendencia que puede deberse a los predecibles efectos del cambio en el patrón de consumo de tabaco entre sexos (Lortet-Tieulent y cols., 2013).

Figura 2. Tendencias en la incidencia de cáncer de laringe en Europa, estandarizadas por edad en hombres y mujeres de 35 a 74 años, desde 1988 hasta 2010. (Lortet-Tieulent y cols., 2013).



1.2.2.2. Epidemiología del cáncer oral y faríngeo

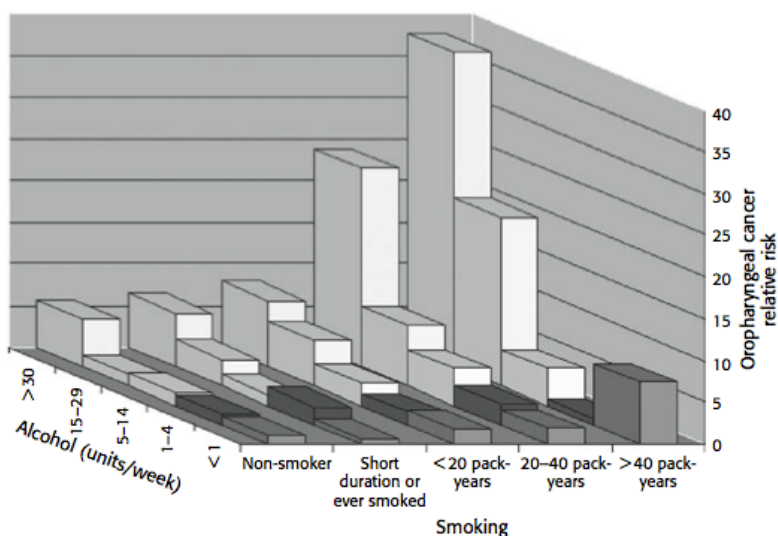
El cáncer epidermoide de cavidad oral representa una enfermedad que afecta a más de 300.000 personas/año, en todo el mundo (Parkin y cols., 2005). La Sociedad Americana del Cáncer (ACS, 2006) presenta cifras de prevalencia de este tipo de cáncer del 3% de todos los tumores malignos en hombres y del 2% en mujeres.

1.2.3. Factores etiológicos asociados al CECC

La prevalencia relativa de estos y otros factores de riesgo contribuye a las variaciones en la distribución observada del CECC en las diferentes áreas del mundo.

Según estudios de Blot y cols. (1988), al menos el 75% de los CECC diagnosticados en Europa, Estados Unidos y otras regiones industrializadas son atribuibles a la combinación de tabaquismo y consumo de alcohol; sin embargo, las contribuciones respectivas de estos factores de riesgo al cáncer de cabeza y cuello son difíciles de estudiar debido a la fuerte asociación entre estos dos hábitos (Waddell y cols., 2000). La posibilidad de un origen multifactorial parece la más coherente en el momento actual (Prades, 2004).

Figura 3. Riesgo relativo de desarrollar cáncer oral y faríngeo en hombres, de acuerdo al uso de tabaco y alcohol. (Blot y cols., 1988).



1.2.3.1. Tabaco

El tabaco inhalado de forma activa en pipa o en cigarrillo se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de CECC, según un estudio publicado por la International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium (Wyss y cols., 2013)

El tabaco, como agente carcinógeno esencial, actúa directamente sobre la mucosa de las VADS, produciendo una serie de cambios anatomofisiológicos consistentes en la hiperplasia generalizada con metaplasia, edema e inflamación crónica de la submucosa por el efecto irritativo local relacionado con ciertos componentes del humo, como los fenoles y aldehídos; dichos cambios conllevan a una disminución del movimiento ciliar y a una inflamación crónica de la mucosa. Han sido identificados más de 30 agentes cancerígenos del tabaco, entre los que destacan la nicotina, la acroleína, el monóxido de carbono y, especialmente, hidrocarburos aromáticos presentes en el alquitrán. De estos últimos sobresale, por su poder cancerígeno, el benzopireno, considerándose el factor más reconocido como responsable del cáncer de laringe (Lefebvre y cols., 1996).

A pesar de la estrecha relación entre hábito tabáquico y cáncer, entre un 5-30 % de pacientes, que nunca han sido fumadores, padecen este tipo de cáncer (Baron y cols., 1993); lo que explica la asociación de estos tumores con otros agentes, por ejemplo con la inhalación de humos procedentes del diesel, así como con la inhalación pasiva del tabaco, entre otros (Vassileiou y cols., 2012).

En los últimos años se está produciendo una disminución importante en la prevalencia del tabaquismo en los hombres en toda Europa, y un cambio de tendencia de hábito al alza en las regiones europeas entre las mujeres (Lortet y cols., 2013), lo que podría justificar el incremento en la incidencia del CECC en el sexo femenino

1.2.3.2. Alcohol

El hábito alcohólico se ha erigido, según diferentes estudios, entre ellos los de Menezes y cols., (2013), como factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de cáncer, como el de cavidad oral, faringe, laringe, esófago, estómago y recto.

El consumo de alcohol fue considerado por Nelson y cols. (2013) como la principal causa de 18.200 a 21.300 muertes en pacientes con cáncer o, lo que es lo mismo, a un porcentaje que varía entre el 3,2 y 3,7% de las muertes por cáncer en la población estadounidense en el periodo de un año. El consumo de alcohol aumenta, de forma independiente, el riesgo de cáncer en el tracto digestivo superior, aunque a menudo es difícil separar los efectos del tabaco y del alcohol (Kato y cols., 1994).

El alcohol es un factor de riesgo independiente para el cáncer epidermoide de la cavidad oral (Feller y cols. 2013). Presenta un alto riesgo de cancerogénesis inducida por el contacto sobre la superficie mucosa en la región faríngea posterior e hipofaríngea (Bruguere y cols., 1986). La mucosa de la región glótica laríngea no tiene un contacto directo con el alcohol, por lo que solamente un consumo muy elevado de éste se relaciona de forma independiente con el cáncer de laringe. La Vecchia y cols. (2008) apreciaron diferencias respecto al efecto del alcohol en el cáncer de laringe y su localización; es decir, el cáncer de la región supraglótica estaría más fuertemente relacionado con el consumo de alcohol en comparación con el de la región glótica y subglótica.

Este papel del alcohol, como agente precursor del CECC, ha sido difícil de demostrar, puesto que su principal componente (etanol), no es cancerígeno en sí mismo, sino más bien algunos de sus metabolitos como el acetaldehído (Acetaldehyde, 1985). Se han identificado variantes genotípicas de enzimas implicadas en el metabolismo del alcohol, siendo una de las más estudiadas el alcohol deshidrogenasa (ADH), cuyas variables polimórficas ADH1 se asocian a incrementos en el riesgo de cáncer, mientras que la ADH2 va asociada a un efecto protector (Schuckit, 1999).

El alcohol también actúa sinérgicamente con los productos de la combustión del tabaco en la patogénesis del CECC. Según Hashibe y cols. (2007) el tabaquismo aparece como factor de riesgo para el cáncer de cabeza y cuello entre los no bebedores, con el riesgo más alto para el cáncer de laringe. Si los bebedores nunca hubieran fumado cigarrillos, se habría evitado, aproximadamente, una cuarta parte de los cánceres de cabeza y cuello en este grupo.

1.2.3.3. Situación socioeconómica

En la literatura científica de los últimos años, se encuentran citas bibliográficas que relacionan directamente el CECC con una situación económica y social baja o desfavorable (Santi y cols., 2013; Adrien y cols., 2014) relacionada con una atención sanitaria deficiente y, por lo tanto, con diagnósticos en estadios más avanzados.

La relación entre las desigualdades sociales y el cáncer de laringe ha sido mencionada, en los últimos años, por diversos autores. Conway y cols. (2008) encontraron una asociación significativa entre el bajo nivel socioeconómico y el riesgo de cáncer oral. Otros investigadores, como Menvielle y cols. (2004), evaluaron cuantitativamente las proporciones atribuibles al estilo de vida y a la exposición laboral, utilizando diversos indicadores socioeconómicos como la educación y la clase ocupacional para el cáncer de laringe y de hipofaringe. Boing y cols. (2011) llegan a la conclusión que las diferencias socioeconómicas explican la distribución de hábitos tabáquicos y alcohólicos en los estratos más desfavorables y su relación con el CECC.

1.2.3.4. Factores dietéticos

Algunos factores dietéticos pueden estar relacionados, igualmente, con la propensión a desarrollar CECC; mientras que otros, pueden aumentar la susceptibilidad. Estudios desarrollados por Freedman y cols. (2008), Boeing y cols. (2006), de forma prospectiva, apoyan la hipótesis de que una dieta rica en frutas y verduras se asocia con un menor riesgo en el desarrollo de CECC. Las localizaciones anatómicas de la cavidad oral y pared posterior faríngea son las que parecen estar más relacionadas en la asociación entre el hábito dietético y la aparición del cáncer. Las combinaciones de bajo consumo de frutas y verduras y el alto consumo de carne, tabaco y alcohol, aumentan el riesgo de cáncer epidermoide de cavidad oral y faringe en 10 o 20 veces más (Bravi y cols., 2013). Esta asociación podría estar más vinculada a los países desarrollados, donde la dieta rica en grasas monoinsaturadas puede representar del 20 al 25% de los cánceres epidermoides orales y faríngeos (Garavello y cols., 2009)

1.2.3.5. Agentes infecciosos

1.2.3.5.1. Virus Epstein- Barr (VEB)

Este virus se asocia al carcinoma nasofaríngeo y al linfoma de Hodgkin. El virus parece favorecer la proliferación linfoide de los tumores que poseen un estroma rico en linfocitos, como el linfoepitelioma, por lo que su papel patogénico es bastante limitado en el resto de los CECC.

Muderris y cols. (2013), de acuerdo con los resultados expuestos en un estudio prospectivo para valorar la posible relación entre el VEB y el carcinoma epidermoide de laringe, muestran que, a pesar de que este virus está presente en algunas células escamosas del cáncer de laringe, su presencia no tiene ninguna relación con la patogenia del mismo. A pesar de la alta tasa de coinfección por los Virus del Papiloma Humano (VPH) y del VEB, en los cánceres orofaríngeos amigdalares no se ha podido demostrar la aparición del VEB, de forma independiente, como agente causal (Jiang y cols., 2014).

1.2.3.5.2. Virus Papiloma Humano (VPH)

El VPH es un virus de tamaño pequeño, no encapsulado, con una estructura icosaédrica y una doble cadena de ADN circular de 7.500 a 8.000 pb. Pertenece a la familia de los Papovaviridae, incluida en el género Papilomavirus.

Usualmente, el resultado de la infección es la formación de un crecimiento benigno, verruga, o papiloma, ubicado en cualquier lugar del cuerpo. Genotípicamente, aunque existen más de 100 genotipos descritos, el VPH puede ser ampliamente dividido en "alto riesgo" (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y "bajo riesgo" (6, 11, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 61, 72, 73 y 81), en base a su asociación fenotípica con el desarrollo de cáncer de cuello uterino. Los tipos VPH-6 y VPH-11 son considerados de bajo riesgo y se asocian con papilomatosis del tracto respiratorio y genital; los tipos VPH-16 y 18 son de alto riesgo y se asocian con CECC y con lesiones precursoras de carcinoma, como leucoplasia y liquen plano (Sanclemente,

2003; Campisis y cols., 2004).

El mecanismo por el que el virus induce a la formación de CECC no ha sido del todo aclarado y es controvertido. Un mecanismo sería la inactivación de p53 por la oncoproteína E6 del HPV. La presencia de HPV se ha relacionado también con la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (Van Houten y cols., 2001). Estudios epidemiológicos, como el realizado por Gilison y cols. (2004) presentaron cifras más elevadas de VPH en pacientes jóvenes que no consumen alcohol ni tabaco.

Paradójicamente, como explica Gallego Hernández y cols. (2007), a pesar de que el VPH parece ser un factor de riesgo para el CECC, su presencia ha sido identificada como un factor de buen pronóstico, por lo que los pacientes en los que se detecta DNA viral tienen mejor control y supervivencia. Sin embargo, esta observación podría relacionarse con la menor frecuencia de tabaquismo-alcoholismo en ese grupo (Hoffman y cols., 2005). Gillison y cols. (2000), en su trabajo de supervivencia en relación a los cánceres orofaríngeos y la coinfección con VPH, destacaron que en los pacientes con tumores VPH positivos el riesgo de muerte era un 59% inferior respecto al resto (VPH negativos).

1.2.4. Historia natural y estudio anatomopatológico del cáncer epidermoide faringolaríngeo

1.2.4.1. Estados Precancerosos

Los estados precancerosos son todas aquellas lesiones que se producen en una etapa común previa al cáncer. La OMS (WHO, 1987) define las lesiones premalignas faringolaríngeas como las alteraciones de la mucosa causadas por la irritación crónica de factores locales, presentando una alta probabilidad de degeneración en carcinoma con respecto a la mucosa circundante, e incluyen las siguientes lesiones: leucoplasia, eritroplasia, hiperplasia y displasia. Alrededor del 90% de los tumores malignos faringolaríngeos son carcinomas que han evolucionado desde lesiones premalignas (Kleinsasser, 1963). Toda eritroplasia mostrará, presumiblemente, signos histológicos

de displasia en el 51% de los carcinomas invasivos y en el 40% de los carcinoma “in situ” o displasia grave (Livolsvi, 2003).

1.2.4.1.1. Sistemas de Clasificación

Las displasias se subdividen clásicamente en función del grado de atipia arquitectónica y citológica (Eversole, 2009). En la laringe, los sistemas más frecuentes empleados, son los presentados por la OMS y los sistemas de Ljuljana (Sengiz y cols., 2004). Todavía se sigue utilizando la clasificación de la OMS, mayoritariamente; la de Ljuljana, aunque es más específica, no la utilizan todos los patólogos en la práctica habitual. Las lesiones precancerosas orales se clasifican normalmente según la OMS (WHO, 2005).

Clasificación Ljuljana

En la **clasificación Ljuljana**, las lesiones precancerosas laríngeas se dividen en tres categorías, en función de las etapas de progresivos cambios displásicos:

- **Hiperplasia simple:** se caracteriza por el engrosamiento epitelial sin cambios citológicos anormales.
- **Hiperplasia anormal:** representada por papilas epiteliales e hiperplasia de la lámina basal.
- **Hiperplasia atípica:** representada por la atipia citológica que se extiende hacia los estratos superiores.
- **Carcinoma in situ:** está reservada para aquellas lesiones con pronunciada atipia inferior y una pérdida de la estratificación normal.

Clasificación OMS

La **Clasificación OMS** establece tres etapas que incluyen la displasia leve, moderada y grave, flanqueada por hiperplasias benignas o queratosis en el extremo benigno del espectro y carcinoma in situ en el extremo maligno.

- **Displasia de bajo grado:** se define como cambios citológicos y atipias arquitectónicas confinadas a la capa basal / parabasal.
- **Displasia moderada:** se caracteriza por cambios atípicos que progresan en la capa espinosa medial.
- **Displasia severa:** progresa la atipia en la capa espinosa superior.
- **Carcinoma in situ:** se caracteriza por cambios atípicos de arriba abajo. Muchos patólogos consideran la displasia grave y carcinoma “in situ” como una sola categoría.

Tabla 1. Clasificación de Ljuljana y OMS para lesiones premalignas.

Clasificación de Ljuljana	Clasificación OMS
Hiperplasia Simple	Queratosis Benigna
Hiperplasia Anormal	Displasia Leve
Hiperplasia Atípica	Displasia Moderada
	Displasia Severa

Figura 4. Etapas en la progresión del cáncer epidermoide de localización faríngea y laríngea. (Shah y cols., 2011).

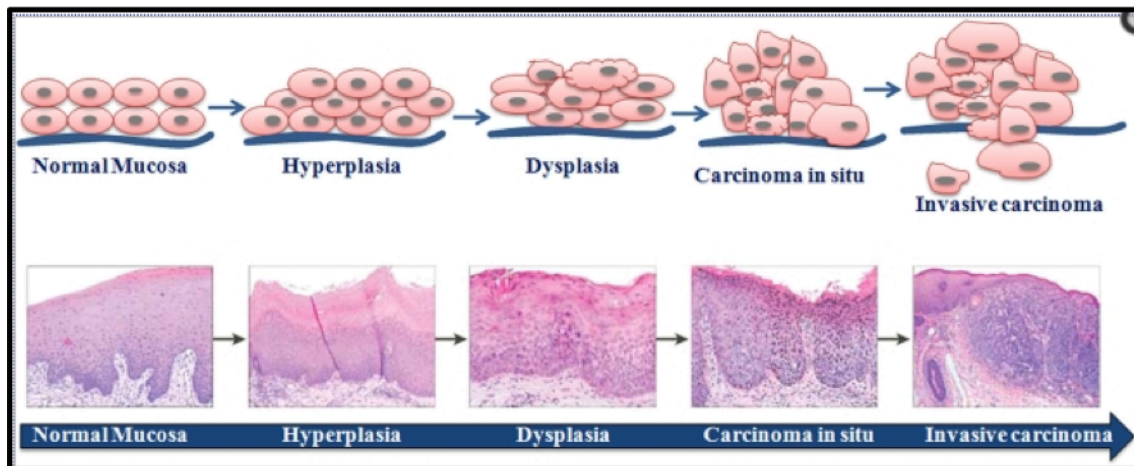


Figura 5. Imágenes correspondientes a la visualización de las cuerdas vocales mediante microlaringoscopia. a) Queratosis cuerda vocal izquierda, b) displasia bilateral, c) lesión hiperplásica cuerda vocal derecha, d) eritroplasia derecha. (Arsheed y cols., 2010).

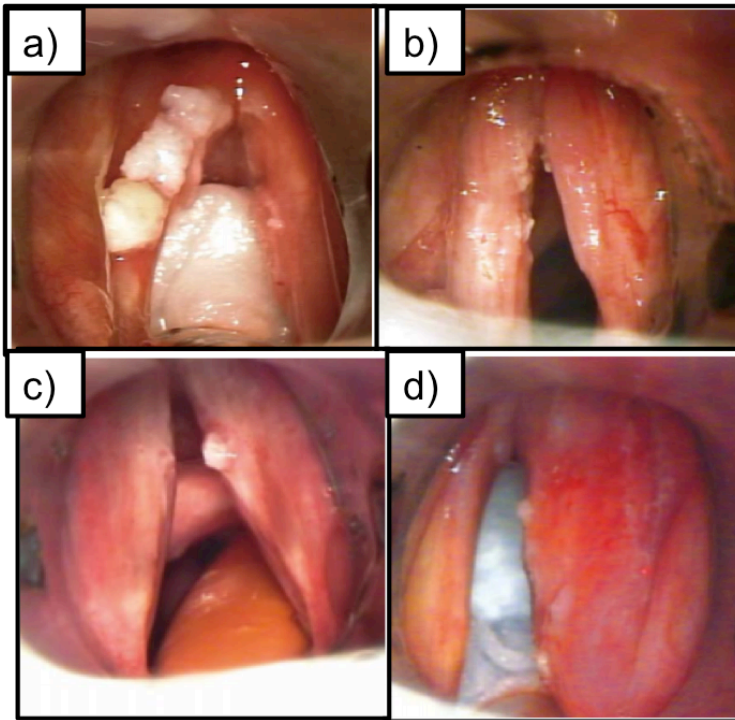
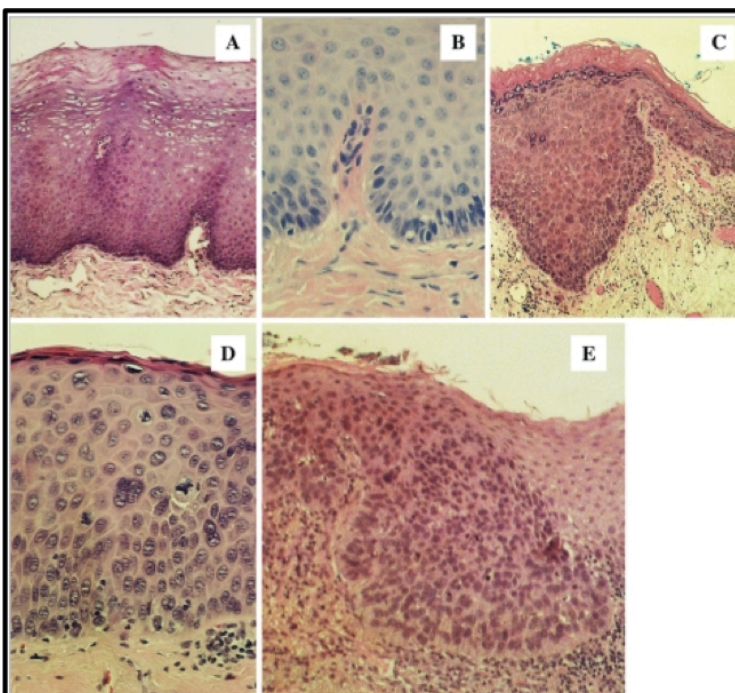


Figura 6. Clasificación WHO, para lesiones precancerosas orales y laríngeas. A: hiperplasia benigna (queratosis); B: displasia moderada; C: displasia moderada; D: Displasia severa; E: carcinoma in situ. (Eversole, 2009).



1.2.4.2. Anatomía Patológica del cáncer faringolaríngeo

La clasificación que se utiliza actualmente para el estudio anatomopatológico de los tumores de la cabeza y Cuello es la última versión creada por la OMS (2005). En ella se incorporó por primera vez el papel del patólogo como elemento importante en el equipo multidisciplinar que aborda estos tumores, incluyendo definiciones de los espacios laríngeos, faríngeos y de la tráquea (Ereño, 2007).

Existen diferentes formas de expresión anatomopatológica en la localización faringolaríngea: carcinoma de células escamosas, glandulares, neuroendocrinos, de cartílago y hueso..., representados en la Tabla 2.

El carcinoma de células escamosas, derivado del epitelio, representa alrededor del 95% de los tumores malignos de esta localización, asociado al consumo del tabaco y del alcohol, así como, a la coinfección por el VPH. Dependiendo de la maduración de las células epiteliales, se puede clasificar en tres grupos pronósticos:

- **C.E. Bien Diferenciado (G1):** sus células presentan una notable similitud con el epitelio plano estratificado normal, dando lugar a la formación de perlas córneas secundarias al proceso de queratinización.
- **C.E. Moderadamente Diferenciado (G2):** sus células presentan menor queratinización, con pleomorfismo nuclear y actividad mitótica.
- **C.E. Mal o Pobremente Diferenciado (G3):** sus células muestran numerosas mitosis atípicas con predominio inmaduro y escasa queratinización.

Tabla 2. Clasificación histológica (OMS, 2005) de tumores de hipofaringe, laringe y tráquea.

Tumores Malignos Epiteliales	Tumores de Tejidos Blandos
Carcinoma Celular Escamoso	Liposarcoma
Carcinoma Verrucoso	Leiomiomasarcoma
Carcinoma Basocelular	Angiosarcoma
Carcinoma Escamoso Papilar	Fibrosarcoma
Carcinoma Sarcomatoide	Histiocitoma Fibroso Maligno
Carcinoma Adenoescamoso	Sarcoma de Kaposi

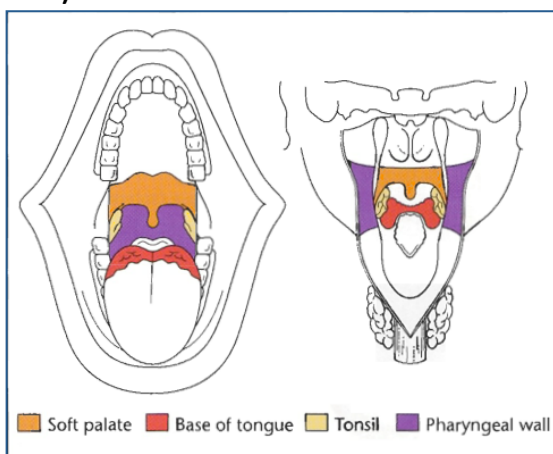
<p>Carcinoma de Células Gigantes</p> <p>Carcinoma Linfoepitelial</p> <p>Tumores Malignos tipo Glandular</p> <p>Carcinoma Mucoepidermoide</p> <p>Carcinoma Adenoide Quístico</p> <p>Tumores Neuroendocrinos</p> <p>Carcinoide Atípico</p> <p>Carcinoide Típico</p> <p>Carcinoma de Células Pequeñas</p>	<p>Tumores Hematolinfoideos</p> <p>Tumores de Hueso o Cartílago</p> <p>Condrosarcoma</p> <p>Osteosarcoma</p> <p>Osteoclastoma</p> <p>Melanoma Mucoso</p>
--	---

1.2.5. Principios anatómicos, fundamentos y extensión local del cáncer faringolaríngeo

1.2.5.1. Anatomía del órgano faríngeo: Orofaringe e hipofaringe

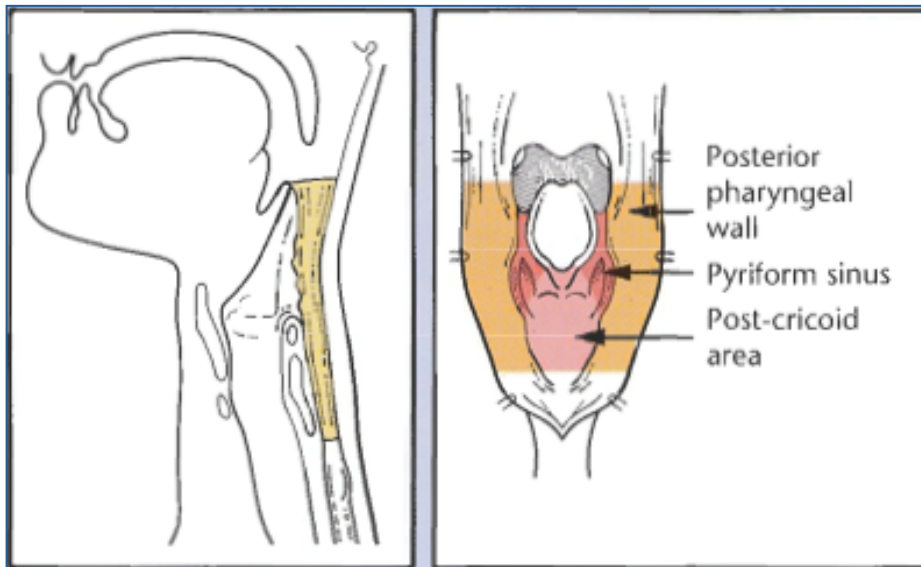
La **orofaringe** representa una encrucijada entre la vía deglutoria, fonatoria y respiratoria. Comprende las regiones anatómicas que van desde el paladar blando hasta la base de la lengua, incluyendo pilares amigdalinos, fositas amigdalinas y pared posterior faríngea.

Figura 7. Representación esquemática faríngea: orofaringe e hipofaringe. (Shah y cols., 2004).



La **hipofaringe** se extiende anatómicamente desde el hueso hioides hasta el cartílago cricoides e incluye a los senos piriformes, el área postcricoides y la pared faríngea.

Figura 8. Representación esquemática faríngea: orofaringe e hipofaringe. (Shah y cols., 2004).

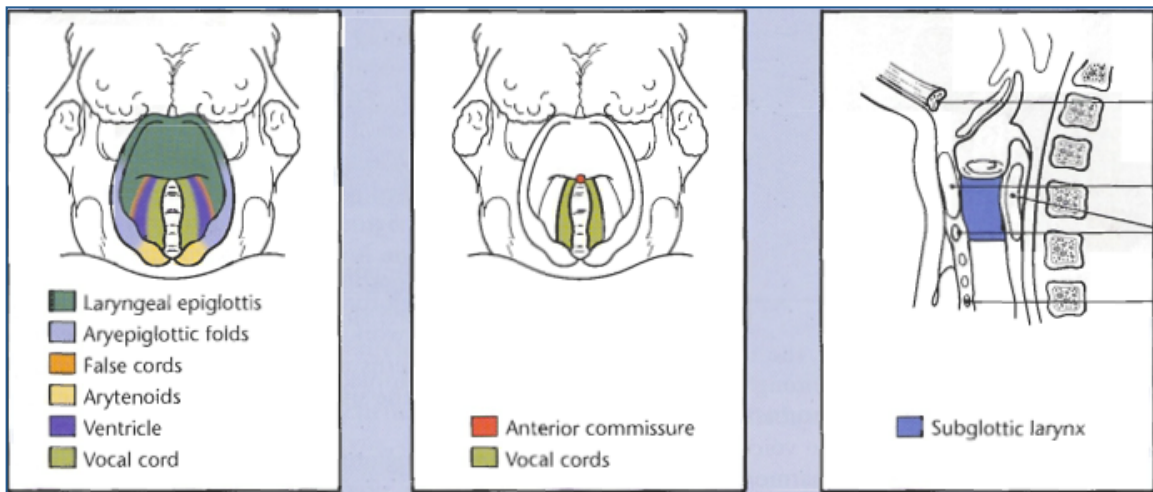


1.2.5.2. Anatomía y extensión tumoral del órgano laríngeo

El órgano laríngeo es el responsable de la fonación, con un papel esencial en la respiración, la deglución y en la protección de la vía aérea. La laringe está dividida en tres regiones anatómicas diferentes, basadas en su origen y crecimiento embriológico, y que tienen implicaciones clínicas importantes:

- **Región Supraglótica:** abarca la vertiente laríngea del cartílago epiglótico, aritenoides, pliegues aritenoepiglóticos, bandas o cuerdas vocales falsas y ventrículos laríngeos
- **Región Glótica:** representada por las cuerdas vocales verdaderas y la comisura anterior.
- **Región Subglótica:** región laríngea que queda inmediatamente inferior a la glotis, hasta el límite inferior del cartílago cricoides.

Figura 9. Representación esquemática laríngea. Supraglotis, glotis y subglotis. (Shah y cols., 2004).



Los tumores de localización supraglótica engloban a todos aquellos tumores localizados desde la región epiglótica hasta el límite inferior de los ventrículos laríngeos, constituyendo una encrucijada faringolaríngea con diferentes direcciones en la propagación tumoral (Figura 10):

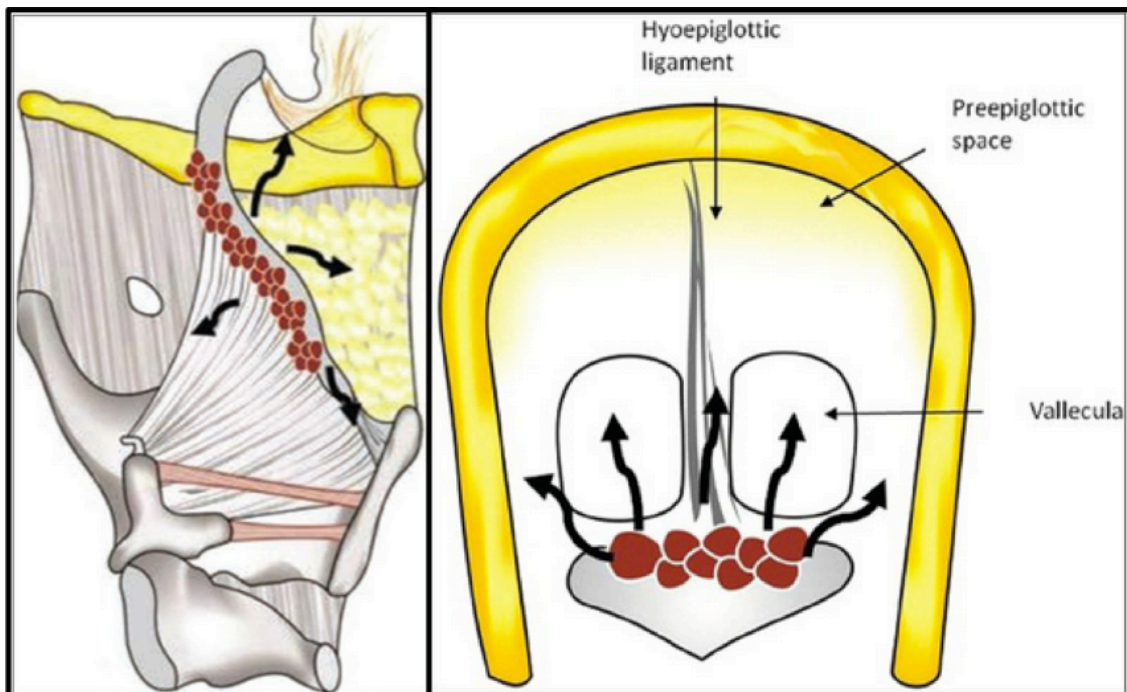
- **Zona marginal laríngea:** suelen comenzar a partir del borde libre de la epiglotis con invasión ulterior en sentido anterior hacia la cara lingual de la misma para, posteriormente, extenderse hacia la vallécula, inferiormente hacia la cara laríngea de epiglotis y, lateralmente, hacia los repliegues. A partir del repliegue glosopiglótico, la extensión puede realizarse en sentido inferior hacia la cara medial del seno piriforme. En profundidad pueden causar bloqueo de la hemilaringe afectada por infiltración del muro faringolaríngeo.
- **Cara laríngea de la epiglotis:** con posible extensión en superficie hacia las bandas ventriculares, los repliegues aritenoepiglóticos y la zona de la comisura anterior de las cuerdas vocales. La extensión en profundidad se produce hacia el espacio hiotiroepiglótico y hacia el espacio paraglótico.
- **Bandas ventriculares:** la extensión puede extenderse, superiormente, hacia el repliegue aritenoepiglótico y aritenoides, inferiormente, hacia el ventrículo y,

anteriormente, hacia el pie de epiglotis, pudiendo infiltrar lateralmente el espacio preepiglótico.

- **Ventrículos:** la extensión puede dirigirse, superiormente, hacia la banda ventricular, en sentido inferior a través del espacio paraglótico, hacia la subglotis tras la ruptura del cono elástico, y hacia delante, a lo largo del suelo del ventrículo, hacia la cuerda o, hacia atrás, en dirección a la hipofaringe.

No siempre se puede distinguir el origen primario de los tumores de epilaringe, con respecto a la localización hipofaringea, por lo que algunos estudios los incorporan en la clasificación de supraglóticos. En relación a esta manifestación, se ha descrito que la epilaringe y la hipofaringe quedan más expuestas a sustancias ingeridas, mientras que la glotis a sustancias inhaladas (Tuyns y cols., 1988).

Figura 10. Tumoración supraglótica derivada de la epiglotis. Plano sagital y coronal que muestra las vías de propagación (flechas de coloración negra) de la masa epiglótica (coloración roja). (Varsha y cols., 2012).

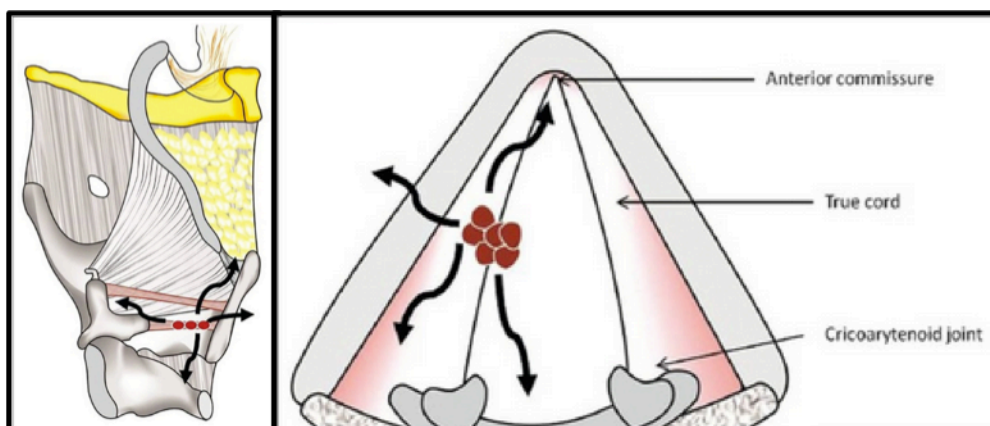


Los **tumores de localización glótica** afectan a las cuerdas vocales de forma primaria, pudiéndose extender en las diferentes localizaciones. Anteriormente, hacia la comisura anterior y después a la cuerda contralateral. En sentido posterior, hacia el aritenoides. Hacia arriba, al nivel supraglótico, a través del ventrículo y, luego las bandas ventriculares. Por último, inferiormente, hacia la vertiente subglótica de la cuerda vocal. Estos diferentes modos de extensión explican que la inmovilidad de la cuerda vocal pueda deberse a un simple efecto masa o a un bloqueo aritenoideo por la infiltración en los planos musculares y ligamentosos, relacionado con peor pronóstico.

La **comisura anterior de la laringe** es la zona de unión de las dos cuerdas vocales con el cartílago tiroideo. Embriológicamente deriva de una banda de mesénquima separada; esta subunidad tiene unas características anatómicas peculiares de extraordinario valor pronóstico, tales como la pérdida de pericondrio, sustituido por el ligamento de Broyle, una osificación precoz del cartílago y una mucosa estrechamente adherida al cartílago (Rucci y cols.,1996).

La afectación clínica de la comisura anterior puede significar muchas cosas que, en ocasiones, pueden ser difíciles de diferenciar en la clínica: lesiones superficiales de T1 glóticas que se extienden hasta la mitad ipsilateral de la comisura anterior sin extensión más allá hacia el lado contralateral; lesiones en "herradura", aquellas que surgen de la comisura anterior con o sin extensión supraglótica o subglótica, y lesiones ulcerosas que surgen de la comisura anterior, constituyendo todos estos tumores de la "comisura anterior" pero estadios y pronósticos diferentes (Bradley y cols., 2006) Estos diferentes subtipos y la ausencia de estratificación en la mayoría de los estudios sobre los resultados del tratamiento con radioterapia, cirugía abierta o cirugía láser transoral pueden, en parte, explicar la actual controversia en cuanto a la modalidad de tratamiento óptimo para estos tumores (Hartl y cols., 2011).

Figura 11. Tumoración glótica. Plano sagital y coronal que muestra las vías de propagación (flechas de coloración negra) de la masa glótica (coloración roja). (Varsha y cols., 2012).



Los tumores primarios subglóticos son extraordinariamente raros. En la práctica habitual solemos ver tumores en esta localización que, realmente, son extensiones de tumores glóticos o supraglóticos. En su caso, la extensión se realiza, sobre todo, en sentido inferior con afectación traqueal. La extensión también puede realizarse anterolateralmente hacia el cartílago cricoideo y a través de la membrana cricotiroidea hacia las estructuras prelaríngeas. La extensión superior es más excepcional debido a la presencia del cono elástico como barrera natural.

1.2.6. Extensión ganglionar y capacidad metastásica del cáncer faringolaríngeo

En el momento del diagnóstico, el 50% de los pacientes con CECC presentan metástasis regionales, bien clínicas o bien subclínicas (Lindberg, 1972). En otros estudios se presentan cifras de incidencia de metástasis subclínicas que oscilan entre el 20 y el 50% (Snyderman y cols., 1985; Barroso y cols., 2012).

1.2.6.1. Afectación ganglionar

El estado de los ganglios linfáticos en el cuello constituye el factor más importante para el pronóstico en el CECC (Werner y cols., 2002). En función de la localización y la extensión del tumor primario, podremos intuir la afectación ganglionar cervical, gracias al conocimiento de su vascularización:

- **Los tumores de hipofaringe** componen un subtipo de tumores con gran capacidad de extensión linfática. Según Barroso y cols. (2012) los pacientes con cáncer en la hipofaringe presentaban un mayor porcentaje de enfermedad metastásica oculta de cuello, comparados con el cáncer de localización primaria laríngea, en cualquiera de sus 3 sublocalizaciones.
- **Los tumores supraglóticos** representan los tumores laríngeos más linfófilos debido a su rica red linfática. La enfermedad ganglionar, en los niveles cervicales II y III, es un hallazgo frecuente en estos pacientes.
- **Los tumores glóticos** tienen una red linfática prácticamente inexistente, por lo que, en estadios iniciales de la enfermedad, la aparición de metástasis ganglionares es poco frecuente (<10%), pero, siempre y cuando, los tumores se limiten verdaderamente a esta región (Chu y cols., 2010).
- **Los tumores subglóticos** tienden a permanecer clínicamente silentes. A pesar del drenaje linfático relativamente escaso de esta región, este tipo de tumores tienen un mal pronóstico ya que la aparición de metástasis en los ganglios linfáticos es relativamente común en la cadena ganglionar recurrential pretraqueal y paratraqueal (Chu y cols., 2010).

1.2.6.2. Capacidad metastásica y expansiva.

El cáncer faringolaríngeo es una enfermedad local y regional, siendo las metástasis a distancia, en general y afortunadamente, escasas y generalmente, en fases muy avanzadas. La frecuencia de estas metástasis a distancia de los CECC es variable según la literatura, con rangos que oscilan entre el 4% y el 26% en estudios clínicos (Lindberg, 1983; Vikram y cols., 1984; Hong y cols., 1985; Bthia y cols., 1987). Se han citado cifras del 37%-57% en estudios de autopsias (O'Brien y cols., 1971; Zbaren y cols., 1987; Nishijima y cols., 1993).

Como explican León y cols. (2000) la localización del tumor primario es un factor determinante en la predicción de metástasis a distancia. La localización con más alto porcentaje de metástasis a distancia es la hipofaringe, con un 14%, seguido de la localización laríngea supraglótica y orofaringe con un riesgo intermedio (8% y 7%, respectivamente). La localización laríngea glótica y la cavidad oral presentan un bajo riesgo, con menos de un 1% de metástasis a distancia.

Independientemente de la localización tumoral, se conocen diferentes factores pronósticos que pueden intervenir en la aparición de metástasis a distancia (Leon y cols., 2000):

- **Control locoregional del tumor primario** (Leibel y cols., 1991; Zbaren y cols., 1987)
- **Diferenciación histológica** (Troell y cols., 1995; Shingaky y cols., 1996)
- **Extensión local o regional**
- **Capacidad inmunológica** (Schatnz y cols., 1987).

Estudios más recientes, como el publicado por Li y cols. (2004), investigan de forma más profunda los factores de riesgo relacionados con las metástasis a distancia en CECC, concluyendo que el sitio del tumor primario ($p=0,0011$) y la profundidad de la infiltración del tumor primario ($p=0,0005$) representan los factores de riesgo más determinantes en el desarrollo de metástasis a distancia en pacientes con CECC.

1.2.7. Diagnóstico y estadificación del cáncer epidermoide faringolaríngeo

1.2.7.1. Diagnóstico clínico

El examen clínico, precedido por una buena anamnesis específica y detallada, debe de ser siempre el primer paso en el estudio de los pacientes con sospecha de CECC.

La sensibilidad y la especificidad de la exploración física para el diagnóstico de las metástasis ganglionares no es del todo satisfactorio, como evidencia el hallazgo de un 25 al 40% para falsos negativos y positivos (Anzai y cols. 1997).

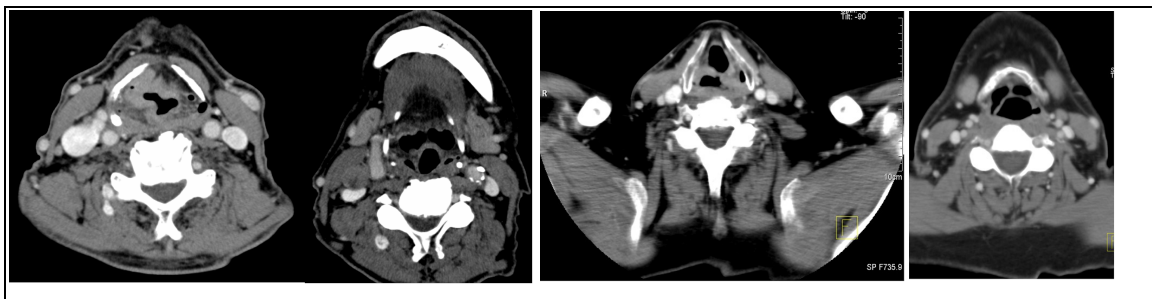
1.2.7.2 Diagnóstico por imagen

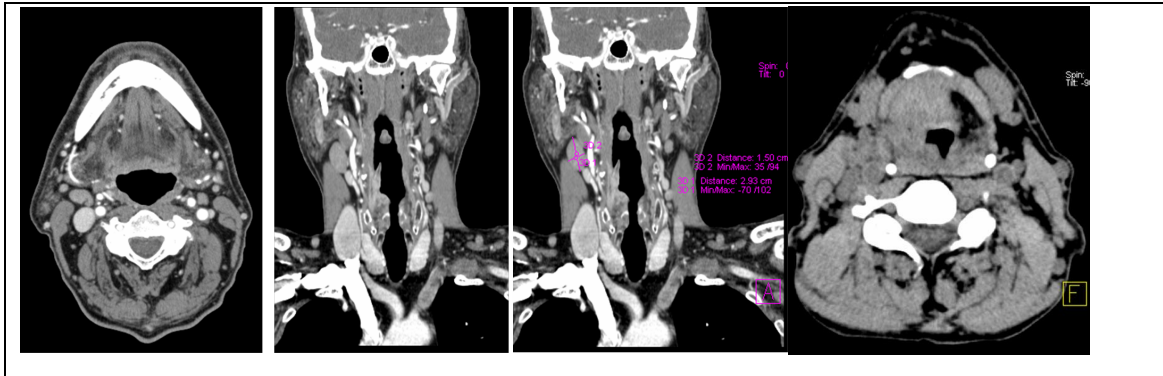
El resultado terapéutico del CECC está fuertemente influenciado por la presencia de metástasis ganglionares cervicales. Dada la alta tasa de falsos positivos y negativos encontrados con la exploración física clínica, se hace necesaria la utilización de pruebas de imagen que incrementen la fiabilidad diagnóstica.

La Sensibilidad y Especificidad de la Tomografía Computarizada (TC) para detectar la enfermedad ganglionar con los criterios radiológicos establecidos varían del 90% al 75%, respectivamente. La precisión global de la combinación: Tomografía por Emisión de Positrones (PET-TC) en la identificación de la enfermedad ganglionar en CECC es más alta que la del TC, en casi un 20% (Jeong y cols., 2007). Estudios recientes (Rey y cols., 2004), llegan a la conclusión que no existen diferencias significativas entre el TC y el uso de Resonancia Nuclear Magnética (RNM), para la detección de metástasis ganglionares en CECC (S: $p=0,1317$ y E: $p=0,3173$).

A pesar de las altas tasas de Especificidad mostradas por las pruebas de imagen: TC, RNM, Ecografía y especialmente PET-TC, ninguno de los métodos de imagen disponibles actualmente son fiables en la evaluación de las metástasis ocultas regionales, debido a que los valores predictivos negativos siguen siendo demasiado bajos (Akoglu y cols., 2005).

Figura 12. Estudio cervical realizado mediante Tomografía Axial Computerizada (TC), en un estudio de comparación con la exploración física mediante la palpación. A: Verdadero positivo, B: Verdadero negativo, C: Falso Positivo, D: Falso negativo. (Pelegrín y cols., 2012).





1.2.8. Clasificación TNM y estadificación

1.2.8.1. Definición y principios generales

El sistema de estadificación supone la forma habitual de clasificación o método que se utiliza en el algoritmo médico para resumir la extensión de un cáncer. La estadificación precisa del cáncer es importante para el tratamiento de la etapa específica, minimizando, de esta forma, el tratamiento inadecuado. Además, nos permite establecer comparaciones y publicar los resultados con valor pronóstico (Lagarde y cols. 2008). La “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) es la encargada de diseñar el sistema de clasificación de tumores basado en el TNM, que es el más usado y generalizado ampliamente a nivel mundial, a pesar de que no es un sistema perfecto y tiene algunas limitaciones. Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, hemos utilizado el resumen de la 6ª edición UICC-AJCC, 2002, con las actualizaciones presentadas en la 7ª edición, 2010.

Las reglas generales del sistema TNM están basadas en la evaluación de tres pilares básicos que son aplicables a todas las localizaciones y están descritas por Donna y cols. (2013):

- **T:** extensión del tumor primario. Queda designado por el tamaño o la extensión de dicho tumor.

Tumor Primario	
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma “in situ”
T1, T2, T3, T4	Incremento del tamaño o extensión local del tumor primario
Tx	El tumor primario no pudo ser categorizado.

- **N:** estado de los ganglios linfáticos regionales y, en ciertas regiones, de los ganglios linfáticos yuxtarrregionales.

Nódulos linfáticos regionales (N)	
N0	No evidencia de nódulos linfáticos regionales
N1, N2, N3	Incremento del número o extensión regional de los ganglios linfáticos afectados
Nx	No se puede categorizar el número de ganglios linfáticos

- **M:** ausencia o presencia de metástasis a distancia.

Metástasis a distancia (M)	
M0	No metástasis a distancia

M1	Presencia de metástasis a distancia
-----------	-------------------------------------

1.2.8.2. Categorías

Existen **varias categorías** para el sistema TNM. Las más importantes son las dos que citamos a continuación:

- **Clasificación clínica**, denominada **cTNM**. Se basa en la evidencia establecida antes del tratamiento, a través de la exploración física, de la exploración por imagen, de la fibroendoscopia, de la información aportada por la biopsia y de la exploración quirúrgica. Es muy útil en las siguientes situaciones:
 - Seleccionar el tratamiento primario
 - Comparar casos o grupos con tumores de características similares, basándose en las guías clínicas
 - Constituye el único punto donde todos los casos son comparables ya que las diferencias en el tratamiento hacen las comparaciones futuras imposibles

- **Clasificación patológica**, denominada **pTNM**. Se realiza mediante la histopatología del tumor y/o de los ganglios linfáticos después de realizar el tratamiento quirúrgico. Está basada en la evidencia adquirida antes del tratamiento, complementada o modificada por las evidencias adicionales que proporcionan la cirugía y el análisis de la pieza operatoria. Es la única clasificación objetiva.

Por lo tanto, el sistema TNM es un sistema dual donde la clasificación clínica nos es útil en la elección del mejor tratamiento, mientras que la clasificación patológica nos informa sobre el pronóstico de los pacientes y sus posibles tratamientos adyuvantes. Una vez establecida la clasificación TNM o pTNM, los tumores de una misma región pueden agruparse en diferentes estadios. Cuando se ha asignado a un

tumor una clasificación clínica y/o patológica y su estadio correspondiente, esta clasificación no debe modificarse, pero con gran frecuencia, hasta en un 50% de los casos, la clasificación patológica (pTNM) modifica y corrige la clasificación clínica (Gras, 2008). Si hay dudas sobre la correcta clasificación de la categoría T, N o M, se escogerá la clasificación más baja.

En función de la clasificación TNM se puede establecer el estadio clínico tumoral, que presenta las siguientes características:

- Facilita la comunicación con respecto a las características de los pacientes
- Es útil para el desarrollo de las guías
- Asigna un pronóstico similar para cada grupo
- Resume la información clínica y es reproducible
- Descriptores opcionales.

El estadio clínico se expresa en números romanos (I-IV), que indican el incremento en la severidad de la enfermedad y el empeoramiento del pronóstico. De forma general, se agrupan de la siguiente manera:

- **Estadio I:** pequeñas o lesiones mínimamente invasivas con ganglios negativos
- **Estadio II-III:** incremento del tamaño tumoral o extensión ganglionar.
- **Estadio IV:** metástasis a distancia en el diagnóstico

1.2.8.3. Clasificación TNM y estadiaje en el cáncer de laringe y faringe

1.2.8.3.1. Clasificación T

Laringe: Nivel supraglótico

- **T1:** tumor limitado a una sublocalización de este nivel, con una movilidad normal de las cuerdas vocales.

- **T2:** tumor que invade más de una sublocalización del nivel supraglótico, glótico o extraglótico (mucosa de la base de la lengua, valécula, pared interna del seno piriforme), sin fijar la laringe.
- **T3:** tumor limitado a la laringe, con fijación glótica y/o invasión de la región retrocricoidea, del espacio preepiglótico, del espacio paraglótico y/o erosión mínima (pericondrio interno) del cartílago tiroides.
- **T4a:** tumor que invade el cartílago tiroides y/o las estructuras extralaringeas (tráquea, tejidos blandos del cuello [incluida la musculatura profunda/extrínseca de la lengua, geniogloso, hiogloso, palatogloso y estilogloso], los músculos infrahioideos, la glándula tiroides y el esófago).
- **T4b:** tumor que invade el espacio prevertebral, las estructuras mediastínicas o que afecta a la carótida interna.

Laringe: Nivel glótico

- **T1:** tumor limitado a una sublocalización del nivel glótico, con movilidad normal de las cuerdas vocales.
- **T2:** tumor que invade más de una sublocalización del nivel glótico o extraglótico sin fijación laríngea.
- **T3:** tumor limitado a la laringe con fijación glótica y/o invasión de la región retrocricoidea, del espacio preepiglótico, del espacio paraglótico y/o erosión mínima (pericondrio interno) del cartílago tiroides.
- **T4a:** tumor que invade, a través del cartílago tiroides las estructuras extralaringeas: tráquea, tejidos blandos del cuello (incluida la musculatura profunda/extrínseca de la lengua, geniogloso, hiogloso, palatogloso y estilogloso), los músculos infrahioideos, la glándula tiroides y el esófago.
- **T4b:** tumor que invade el espacio prevertebral, las estructuras mediastínicas o que afecta a la carótida interna.

Laringe: Nivel subglótico

- **T1:** tumor limitado a la subglotis.

- **T1a:** el tumor esta confinado a una cuerda vocal
- **T1b:** el tumor afecta a las dos cuerdas vocales
- **T2:** tumor extendido al plano glótico con movilidad normal o reducida.
- **T3:** tumor limitado a la laringe con fijación glótica.
- **T4a:** tumor que invade a través del cartílago tiroides y/o las estructuras extralaríngeas: tráquea, tejidos blandos del cuello (incluida la musculatura profunda/extrínseca de la lengua, geniogloso, hiogloso, palatogloso y estilogloso), los músculos infrahioideos, la glándula tiroides y el esófago.
- **T4b:** tumor que invade el espacio prevertebral, las estructuras mediastínicas o afecta a la carótida interna.

Faringe: Nivel Orofaringeo

- **T1:** el tumor es de 2 cm de diámetro máximo (aproximadamente $\frac{3}{4}$ de pulgada) o más pequeño.
- **T2:** el tumor es mayor de 2 cm de diámetro, pero menor de 4 cm .
- **T3:** el tumor mide más de 4 cm de ancho. Para los cánceres de orofaringe, T3 también incluye tumores que están creciendo en la epiglotis.
- **T4a:** el tumor está extendiéndose hacia las estructuras cercanas; la laringe, músculo de la lengua o huesos como el pterigoideo medio, el paladar duro o la mandíbula.
- **T4b:** el tumor está extendiéndose hacia estructuras cercanas y áreas o tejidos más profundos. Esto se conoce como enfermedad local muy avanzada. Cualquiera de las siguientes situaciones es posible:
 - El tumor está expandiéndose hacia otros huesos, como los platos pterigoideos o la base del cráneo
 - El tumor rodea la arteria carótida interna.
 - El tumor está extendiéndose hacia el músculo pterigoideo lateral.
 - El tumor está propagándose hacia la nasofaringe, rinofaringe o cavum.

Faringe: Nivel Hipofaríngeo

- **T1:** Tumor confinado a una región de la hipofaringe (espacio retrocricoideo, seno piriforme, pared lateral faríngea), de 2 cm o menos en su dimensión mayor.
- **T2:** Tumor que invade más de un subsitio de hipofaringe o sitio adyacente, o que mide entre 2 y 4 cm sin fijación de la hemilaringe.
- **T3:** Tumor que mide más de 4 cm o con fijación de hemilaringe.
- **T4:** Tumor que invade cartílago, tejidos blandos, arteria carótida, fascia/musculatura prevertebral, glándula tiroides y/o esófago.

1.2.8.3.2. Clasificación N:

- **N0:** ausencia de signos de afectación de los ganglios linfáticos regionales.
- **N1:** metástasis en un solo ganglio linfático homolateral ≤ 3 cm en su diámetro mayor.
- **N2:** metástasis única en un solo ganglio linfático homolateral > 3 cm y ≤ 6 cm en su diámetro mayor o metástasis ganglionares homolaterales múltiples, todas ≤ 6 cm.
 - **N2a:** metástasis en un solo ganglio linfático > 3 cm, pero ≤ 6 cm.
 - **N2b:** metástasis homolaterales múltiples, todas ≤ 6 cm.
 - **N2c:** metástasis bilaterales o contralaterales ≤ 6 cm.
- **N3:** metástasis en un ganglio linfático > 6 cm en su diámetro mayor. Los ganglios mediales se consideran homolaterales.

1.2.8.3.3. Clasificación M:

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

1.2.8.3.4. Estadios tumorales

Estadaje Tumoral			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
Estadio IVa	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
	T4a	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
Estadio IVb	Cualquier T	N3	M0
	T4b	Cualquier N	Cualquier M
Estadio IVc	Cualquier T	Cualquier N	M1

1.2.9. Factores pronósticos del CECC

Los factores pronósticos son aquellos datos que aportan información sobre la evolución de una determinada enfermedad. La importancia de conocer estos factores en los CECC es múltiple, ya que ayudan a predecir el futuro evolutivo de la enfermedad y a comprender hechos de su fisiopatología. Como señalan Arias y cols. (2000) los podemos agrupar en tres grandes grupos:

1.2.9.1. Relacionados con el enfermo

Reconocemos entre ellos la sintomatología inicial y el tiempo de evolución. El pronóstico va a variar notablemente en función de una sintomatología marcada inicial y un crecimiento rápido relacionado con mayor agresividad (Arias y cols., 2000).

La edad se considera como un factor importante, pero no decisivo en la evolución de la enfermedad. Los pacientes con edad avanzada presentan mayor índice de comorbilidades, que pueden empeorar el pronóstico, aunque, según los estudios de Arias y cols. (2000), la probabilidad de respuesta al tratamiento oncológico es similar a la de los pacientes de menor edad. En suma, hablamos de situación general del paciente determinada por el denominado índice de Karnofsky (IK). En opinión de Ervin y cols. (1987) los pacientes con CECC e IK > 70% toleran mejor los tratamientos y presentan mejores índices de supervivencia, aunque la tasa de respuesta a igual tratamiento y estadio es similar a la de pacientes con menor IK (Wolf y cols., 1984). Otros factores, como los socioeconómicos y los relacionados con el tabaco y el alcohol, han sido mencionados anteriormente.

1.2.9.2. Relacionados con la enfermedad

TNM

Es fundamental la correcta y precisa estadificación del CECC, que exprese la severidad o extensión de la enfermedad, nos posibilita una estimación del pronóstico

y aporta una información útil sobre la elección de las mejores opciones terapéuticas (Ferlito y cols., 2000)

La presencia de adenopatías metastásicas positivas en las áreas ganglionares cervicales representa el indicador más significativo de supervivencia y recurrencia tumoral en los pacientes con CECC (Layland, 2005). A su vez, la rotura extracapsular, definida como la extensión del tumor fuera de la cápsula del ganglio linfático, es considerada como un factor pronóstico independiente en el CECC; tanto es así, que se ha solicitado su inclusión como información adicional al TNM tradicional para que esta situación se considere como un N3 (De Juan y cols., 2013). Actualmente la TNM no recoge el dato sobre infiltración capsular. Como mencionan Brennan y cols. (2008) la presencia de metástasis ganglionares cervicales con rotura extracapsular, implica un comportamiento más agresivo del tumor.

Atendiendo a la localización tumoral anatómica, los tumores laríngeos glóticos tienen un pronóstico más favorable que los supraglóticos y subglóticos (Pera y cols.,1986).

Diferenciación Histológica

Los tumores bien diferenciados son los de mejor evolución, ya que se asocian con una menor frecuencia de metástasis ganglionar y a distancia, así como con una menor tasa de recidivas y mayor supervivencia global (Zatterstrom y cols., 1991). Los tumores con una diferenciación moderada o pobre, según la clasificación clásica de Broders (1926), parecen estar relacionados con pronósticos más desfavorables.

Invasión Tumoral

La profundidad de la invasión tumoral se debe medir en cada pieza de laringectomía. Este grado de invasión influye en la posibilidad de metástasis tumoral y juega un papel independiente en la determinación de la supervivencia libre de enfermedad (Yilmaz y cols., 1998).

Invasión vascular y perineural

La presencia de invasión vascular y perineural debe ser comprobada histológicamente por el patólogo, y de forma rutinaria, en cada pieza de laringectomía, porque ambas tienen un valor pronóstico significativo, influyendo en la supervivencia libre de enfermedad, en el riesgo de recidivas locales y en la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (Jardim y cols., 2015). La invasión vascular aumenta significativamente la aparición de metástasis cervicales en los ganglios linfáticos de los tumores supraglóticos, jugando un papel independiente en la determinación de la recurrencia. Por su parte, la invasión perineural tiene sólo un efecto significativo sobre las metástasis ganglionares de los cánceres supraglóticos.

Traqueotomía previa

El tratamiento previo con traqueotomía ha mostrado una reducción en las tasas de supervivencia globales, incrementando el riesgo de recurrencias periestomales (Manni y cols., 1992).

1.2.9.3. Relacionados con el tratamiento

Parece ser, que la respuesta completa al tratamiento constituye el factor pronóstico más importante cuando se considera una única modalidad de tratamiento. Los márgenes quirúrgicos macroscópicos positivos tras la resección, se consideran un factor pronóstico adverso y se asocian con mala evolución oncológica y postoperatoria (Gallegos, 2010).

1.2.10. Tratamiento del cáncer de faringolaríngeo

El objetivo fundamental del tratamiento, en el CECC, es la erradicación completa de la enfermedad con la menor secuela funcional posible así como la preservación de la función de órgano para poder conservar la voz en los casos seleccionados; de vital importancia es el estudio clínico previo al tratamiento, ya que

un enfoque muy conservador con el fin de preservar la laringe puede poner en peligro la vida del enfermo; por otro lado, una conducta muy radical, por falta de experiencia en el uso de técnicas preservadoras o el desconocimiento de tratamientos alternativos, puede llevar al sacrificio del órgano (Andrea y cols., 2009).

Clásicamente, la Laringectomía Total (LT) descrita por Billroth en 1873, ha sido la única opción de tratamiento para los pacientes con cáncer de laringe en estadio intermedio o avanzado. En los últimos años se ha avanzado mucho en las estrategias de conservación de órgano mediante tratamiento con quimioradioterapia y cirugía parcial (Rodrigo y cols., 2010). En la Figura 13 se resumen los tipos de cirugía parcial y las regiones anatómicas que afectan.

Por lo expuesto anteriormente, el tratamiento del CECC es multidisciplinar y abarca a diversas especialidades, entre las que se encuentra Otorrinolaringología. Las opciones terapéuticas de que disponemos se resumen en: cirugía parcial o radical, radioterapia (RT), quimioterapia (QT) neoadyuvante o de inducción, quimioradioterapia concomitante y las terapias moleculares. Entre los avances más importantes introducidos en los últimos 40 años en el tratamiento del cáncer de laringe destacan (Andrea y cols., 2009):

- La cirugía conservadora de laringe.
- Los protocolos de conservación de órganos con radioterapia y quimioterapia.
- El tratamiento endoscópico mínimamente invasivo con cirugía endoscópica láser de CO₂.

Para facilitar la descripción, presentaremos la acción terapéutica en función del estadio clínico de la enfermedad:

1..10.1. Enfermedad Precoz

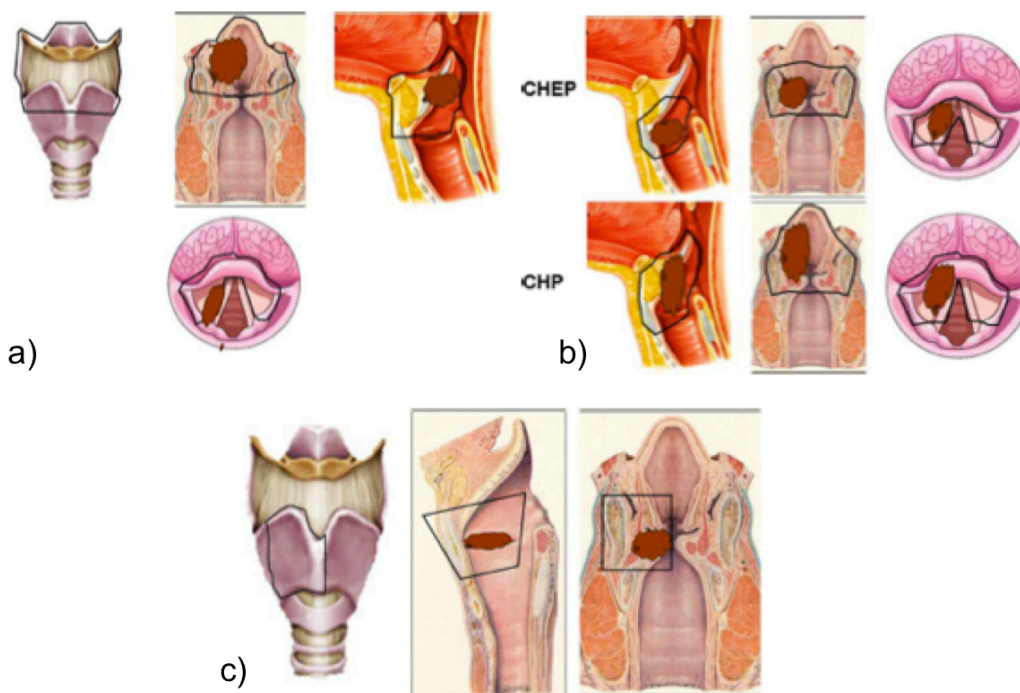
La cirugía conservadora parcial y la radioterapia son las modalidades más utilizadas en estadios precoces del CECC, presentando cifras semejantes de control local y supervivencia (Spector y cols., 2004).

La verdadera revolución, independientemente de los tipos de cirugía parcial descritos (LS, LVP, CHEP o CHP), en el concepto de preservación de órgano en cáncer de laringe, orofaringe e hipofaringe ha sido la introducción, a partir de los años setenta, de la Cirugía Endoscópica con Láser CO2 (Quer y cols., 2009), con controles locales en los tumores laríngeos avanzados, con una preservación de alrededor del 80 % (Iro y cols., 1998; Motta y cols., 2005). Los criterios de selección para radioterapia en el CECC en estadio precoz se refleja en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterios de selección para radioterapia en el CECC en estadio precoz. Modificada de Granados y cols., 2007.

1. Pacientes ancianos o debilitados.
2. Pacientes que no toleran o cooperan con traqueotomía temporal.
3. Pacientes que deciden mantener intacta la voz.
4. Pacientes que se niegan a la cirugía
5. Pacientes con comorbilidad médica o riesgo anestésico significativo.
6. Pacientes cooperadores que pueden asistir al tratamiento de forma regular.

Figura 13. Esquema representativo de la cirugía parcial de conservación del órgano laríngeo: a) Laringectomía Supraglótica, b) Laringectomía Parcial Supracricoidea con cricohioideoepiglotopexia (CHEP) o cricohiodopexia (CHP), c) Laringectomía Vertical Parcial (LVP). Imagen obtenida de Rodrigo y cols., 2010.



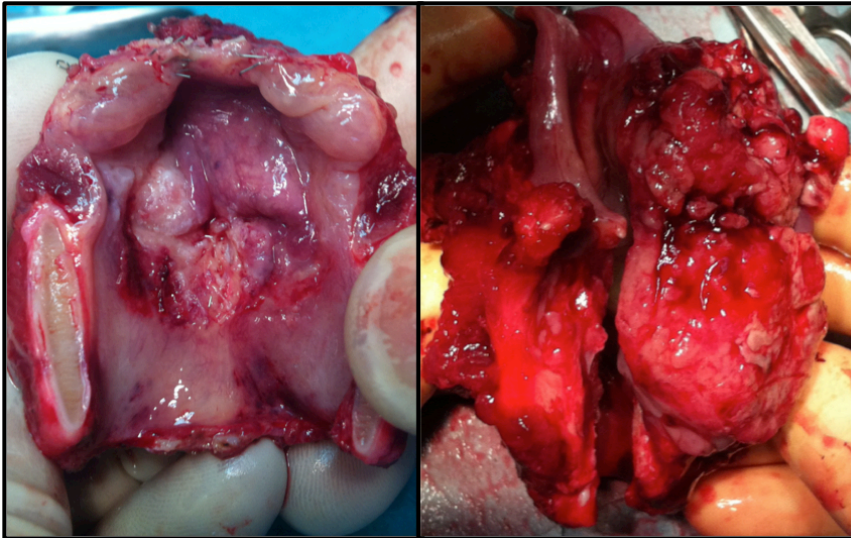
1.2.10.2. Enfermedad Avanzada

Los protocolos de tratamiento de los CECC se han modificado en las últimas décadas, especialmente en los tumores avanzados (León y cols., 2014). El tratamiento clásico de estos tumores ha consistido en la realización de una exéresis quirúrgica ampliada seguida de radioterapia. A raíz del conocido trabajo publicado por el Hospital de los Veteranos (The department of Veterans, 1991), cambió el paradigma en el tratamiento de este tipo de tumores incluyéndose la preservación de órgano en función de la respuesta al tratamiento con quimioterapia de inducción, la quimio-radioterapia concomitante (Pignon y cols., 2000), o los fármacos con una diana molecular específica como el cetuximab (Bonner y cols., 2006).

La QT concomitante con la RT producen una acción sinérgica, de tal forma que la QT puede actuar como sensibilizador a la RT, y la RT puede incrementar la absorción de la QT por el tumor (Quer y cols., 2009). Como presentó Forastiere y cols., 2003, en su estudio RTOG 91-11, el tratamiento con concomitancia mostró una superioridad en preservación de órgano en pacientes con cáncer de laringe, sin afectar a la supervivencia.

Las terapias moleculares con cetuximab, anticuerpo monoclonal que se une al antígeno EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico), han sido incorporadas en los nuevos protocolos de preservación de órgano y están abriendo una nueva línea de estudios. La adicción de Cetuximab a RT ha mejorado el control local y ha reducido la mortalidad sin incrementar los efectos tóxicos en pacientes con carcinomas avanzados de orofaringe, laringe e hipofaringe (Bonner y cols., 2006).

Figura 14. Pieza quirúrgica correspondiente al órgano laríngeo tras LT.



1.2.11. Biología molecular en el cáncer faringolaríngeo

El uso y utilidad de los factores pronóstico en el área de la biología molecular es un tema de gran interés e intensa investigación en la actualidad. La biología molecular será la única vía que nos pueda permitir conocer el por qué 2 tumores, aparentemente iguales con los datos disponibles en la actualidad, se comportan biológicamente de forma muy distinta. Además de esto, nos va a permitir realizar un diagnóstico precoz, incluso antes del desarrollo del propio cáncer y, por supuesto, constituye el único modo para establecer dianas susceptibles de tratamiento que nos permitan realizar tratamientos individualizados, única manera de vencer el cáncer en la actualidad.

1.2.11.1. Utilidad del fluido salivar en el cáncer faringolaríngeo

Existen una gran cantidad de estudios y publicaciones que apoyan la posibilidad de utilizar la saliva como fluido para el seguimiento y el diagnóstico de distintas enfermedades. Gracias al avance de las nuevas técnicas basadas en la proteómica funcional y a la gran batería de muestras de saliva recolectadas, procesadas y almacenadas, de pacientes diagnosticados con cáncer faringolaríngeo, nos planteamos realizar el análisis de perfiles de proteínas, basados en actividad de Serina Hidrolasas

(SH) activas presentes en saliva de estos pacientes y compararlo con un grupo de pacientes sanos que establecimos a modo de control.

1.2.11.2. Serína hidrolasas y cáncer

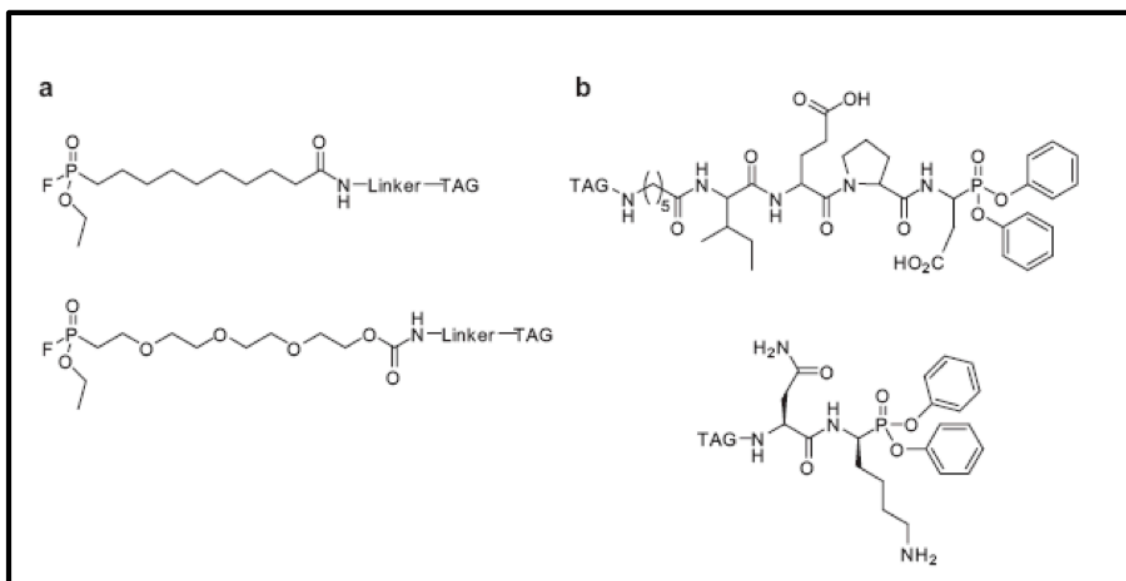
Las SH son una superfamilia con más de 200 enzimas, caracterizadas por la presencia de una serina en el sitio activo que es utilizada para la hidrólisis de sustratos. Estas enzimas presentan una gran diversidad, incluyendo proteasas, peptidasas, lipasas, esterases y amidasas. Este colectivo forma, aproximadamente, el 1 % de los productos codificados por la mayoría de los genomas eucarióticos (Cravatt y cols., 2008).

Estas enzimas poseen un mecanismo catalítico común de actuación, que implica la activación de un nucleófilo de la serina del centro activo de la enzima. La gran nucleofilicidad de este sitio catalítico hace posible modificaciones covalentes (irreversibles) por parte de distintos tipos de electrófilos, como los fluoro-fosfonatos (FPs), aril-sulfonatos o carbamatos. Los nucleófilos fosfonatados se presentan como la opción más potente en cuanto a afinidad para el diseño de sondas ABPP, Perfil de Proteínas Basados en la Actividad (Activity Based Protein Profile). Las sondas ABPP se ha demostrado que son útiles para la detección de serina hidrolasas (Cravatt y cols., 2008).

Las sondas con fluorofosfonatos, FPs (Figura 15) muestran una amplia y extraordinaria reactividad con la clase de enzimas SH (Liu y cols., 1999; Kidd y cols., 2001; Patricelli y cols., 2001). Hasta la fecha, más de 80 SH diferentes han sido identificadas y descritas en la literatura con este tipo de sondas FPs en proteomas humano y de ratón (Jessani y cols., 2005; Alexander y cols., 2006; Jessani y cols., 2002; Jessani y cols., 2004). Además, los FPs han mostrado que pueden emplearse con gran eficacia como sondas para ABPP, ya que reaccionan con enzimas activas pero no con sus precursores inactivos o en presencia de inhibidores (Kidd y cols., 2001; Jessani y cols., 2002). Este factor ha permitido a los investigadores identificar SH que muestran alterada su actividad, pero no su expresión génica en sistemas biológicos (Jessani y cols., 2002; Jessani y cols., 2004). Finalmente, y mediante las plataformas de alta resolución de espectrometría de masas, se han desarrollado mapas muy precisos de

los sitios de unión de este tipo de sondas, facilitando así la identificación de las secuencias de aminoácidos de los miembros de la familia de enzimas SH (Okerberg y cols., 2005; Jessani y cols., 2005).

Figura 15. Dos ejemplos de fosfonatos electrofilicos como prototipos para la técnica ABPP para SH. (a) Representante de sonda fluorofosfonato (Kidd y cols., 2001; Liu y cols., 1999). (b) Representante de sonda aril fosfonato. (Pan y cols., 2006; Mahrus y cols., 2005).



1.2.11.3. Aplicaciones biológicas de la técnica ABPP para SH

Son muchas las referencias bibliográficas en las que se muestra que la técnica ABPP ha sido empleada para determinar el perfil de actividad de SH en muestras biológicas relacionadas con cáncer (Greenbaum y cols., 2002; Jessani y cols., 2002; Madsen y cols., 2006; Jessani y cols., 2004), aterosclerosis (Milner y col., 2006), activación celular inmune (Mahrus y cols., 2005) y señalización del sistema nervioso (Alexander y cols., 2005; Nomura y cols., 2005). En algunos casos, estos estudios han facilitado la asignación de nuevas funciones metabólicas y celulares a miembros de la familia SH.

1.2.11.4. Perfiles de actividad de SH en cáncer

En numerosos estudios ha quedado demostrado que las SH incluyendo proteasas, lipasas y esterasas, juegan un papel clave en el cáncer. Estas enzimas, mediante el control de componentes estructurales de la matriz extracelular, la activación de factores de crecimiento y el metabolismo de pequeñas moléculas señalizadoras, pueden contribuir al desarrollo de células cancerosas malignas. Para confirmar estas premisas más a fondo, el Profesor Cravatt y sus colaboradores (Jessani y cols., 2002), llevaron a cabo estudios analizando perfiles de actividad de serina hidrolasas a través de un panel de líneas celulares de cáncer de mama y de melanoma con distinta biología tumoral. Los investigadores, primero, utilizaron sondas fluorescentes FP para obtener geles con los perfiles y, de esta forma, comparar y cuantificar las actividades de estas enzimas y luego sondas FP biotiniladas para su análisis mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas LC-MS, para identificar estas enzimas. El análisis del cluster jerárquico de perfiles de actividad les permitió clasificar las células cancerígenas en subgrupos según el origen del tumor o el estadio tumoral. Estas actividades enzimáticas incluyen marcadores conocidos de distintos tipos de cáncer, como la uroquinasa, también llamada activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA). Igualmente, se describió una proteína no caracterizada a priori, la KIAA1363, proteína integral de membrana para la que no se había descrito ninguna asociación con cáncer y, mediante estudios realizados con tecnología ABPP-MudPIT, se confirmó que presenta una actividad muy elevada en tumores de mama agresivos estrógeno negativo (Jessani y cols., 2005).

La técnica ABPP se utilizó para describir el crecimiento de líneas celulares tumorales humanas en vivo, en injertos de tumores transplantados en ratones inmunodeficientes (Jessani y cols., 2004). Estos estudios facilitaron la identificación de actividades enzimáticas que se vieron alteradas durante la progresión del tumor y, a su vez, permitieron también la identificación de una variante muy agresiva de la línea celular de cáncer de mama MDA231. El análisis mediante ABPP de estas células “231mfp” reveló que éstas poseen unos niveles sobreexpresados de gran cantidad de enzimas con actividad serín proteasa, entre ellas la uroquinasa (uPA) y el activador de plasminógeno de tejidos tPA. Cuando se compararon los niveles de transcritos de uPA

y tPA con los de los de las células MDA 231 parentales, se vio que no se encontraban alterados; esto da idea de que la técnica ABPP permite obtener la información funcional del proteoma, que no siempre se relaciona con cambios en la expresión de los genes.

1.2.11.5. Propiedades de la saliva como fluido diagnóstico

Desde que se han descrito las ventajas de la saliva como una posible herramienta diagnóstica, la utilización de la misma para el seguimiento de enfermedades o de la salud, en general, se ha convertido en una meta fuertemente perseguida en la investigación y en numerosos estudios dentro del ámbito de la biomedicina.

El elevado potencial de la saliva para aplicaciones biomédicas ha sido reconocido cuando la saliva evidencia diferentes espectros en distintos estudios, al comparar patrones sanos con diferentes estadios de enfermedad (Slavkin y cols., 1998; Mandel y cols., 1993).

Como la sangre, la saliva es un fluido complejo que contiene variedad de enzimas, hormonas, anticuerpos y factores de crecimiento (Zelles y cols., 1995; Rehak y cols., 2000). Muchas de estas sustancias pasan a la saliva desde la sangre a través de espacios intercelulares (por difusión intracelular pasiva o transporte activo) o ultrafiltración extracelular.

Además, la mayoría de componentes encontrados en la sangre también están presentes en la saliva, aunque sea en cantidades más pequeñas; de esta manera la saliva es, funcionalmente, equivalente al suero, reflejando el estado fisiológico del cuerpo, incluyendo variaciones de tipo emocional, hormonal, nutricional y metabólico. Lo que más preocupaba a los investigadores era que, aunque la saliva contiene diversos componentes con valiosas propiedades diagnósticas, su baja concentración comparada con los niveles en sangre podría impedir su uso diagnóstico en la práctica clínica. Sin embargo, hoy en día esto no es una limitación, debido a las nuevas técnicas con una altísima sensibilidad (diagnóstico molecular, tecnología ABPP, nanotecnología...). De hecho, en la actualidad se está incrementando el número de pruebas y ensayos que utilizan la saliva para monitorizar enfermedades o condiciones

fisiológicas como infección por VIH (Emmons, 1997; Malamud, 1997) respuesta inmune frente a infecciones virales (hepatitis A, B, C), (Ochnio y cols., 1997; Chaita y cols., 1995) y niveles sistémicos de drogas (Drobitch y cols., 1992).

Una de las grandes ventajas de utilizar la saliva como una herramienta diagnóstica y, a su vez, muy importante en relación con la clínica y el bienestar del paciente, es la fácil, rápida, no invasiva e indolora recogida de la muestra. Los constituyentes de la saliva van a depender del método de extracción y del grado de flujo salivar. Los diferentes métodos de recolección de la muestra pueden ser clasificados en función del tipo de estimulación que se utilice; induciendo la acción masticadora, por ejemplo con goma de mascar, podemos estimular la producción de saliva, aumentando de esta forma el flujo. Este método se utiliza en pacientes que presentan dificultad para producir suficiente saliva. La recolección de saliva sin estimulación externa (saliva basal o no estimulada) se puede ver afectada por el grado de deshidratación o estado emocional del paciente, entre otros. Los tres métodos de recolección más comunes, sin estimulación externa, son el drenaje, la acción de escupir y los métodos de succión. Independientemente del método usado, los pacientes deben cepillarse los dientes la noche antes y estar en ayunas, para evitar así posibles contaminaciones.

Además, la saliva presenta, asimismo, numerosas ventajas en términos de recolección, almacenamiento, transporte y volumen de las muestras, ya que todos estos procesos pueden resultar más económicos comparados con los requeridos en el caso del suero o la orina. La saliva, igualmente, es más fácil de manejar que la sangre, ya que no tiene riesgo de formar coágulos y se reduce el número de manipulaciones requeridas. Por otro lado, y de gran interés para los pacientes sujetos al estudio, es la información dirigida a los mismos de que la recolección de la muestra no es invasiva ni dolorosa; con ello se reduce radicalmente su estado de ansiedad y nerviosismo y se incrementa su disposición para sucesivas revisiones, lo que aumenta la posibilidad de monitorizar la salud de los pacientes a lo largo del tiempo.

1.2.11.6. Diagnósticos en la saliva

Durante las pasadas dos décadas, las aproximaciones obtenidas mediante diagnóstico en la saliva han estado orientadas hacia la monitorización de enfermedades de la cavidad oral, tales como enfermedades periodontales (Kornman y cols., 1997; Socransky y cols., 2000) y riesgo de caries (Baughan y cols., 2000). Recientemente, y gracias al desarrollo de nuevas tecnologías a nivel biomolecular, se están desarrollando un gran número de análisis biomédicos que nos están revelando, gradualmente, más componentes de la saliva valiosos, ya que algunos de ellos representan biomarcadores de diferentes enfermedades incluyendo el cáncer (Boyle y cols., 1994, Li y cols., 2004; Hu y cols., 2008), enfermedades autoinmunes (Hu y cols., 2007; Streckfus y col., 2008), enfermedades de origen viral (Ochnio y cols., 1997; El-Medany y cols., 1999; Pozo y cols., 1999), enfermedades de tipo bacteriano (Kountouras y cols., 1998; Lendenmann y cols., 2000), enfermedades cardiovasculares (Adam y cols., 1999) y VIH (Emmons y cols., 1997; Malamud y cols., 1997).

Podemos resumir diciendo que la saliva, al igual que la sangre y que otros fluidos de nuestro cuerpo, contiene gran cantidad de proteínas y moléculas de ácidos nucleicos que reflejan nuestro estado fisiológico. Su análisis es sencillo, fácil, barato, seguro, indoloro, reproducible y no invasivo; también es cómodo para el paciente porque puede realizarse en su propia cama sin necesidad de desplazamiento.

1.2.11.7. Perfiles ABPP en muestras de saliva de pacientes con Cáncer Faringolaríngeo

Como hemos descrito anteriormente y dada la abundancia de estudios en la literatura científica reciente que apoyan y justifican la posibilidad de utilizar la saliva como fluido para el seguimiento y diagnóstico de distintas enfermedades (Emmons, 1997; Malamud, 1997; Ochnio y cols., 1997; Chaita y cols., 1995; Drobitch y cols., 1992), nos planteamos la recogida sistemática de muestras de saliva en los pacientes diagnosticados y tratados con cáncer de Laringe y su análisis de perfiles de proteínas basados en actividad de SH activas presentes en ella y comparar la misma determinación con un grupo de pacientes sanos que establecimos como control.

2. Justificación, Hipótesis y Objetivos

Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro...

René Descartes

2.1. Justificación del estudio

En la introducción hemos hecho referencia a la importancia del diagnóstico precoz y del conocimiento de los factores pronósticos implicados en el cáncer de cabeza y cuello. Los avances en investigación e innovación científica han producido mejoras en la asistencia, tratamiento y rehabilitación en los pacientes diagnosticados de cáncer faringolaringeo; sin embargo, en la literatura científica no existen estudios específicos que pongan de manifiesto la utilización de biomarcadores proteómicos salivares como método de identificación precoz, ni sus implicaciones como factores pronósticos en el cáncer faringolaringeo.

Por todo ello, creemos conveniente y justificado realizar un estudio clínicomolecular que nos aporte nuevos conocimientos acerca del comportamiento del cáncer de cabeza y cuello, con el fin de mejorar su detección inicial y su pronóstico.

2.2. Hipótesis

2.2.1. El estudio de los biomarcadores salivares, puede ser utilizado como método de detección precoz en pacientes con CECC.

2.2.2. Determinadas proteínas identificadas en la saliva pueden estar relacionadas con el comportamiento y la agresividad de los diferentes tipos de cáncer de cabeza y cuello y, por lo tanto, con su pronóstico.

2.2.3. Las variables clinicopatológicas podrían estar íntimamente relacionadas con la supervivencia global y libre de enfermedad en los pacientes con diagnóstico de CECC en nuestra área de salud..

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General

2.3.1.1. Analizar la capacidad diagnóstica y pronóstica de las sondas salivares ABPP (Activity Based Protein Profile) para la identificación de enzimas Serina Hidrolasas (SH), que por su conocida relación con la proliferación celular y tumorigénesis, puedan servir como biomarcadores proteómicos en el cáncer epidermoide faringolaríngeo.

2.3.2. Objetivos específicos

2.3.2.1. Estimar la supervivencia global y libre de enfermedad de los pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide faringolaríngeo, en función de las distintas variables establecidas.

2.3.2.2. Describir las características clinicopatológicas relacionadas con el cáncer epidermoide faringolaríngeo en los pacientes tratados en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

2.3.2.3. Evaluar y analizar las posibles asociaciones clínico-moleculares.

3. Material y Métodos

Nunca existe error tan grande como el de no proseguir...

Jex-Blake

3.1 Diseño del estudio

3.1.1. Tipo de estudio

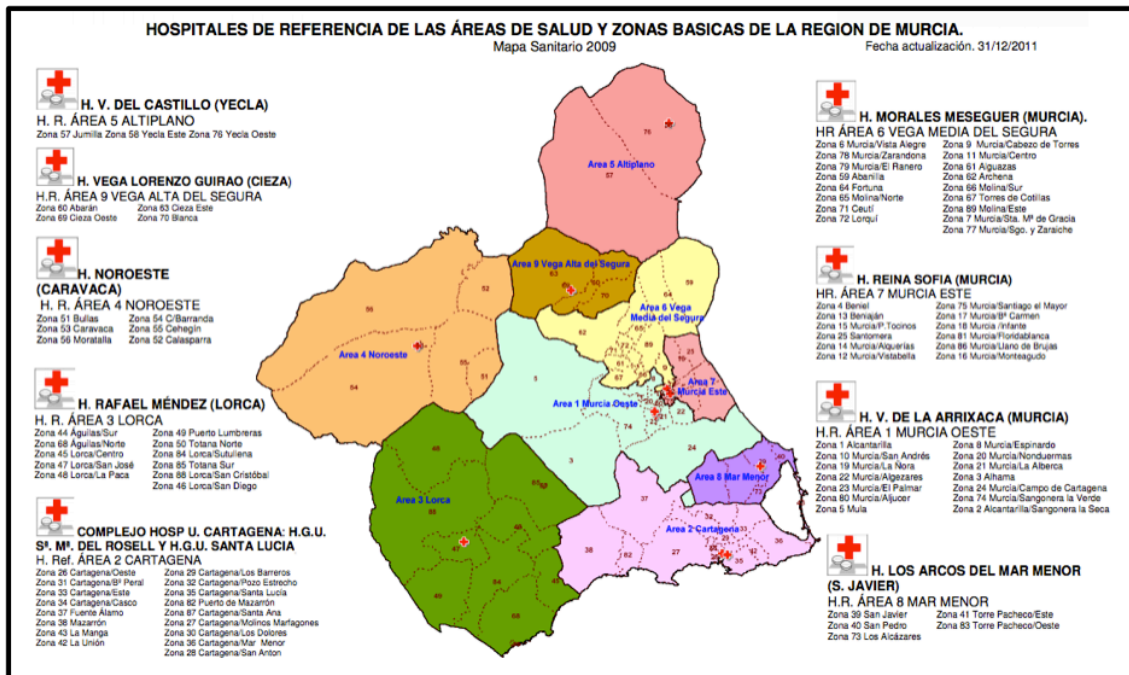
El estudio llevado a cabo se puede definir como **observacional, longitudinal, ambispectivo y con componentes analíticos**. Se considera analítico porque conlleva una presunta relación de causa efecto, alejándose de una finalidad puramente descriptiva. Observacional, ya que el investigador se limita a medir y a analizar determinadas variables sin ejercer un control directo sobre la intervención. Longitudinal debido a que marca un determinado tiempo entre las variables y, por último, de dirección temporal ambispectiva pues combina un estudio de los datos posterior al fenómeno estudiado (retrospectivo) con un estudio cuyo inicio es anterior, en el que los datos se recogen a medida que va sucediendo (prospectivo), para el análisis de los eventos de supervivencia.

3.2. Población de referencia y de estudio

3.2.1. Población diana

Para la elaboración de esta investigación se ha tomado como población diana a los pacientes con diagnóstico clínico y anatomopatológico de carcinoma epidermoide de localización faringolaríngea en la Comunidad de Murcia. Esta Comunidad, por la Orden de 24 de Abril de 2009 (BORM 7 de Mayo de 2009), se divide en 9 áreas de salud (Figura 16). Nuestro estudio se efectuado en el hospital de referencia del área de salud I, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA). Este hospital durante el período de estudio contaba con 863 camas y 27 quirófanos funcionales, cubriendo a una población de 252.861 habitantes y siendo el hospital de referencia de las demás áreas de salud.

Figura 16. Mapa que presenta las diferentes Áreas de Salud y Hospitales de referencia de la Región de Murcia. Servicio de Planificación y Financiación Sanitaria (2011).



3.2.2. Población de estudio

Se estudiaron todos los pacientes mayores de 18 años, pertenecientes al área de salud I (Murcia Oeste) o derivados de otras comarcas sanitarias con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide de localización faringolaríngea, que se han tratado de forma quirúrgica en el HCUVA.

3.2.3. Muestra

Se recogieron, por parte del servicio de Otorrinolaringología y Biología Molecular, muestras salivares y de tejidos, previa firma de consentimiento informado (ANEXO I) de todos los pacientes intervenidos, en el HCUVA, de tumoraciones benignas y malignas de cabeza y cuello durante el periodo comprendido entre Enero de 2008 y Diciembre de 2012, ambos inclusive. Obteniendo así una muestra total inicial de 179 pacientes.

La población de estudio se definió en función de los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:**

- Edad comprendida entre los 18 y los 90 años.
- Localización del tumor primario originaria en faringe, laringe o ganglio cervical.
- Diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide.
- Tratamiento quirúrgico curativo o paliativo en Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.
- Obtención de muestra biológica en quirófano: sangre, saliva, tejido tumoral y sano.

- **Criterios de exclusión :**

- Edad inferior a 18 años o superior a 90 años.
- Tumor primario de localización distinta a laringe, faringe y/o ganglios.
- Diagnóstico anatomopatológico de tumoraciones benignas y malignas de variantes no epidermoides: adenocarcinoma, carcinoma papilar, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma anaplásico, melanoma, linfoepitelioma y paraganglioma.
- Tratamiento con preservación de órgano no quirúrgico.
- Enfermedad metastásica extraganglionar concomitante con el tumor primario.
- Muestras tumorales insuficientes , con incapacidad para estudio anatomopatológico.
- Muestras salivares escasas.

3.3. Definición de grupos de trabajo

El grupo patológico fue seleccionado en función de los criterios de inclusión y de exclusión previamente establecidos. Todos los pacientes fueron diagnosticados mediante confirmación histológica de CECC. La muestra final seleccionada fue de 112 pacientes que cumplían los criterios previamente definidos.

El grupo control quedó definido por un total de 32 muestras salivares, comprendidas en tres bloques:

- Pacientes fumadores, n=14 (43,75%)
- Pacientes no fumadores, n=11 (34,37%)
- Pacientes con patología faringolaríngea benigna: nódulos, quistes, edema de Reinke. N=7 (21,87%)

No existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo patológico para las variables sexo y edad.

3.4 Variables del estudio

Los parámetros recogidos y analizados fueron los siguientes:

- **Nº de Historia clínica:** asignado por el programa informático de Admisión del hospital.
- **Edad:** expresada en años, del paciente que ingresa en el estudio.
- **Género:** sexo del paciente que ingresa en el estudio expresado como varón o mujer.
- **Área de salud:** expresada como gerencia de las distintas áreas de salud del I al IX.
- **Motivo de consulta:** expresada como una o varias de las siguientes variables: disfonía, disfagia, disnea, odinofagia, hemoptisis, tos, tumoración laterocervical.
- **Tiempo de evolución:** definido como el tiempo que transcurre entre la aparición del primer síntoma y la fecha de consulta, en semanas.
- **Antecedentes clínicos y tumorales personales:** definición de enfermedades crónicas tales como, hipertensión arterial, diabetes mellitus, hepatopatía crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica e inmunodeficiencias.
- **Antecedentes tumorales familiares:** definidos por la presencia de cáncer de laringe en algún familiar próximo con vínculos de sangre, o cáncer no laríngeo en algún familiar próximo, con vínculos de sangre.
- **Hábitos tóxicos:** hábito tabáquico y enólico con definición de la frecuencia (leve, moderada o severa) de ambas variables.

- **Características del tumor primario:** expresada como localización originaria de la tumoración primaria.
- **TNM del tumor primario:** expresada como la descripción del tumor primario (T), adenopatías metastásicas (N) y metástasis a distancia (M) en sus determinadas categorías.
- **Estadio patológico del tumor primario:** definido por los estadios tumorales de la clasificación UICC-AJCC; estadio I, estadio II, estadio III y estadio IV:
- **Tratamiento realizado:** quirúrgico curativo, quirúrgico paliativo, presencia de tratamiento concomitante con quimioterapia y/o radioterapia.
- **Tratamiento quirúrgico realizado:** definido por la intervención quirúrgica llevada a cabo por el servicio de Otorrinolaringología; laringectomía total, hemilaringectomía en cualquiera de sus modalidades, laringectomía supraglótica, cordectomía unilateral o bilateral, faringectomía, resección láser.
- **Estancia hospitalaria:** tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica hasta la fecha de alta hospitalaria, definida en días.
- **Complicaciones post-tratamiento:** definida por la presencia de fístula faringocutánea, hemorragia, infección de la herida quirúrgica y éxitus después de la intervención quirúrgica.
- **Presencia de recidiva, metástasis o segundo tumor:** definida después de la cirugía y el tiempo transcurrido entre esta y la aparición del evento, en meses.
- **Características anatomopatológicas del tumor primario:** expresadas en función de la diferenciación celular (pobre [G3], moderada [G2], buena [G1]); la presencia de infiltración neuronal, vascular o linfática; la presencia de adenopatías positivas y de rotura capsular ganglionar.
- **Supervivencia:** definida como éxitus o no éxitus y el tiempo transcurrido entre la cirugía y el evento, en meses.

3.5. Recogida de los datos

Las fuentes utilizadas para la recopilación de los pacientes fueron las siguientes: servicio de codificación clínica del HCUVA, libro de procedimientos quirúrgicos del servicio de Otorrinolaringología y listado de pacientes con muestras biológicas por parte del servicio de Biología Molecular.

Fue elaborada una hoja de recogida de datos (ANEXO II-III), en virtud de los parámetros considerados fundamentales para la realización del estudio.

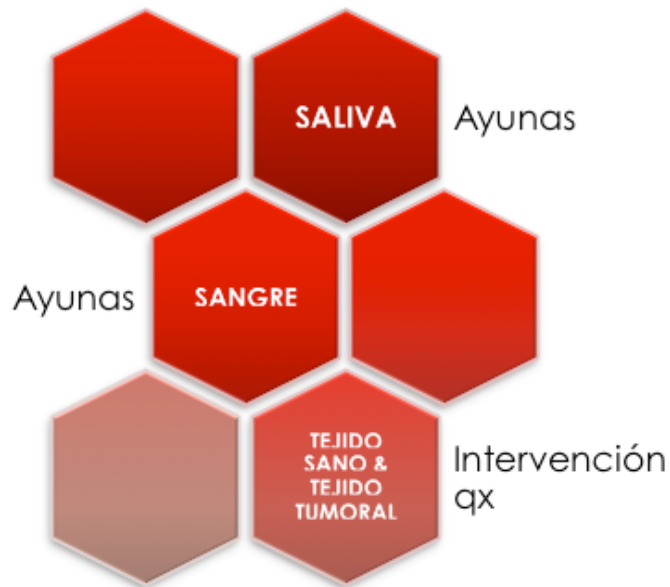
Los datos para la cumplimentación de las hojas de recogida de datos, se realizaron a través de la historia clínica, obtenida en el servicio de documentación y a través del programa informático "*Selene*". Se comenzó a rellenar el formulario en Mayo de 2012 y se terminó en Enero de 2013, de forma retrospectiva. Para que el seguimiento de los pacientes fuera más completo, los datos pertenecientes a eventos de supervivencia (recidiva y éxitus ,expresados en meses) se completaron y se cerraron de forma prospectiva, tras su seguimiento, en Junio de 2014; de ahí que el estudio sea ambispectivo.

La Obtención de los datos fue realizada por el propio investigador.

3.6. Obtención y preparación de las muestras biológicas

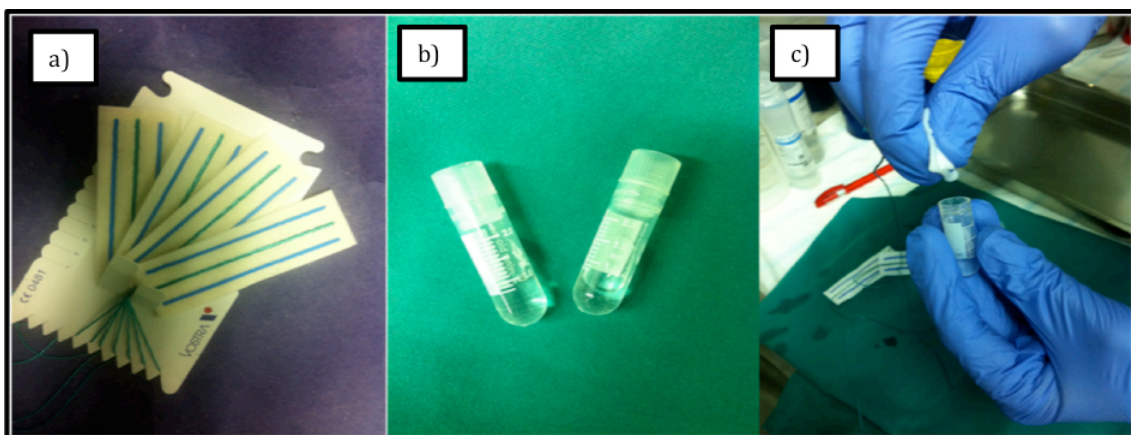
Las muestras biológicas fueron recogidas en el quirófano de Otorrinolaringología, de todos los pacientes incluidos en el estudio (saliva, sangre y tejido sano/tumoral). Las muestras de saliva y de sangre se obtuvieron en el momento previo a la intervención quirúrgica y en situación de ayuno de los pacientes.

Figura 17. Esquema representativo de las diferentes muestras biológicas recogidas en período de ayunas, en el momento previo a la intervención quirúrgica.



Para la recogida de saliva se utilizaron lentinas colocadas en la región sublingual durante un período de 10 minutos y fueron preparadas por el investigador. No se utilizó ningún método para la estimulación de la producción salivar. Las muestras de sangre fueron extraídas por el personal de enfermería. Las muestras de tejido sano y tumoral se recogieron de forma independiente tras la exéresis de la pieza quirúrgica.

Figura 18. Imágenes correspondientes a: a) lentinas para toma de muestras salivares, b) recipiente para el almacenado y, c) representación de la preparación.



Todas la muestras fueron identificadas y enviadas a la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos (Laboratorio de Terapia Molecular y Biomarcadores de Cáncer), donde se almacenaron y congelaron a -80°C hasta su posterior utilización.

Figura 19. Imagen correspondiente a las muestras de saliva y sangre, almacenadas en recipiente de hielo para el envío a la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos (Laboratorio de Terapia Molecular y Biomarcadores de Cáncer).



Para su preparación, las muestras se descongelaron lentamente hasta alcanzar una temperatura de 4°C .

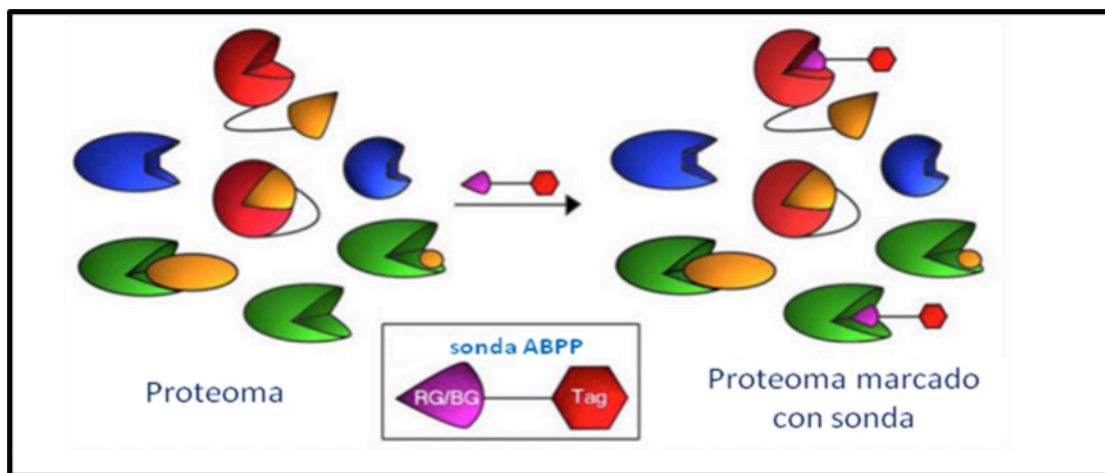
3.7. Metodología en la detección de proteínas con sondas salivares

3.7.1. Perfiles de proteínas basados en actividad, ABPP

Como hemos descrito en la introducción, los perfiles de proteínas basados en actividad (ABPP, Activity Based Protein Profile) han emergido, como una estrategia proteómica muy potente para la caracterización de funciones enzimáticas en sistemas biológicos a escala global. Como reflejó Cravatt y cols. (2008) la caracterización de proteínas a gran escala manifiesta una gran complejidad debido a la variabilidad temporal y contextual del proteoma, frente a la relativa estabilidad del genoma. En la célula tienen lugar multitud de eventos post-traduccionales que regulan la actividad proteica. La valoración precisa del estado funcional de las proteínas en las células y tejidos requiere métodos directos. De esa forma, emergió la técnica ABPP como una técnica clave en la evolución de la proteómica funcional.

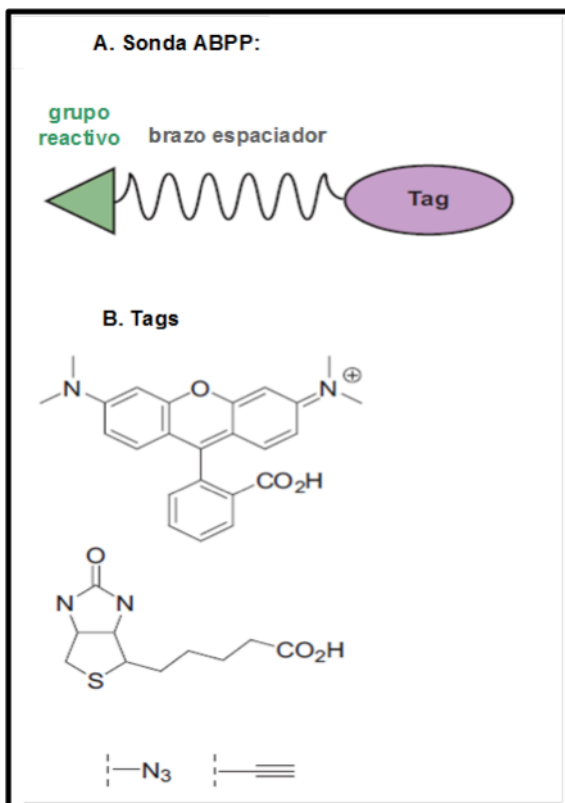
La técnica de las ABPP se basa en el diseño de sondas dirigidas al centro activo para analizar familias específicas de enzimas en proteomas complejos y para proporcionar la base de una lectura cuantitativa del estado funcional de enzimas individuales dentro de esa familia (Figura 20). Las sondas ABPP prototípicas son capaces de identificar una fracción grande pero manejable del proteoma enzimático, a menudo definido por compartir ciertas características catalíticas. El tamaño de dicho conjunto puede variar desde unas pocas proteínas a varios cientos.

Figura 20. Estrategia de marcaje de un proteoma con ABPP.



La estructura de las sondas ABPP está constituida por pequeñas moléculas que se unen covalentemente al centro activo de unas enzimas dadas. Las sondas ABPP ideales son aquellas capaces de marcar un gran número de enzimas con la finalidad de proporcionar a los investigadores una visión global del estado funcional del proteoma. Las sondas están constituidas por 3 elementos (Figura 21.): un grupo reactivo (verde), un brazo espaciador o grupo de unión (negro) y un grupo “chivato” que permite la detección o identificación de la sonda (violeta).

Figura 21. (a) Estructura de las sondas de ABPP y (b) Tipos de moléculas identificadoras. La etiqueta o "tag" facilita la caracterización de la diana. Ejemplos de tags: fluoróforos, biotina, y compuestos analíticos latentes como alquinos o azidas que pueden ser modificados mediante métodos de química "clic" para visualizar las dianas proteicas tras el marcaje.

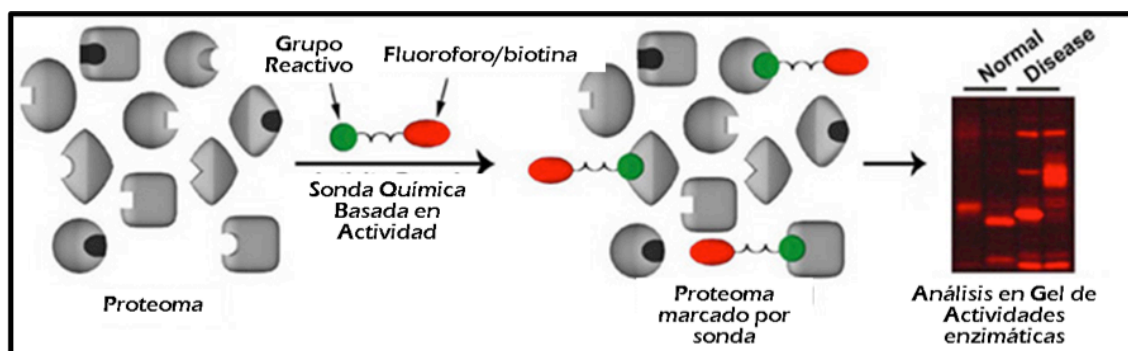


La principal función de las ABPP es la identificación de proteínas diana, que en la actualidad continua siendo la más común y original. Un ensayo típico sería el análisis comparativo de dos o más proteomas para identificar enzimas que difieran en los niveles de actividad. Si los proteomas muestran diferentes propiedades biológicas, ejemplo sano vs tumoral, entonces puede que las actividades enzimáticas alteradas e identificadas puedan informar sobre la biología tumoral o tengan valor diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad.

Las versiones más simples de ABPP usan métodos basados en geles. Los proteomas tratados con las sondas son resueltos, en primer lugar, en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de una (1D) o dos dimensiones (2D) y, posteriormente, las enzimas marcadas eran visualizadas por fluorescencia (para sondas fluorescentes) o blotting de avidina (para sondas biotiniladas) (Figura 22). En este trabajo hemos utilizado sondas marcadas con fluoróforo (TAMRA; Tetrametilrodamina), en geles de

electroforesis SDS-PAGE (Gradiente 4-12% de acrilamida) en condiciones desnaturalizantes.

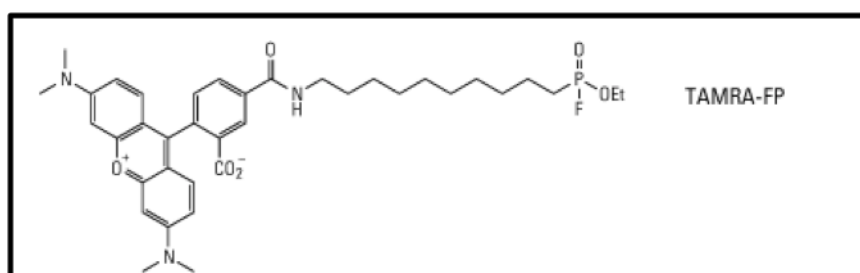
Figura 22. Perfil de proteínas basadas en actividad. Las enzimas marcadas por la sonda son resueltas en un gel de policrilamida, visualizadas y cuantificadas mediante scan de fluorescencia del gel. Tomado de Cravatt y cols., 2008.



3.7.2. Detección de Serina Hidrolasas con FP-TAMRA

Utilizamos la sonda FP-Tamra de Thermo Scientific para la detección de SH activas en las muestras de saliva de pacientes con cáncer y pacientes control. Estas sondas son fluorofosfonatos (FP) que nos permiten identificar, enriquecer y detectar sitios activos de serina hidrolasas activas usando fluorescencia, como método de detección. Este grupo fluorofosfonato se une específicamente y covalentemente a la serina del centro activo de serina hidrolasas enzimáticamente activas. Estas sondas presentan el fluoróforo tetrametilrodamina (TAMRA) para la detección mediante escáner de Fluorescencia (λ_{ex} 543 nm, λ_{em} 575 nm). La estructura de la sonda FP-TAMRA se muestra en la Figura 23

Figura 23. Estructura de la sonda de FP fluorescente que permite identificar, enriquecer y detectar por fluorescencia las enzimas serina hidrolasas activas.



Para el marcaje, las muestras de saliva se diluyen de manera que queden a una concentración de 0,5 µg/µl. A un volumen de 24 µl de saliva se le añade FP-TAMRA para que quede a una concentración de 1 µM. Posteriormente, se procede a la incubación durante 30 min, a temperatura ambiente, con alguna agitación ocasional y se detiene la reacción con la adición de un volumen equivalente (24 µl) de tampón desnaturalizante de electroforesis 2x. Tras calentar las muestras a 95°C, 4 min, se congelan a -20°C hasta su uso.

La visualización de las proteínas unidas a la sonda se realiza mediante un ensayo de electroforesis desnaturalizante (en gradiente del 4-12 % de acrilamida) y posterior detección de la fluorescencia en el equipo “Thyphoon Imager 922” (GE Healthcare Life Sciences).

Los geles con las proteínas de la saliva marcadas son entonces analizados mediante el programa “Gel-Pro Analyzer 3.1” (Media Cybernetics) para asignar un valor numérico asociado a la intensidad de las bandas (densitometría). Se calcula la contribución relativa de las distintas bandas de proteína en cada muestra de saliva para establecer los distintos patrones asociados a enfermedad. Los patrones de bandas de todas las muestras son sometidos a análisis de conglomerados jerárquicos empleando el software SPSS© (versión 15.0).

3.8. Análisis estadísticos de los datos

El análisis estadístico realizado constó de una parte descriptiva y otra parte inferencial.

3.8.1. Estadística descriptiva.

Las variables numéricas se describieron calculando las medidas de tendencia central: media, mediana y moda; y medidas de dispersión: desviación típica y rango.

Las variables cualitativas se describieron mediante su distribución por frecuencias, tanto de la muestra en general, como por grupos de estudio.

Para la representación de los resultados se utilizaron gráficos de barras, gráficos de sectores e histogramas.

3.8.2. Estadística inferencial.

3.8.2.1. Variables cualitativas

A la hora de estudiar la relación entre las variables se utilizó el test de “Chi-cuadrado” (χ^2), con un estudio de residuos tipificados para establecer la dirección de las posibles asociaciones. Se consideró una asociación con potencial estadístico cuando el valor de los residuos tipificados fue >2 o <-2 , y se señaló en las Tablas de contingencia oportunas del apartado resultados mediante negrita

3.8.2.1. Variables cuantitativas con tendencia a la normalidad

Para la comparación de las medias con una variable dicotómica se utilizó la prueba estadística “t de Student”, siempre y cuando una variable fuera de tipo cuantitativo y la otra categórica.

En los casos en los que la variable cualitativa tenía más de 2 categorías, se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA).

Para los cruces de dos variables continuas se realizó un estudio de correlación calculando el coeficiente de Pearson.

Para la representación de los resultados se utilizaron gráficos de dispersión.

3.8.3. Estudio estadístico de la supervivencia

Para la realización del análisis de supervivencia, se utilizó el “estimador de Kaplan-Meier”, método no paramétrico, que calcula la probabilidad del evento fatal (éxito) o no fatal (recidiva) en un intervalo de tiempo medido en meses.

Para conocer si la función de riesgo era diferente en la distribución de dos o más variables, se utilizó la prueba de contraste de Mantel-Cox (Log Rank) por estratos.

Se analizó la supervivencia de forma global (SG) y libre de enfermedad (SLE) de un total de 109 pacientes en seguimiento desde el comienzo del estudio hasta la fecha

del 1 de Julio de 2014 (73 meses), excluyendo a 3 pacientes que se consideraron perdidos.

Para valorar el efecto de un número elevado de factores de riesgo sobre la SG, se empleó el análisis multivariado de Cox, introduciendo todas las variables que en el análisis univariante tuvieron una significación estadística con valor $p < 0,05$. Utilizamos el método “backward” o “hacia detrás”, para ir eliminando en cada paso las variables que menos contribuían al ajuste del mismo, tras comprobar su significación mediante el índice de Wald (IW). Aquellas variables con $IW > 1,96$ se conservaron en el modelo por contribuir de forma significativa ($p < 0,05$).

3.8.4. Análisis Cluster, por conglomerados jerárquicos.

El “método de WARD” de varianza mínima y la distancia euclídea al cuadrado fue utilizado como procedimiento de aglomeración de cluster jerárquico.

3.8.5. Estudio de validación de una prueba diagnóstica

Se elaboraron diferentes curvas de análisis: curvas ROC acrónimo de Receiver Operating Characteristic, para la representación gráfica de la Sensibilidad frente a 1-Especificidad. El punto de corte óptimo se determinó para cada patrón de banda salivar mediante la búsqueda del índice de Youden (IY) o punto máximo de sensibilidad y especificidad.

El área bajo la curva (AUC) se calculó mediante la integración numérica de las curvas ROC. La banda que presentó mayor AUC, fue identificada como predictor más fuerte en la detección de CECC.

Se calculó la Sensibilidad, Especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN), valor global (VG) y error global (EG) de cada prueba analizada.

Para el estudio de nuestra muestra, se clasificaron a los sujetos en cuatro grupos según una Tabla 2x2 como la que se muestra en la Tabla. En ella, se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el estado real de los pacientes (en columnas) o, en su defecto, el resultado de la prueba de referencia o “gold standard”.

El resultado de la prueba puede ser correcto (verdadero positivo y verdadero negativo) o incorrecto (falso positivo y falso negativo).

Tabla 5 . Tabla 2x2, representación del resultado de la prueba diagnóstica (test + o test -) en filas y, del estado real de los pacientes (enfermo o sano en función del “Gold Standart”).

	Enfermedad +	Enfermedad -	Total
Test +	a (verdaderos positivos)	b (falsos positivos)	a+b
Test -	c (falsos negativos)	d (verdaderos negativos)	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d=n

Para la definición de las variables dicotómicas: enfermedad y sano, se utilizó como prueba “Gold Standart”, el estudio anatomopatológico.

A continuación se reflejan los estimadores utilizados en función de su validación interna o externa:

Validez interna

Sensibilidad

Se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo, es decir, la probabilidad de que para un sujeto enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar la enfermedad.

Se estima como la sensibilidad como la proporción de pacientes enfermos que obtuvieron un resultado positivo en la prueba diagnóstica; de ahí que también la sensibilidad se conozca como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Especificidad

Se define como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. En otras palabras, se puede definir la especificidad como la capacidad para detectar a los sanos. La especificidad se estimaría por tanto como:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

De ahí que también sea denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)”.

Validez Externa

La seguridad de una prueba diagnóstica. Valores predictivos.

La Sensibilidad y la Especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto como positivo o negativo en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, para conocer la probabilidad de que el paciente este realmente enfermo o sano, ante un resultado positivo o negativo en la prueba, necesitamos de los valores predictivos completaremos (Altman y cols; 1994)

Valor predictivo positivo:

Definido como la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test. El valor predictivo positivo puede estimarse, por tanto, a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en la prueba que finalmente resultaron estar enfermos:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

Valor predictivo negativo:

Definido como la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano. Se estima dividiendo el número de verdaderos negativos entre el total de pacientes con un resultado negativo en la prueba:

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

3.9. Nivel de significación

Todos los resultados se consideraron significativos para un nivel $\alpha < 0.05$.

3.10. Programa informático y análisis

El análisis se llevó a cabo con el programa estadístico "SPSS.15.0". Los datos obtenidos fueron analizados y tratados de forma conjunta con el servicio de estadística del FFIS (Fundación para la formación e Investigación Sanitaria).

3.11. Cumplimiento normas éticas y legales

Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados previamente y firmaron el consentimiento informado diseñado (ANEXO I), para recolección de muestras biológicas.

Los investigadores se comprometieron a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, en conformidad a la **Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal**; el **Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma**, así como la **Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente**

y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica y documentos contenidos en el archivo (ANEXO IV).

3.12. Limitaciones del estudio

La principal dificultad que hemos encontrado al realizar este trabajo ha sido el diseño del mismo. El llevar a cabo un estudio retrospectivo conlleva implícitas una serie de limitaciones. En primer lugar, hemos tenido dificultades con la búsqueda, lectura y comprensión de las historias clínicas. El sistema informatizado con los modelos unificados de historia clínica se instauró de forma progresiva en nuestra unidad a partir del año 2013, por lo que el grueso de nuestras historias han sido analizadas mediante el formato clásico en papel. Nos encontramos con una gran heterogeneidad en la lectura de estas historias, ya que muchas de ellas carecían de aspectos tan importantes como los antecedentes personales, una descripción anatómica exhaustiva de las características tumorales o una estadificación siguiendo el sistema de clasificación definido por la “American Committee on Joint Cancer (AJCC)”.

Nuestro Servicio de Otorrinolaringología pertenece a un Hospital Clínico y Universitario, en el que, tanto los especialistas adjuntos FEA como los residentes médicos en formación, realizan una intensa labor asistencial y quirúrgica. En nuestra serie, eminentemente quirúrgica, no hemos tratado de forma distinta el resultado de la cirugía, en función del tipo de médico que la haya realizado, ya que consideramos que, independientemente del primer cirujano, todas las intervenciones han sido supervisadas por un médico adjunto.

Este trabajo ha sido fruto de un gran esfuerzo conjunto entre el personal del Servicio de Otorrinolaringología y la Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos (Laboratorio de Terapia Molecular y Biomarcadores de Cáncer). Durante los 7 años que lleva en vigor la línea de investigación, los recortes económicos han acarreado la pérdida en el equipo de parte del personal dedicado a este proyecto, lo que ha influido de forma directa en la evolución del mismo. Por motivos de financiación no se ha podido realizar el análisis de identificación completa de las proteínas encontradas en las sondas salivares, mediante el marcaje con FP-TAMRA.

4. Resultados

Si buscas resultados distintos no hagas siempre lo mismo

A. Einstein

4.1 Análisis descriptivo de las variables de la muestra

4.1.1 Características sociodemográficas de los pacientes

Para el estudio descriptivo de las variables clínicas se contó con un total de 112 paciente.

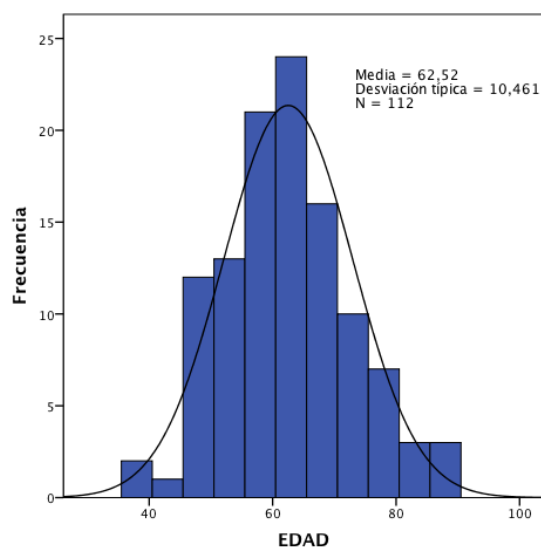
Edad

Con respecto a la variable edad, **la media encontrada fue de 62,52 años**, con una moda de 59 años y una desviación típica de 10,406. La máxima edad fue de 87 años y la mínima de 38.

Tabla 6. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable edad.

N	Válidos: 112
Media	62,52
Moda	59
Desviación típica	10,406
Mínimo	38
Máximo	87

Figura 24. Histograma correspondiente a la variable edad



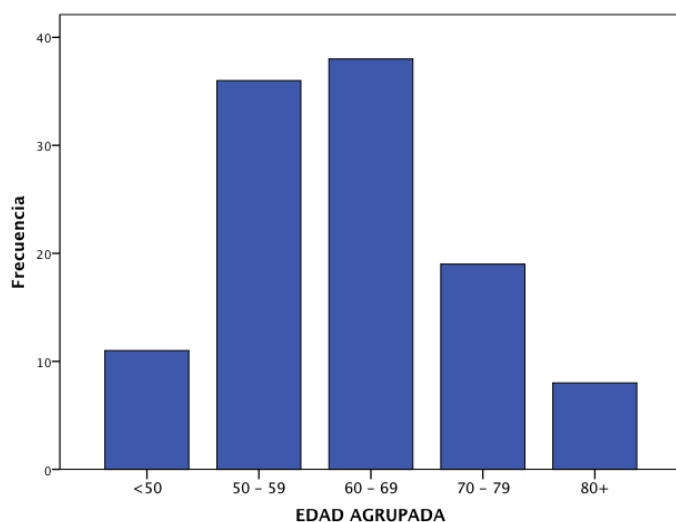
En la distribución de los pacientes por edades, encontramos que la mayoría (33,9%) estaban en una edad comprendida entre los 60 y 69 años; el 32,1% entre los 50 y 59 años; el 17,0% entre los 70 y 79, y el 9,8% y 7,1% eran menores de 50 y mayores de 80 años, respectivamente (Tabla 7 y Figura 25).

En la agrupación de los pacientes por edades, con valores comprendidos entre los 50 y 69 años, se encontraron el 66,0% del total.

Tabla 7. Distribución de las distintas agrupaciones de la variable edad.

	Frecuencia	Porcentaje (%)	
Válidos	Menores de 50 años	11	9,8%
	50-59	36	32,1%
	60-69	38	33,9%
	70-79	19	17,0%
	Mayores de 80 años	8	7,1%
	Total	112	100,0

Figura 25. Gráfico de barras correspondiente a las agrupación de la variable edad.



Como se refleja en la Figura 26, en los tumores de localización laríngea, el grupo de edad más frecuente encontrado fue el comprendido entre los 60 y los 69 años (36,7%), mientras que en los tumores faríngeos fue entre los 50 y los 59 (60%).

De forma similar, se distribuyeron por grupos de edad los tumores laríngeos de localización glótica y supraglótica y los estadios tumorales, como se puede observar en las Figuras 27 y 28.

Figura 26. Gráfico de barras correspondiente a la relación entre la variable localización tumoral y edad agrupada. (p=0,144).

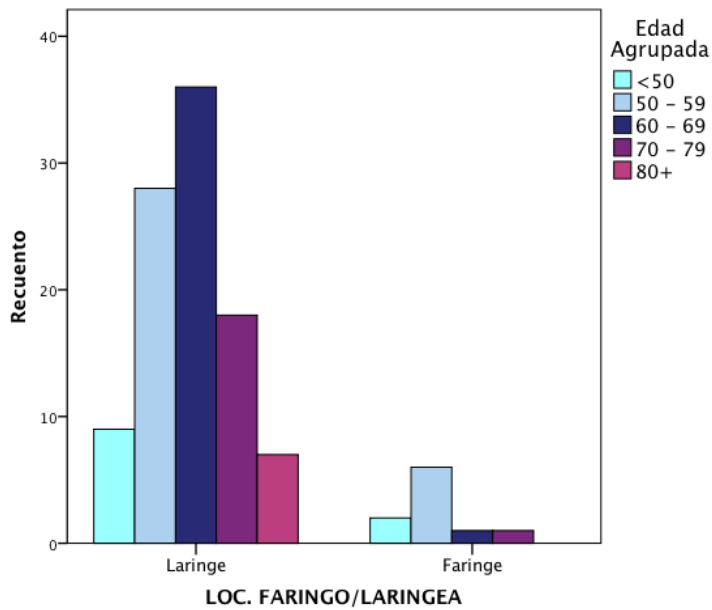


Figura 27. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la variable localización laríngea del tumor primario y edad agrupada. (p=0,627).

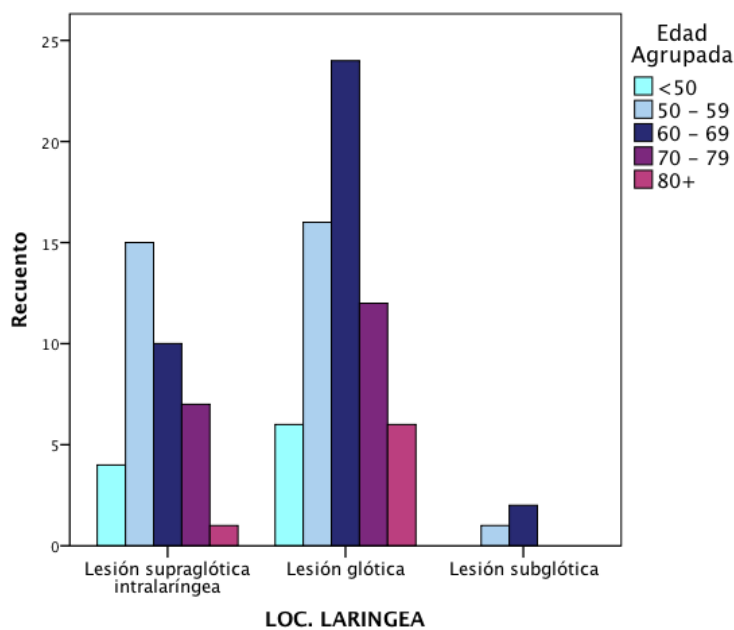
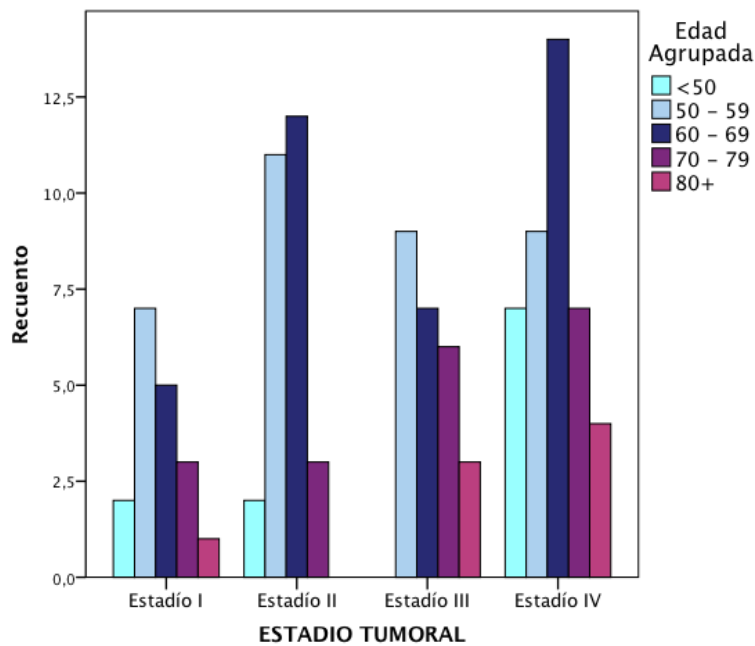


Figura 28. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la variable estadio tumoral y edad agrupada. ($p=0,386$).

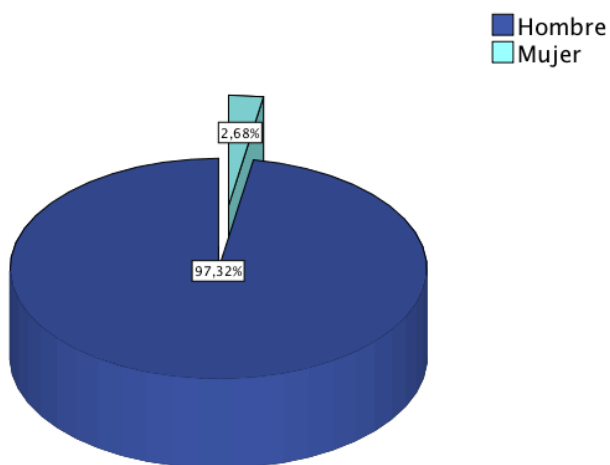


Sexo

La amplia mayoría de los pacientes eran varones ($n=109$) frente a una minoría de mujeres ($n=3$), lo que se correspondió con un porcentaje de 97,3%, frente a 2,7%.

La relación hombre/mujer fue de 36/1.

Figura 29. Gráfico de sectores correspondiente a la distribución de la variable sexo.



Comarca sanitaria

La Región de Murcia esta distribuida en 9 áreas de salud, cada una independiente entre sí, en lo referente al ámbito de la gerencia. **El 63,4% de los pacientes incluidos pertenecían al área de salud I (Murcia/Oeste)**, cuyo centro de referencia es el HCUVA. El resto de pacientes incluidos pertenecían a diferentes áreas: el 13,4% al área III (Lorca), el 9,8% al área IV (Noroeste), el 8,0% al área V (Altiplano), el 1,8% área VI y IX (Vega Media del Segura y Vega Alta del Segura), y el 0,9% a las áreas VII y VIII, respectivamente (Murcia Este y Mar Menor). (Tabla 8).

Tabla 8. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable comarca sanitaria.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Murcia Oeste	71	63,4
	Lorca	15	13,4
	Noroeste	11	9,8
	Altiplano	9	8,0
	Vega Media	2	1,8
	Vega Alta	2	1,8
	Murcia Este	1	0,9
	Mar Menor	1	0,9
	Total	100,0	100,0

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre la comarca sanitaria y la sintomatología inicial del tumor primario, al igual que entre la comarca sanitaria y el hábito tóxico tabáquico y alcohólico ($p=0,137$; $0,713$; $0,750$).

En todos los pacientes de la comarca, las tumoraciones localizadas en la región laríngea fueron las más frecuentes. La región glótica fue la más habitual en todas las áreas de salud, a excepción de la comarca del Altiplano, en la que fue la localización supraglótica (55,6%).

Año de diagnóstico

Las fechas de inclusión de los pacientes en el estudio fueron las comprendidas entre Enero de 2008 y Diciembre de 2012. Se analizaron los datos de los pacientes y la evolución de los mismos hasta el día 1 de Julio de 2014, en el que se cerró el estudio. 2010 fue el año en el que se incluyeron más pacientes al estudio: 34 (30,4%); en 2009 y 2012, 26 pacientes/año, el 46,4 % de la muestra, mientras que en 2008 y 2011, 13 pacientes/año, (23,2%). (Tabla 9).

Tabla 9. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable año de diagnóstico.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	2008	13
	2009	26
	2010	34
	2011	13
	2012	26
	Total	100,0

4.1.1 Características clínicoepidemiológicas de los pacientes

Síntomas, signos y motivo de consulta

El 97,3% de los pacientes asistieron al Servicio de Otorrinolaringología por un cuadro clínico específico, mientras que tan sólo el 2,7%, lo hicieron por un hallazgo radiológico.

El síntoma más frecuente motivo de consulta fue la disfonía, en un 75,9% de los pacientes, seguido de disfagia (27,7%), odinofagia (26,8%) y disnea (26,1%). Otros motivos de consulta fueron: otalgia refleja en el 16,2% de los pacientes, parestesias y sensación de cuerpo extraño orofaríngeas en el 14,2%, tumoración cervical en el 13,4% y tos crónica y hemoptisis en el 8,2 y 7,2%, respectivamente. (Tabla 10).

Tabla 10. Estadística descriptivo de las variables correspondientes a la sintomatología inicial.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Disfonía	85	75,9
	Disfagia	31	27,7
	Odinofagia	30	26,8
	Disnea	29	26,1
	Otalgia refleja	18	16,1
	Sensación cuerpo extraño	16	14,4
	Tumoración cervical	15	13,4
	Tos crónica	9	8,0
	Hemoptisis	8	7,1

Encontramos una relación estadísticamente significativa entre el síntoma clínico disfonía y la localización tumoral primaria laríngea ($p=0,001$), al estar presente ésta en el 83,2% de los pacientes con esta patología. Al buscar asociación entre la localización del tumor primario y determinadas sintomatologías específicas, encontramos que, dentro de la localización laríngea, el síntoma disfonía fue el que se asoció en mayor frecuencia con la localización glótica (98,4%; $p=0,001$), seguido de la región supraglótica (56,8%) y la subglótica (50%) ($p=0,001$).

Se observó, así mismo, una asociación significativa ($p=0,024$) entre la presencia del síntoma clínico disfagia y la relación con estadios clínicos más avanzados, al igual que con el síntoma disnea ($p=0,004$). El 57,1% de los pacientes con disnea se catalogaron como estadio clínico IV, el 25,0% en estadio III y el 17,9% en estadio II, sin encontrarse ningún paciente en estadio I.

El signo clínico referente a la palpación de adenopatías laterocervicales en la exploración física, fue positivo en 24 pacientes (21,42%), con una relación estadísticamente significativa entre éste y la localización tumoral supraglótica ($p=0,001$). El 75% de los pacientes que presentaron adenopatías laterocervicales palpables en la exploración física, tenían tumoraciones de la región laríngea

supraglótica o hipofaringea, en contra del 25% restante que fueron de localización glótica. La presencia de estas adenopatías se relacionó con estadios avanzados; el 86,7% de los pacientes con ganglios cervicales en la palpación física se incluyeron en estadios clínicos IV, mientras que el 13,3% en estadios III ($p=0,001$).

Tiempo de evolución

Atendiendo al tiempo que tardaron los pacientes en acudir a la consulta de Otorrinolaringología con respecto al inicio de la sintomatología, el 52,1% asistieron entre la semana 12 y 35 (3-9 meses); el 19,8% lo hicieron de forma precoz en menos de 12 semanas (0-3 meses) y el 28,1% tardaron más de 35 semanas (9 meses). (Tabla 11). No se encontró una asociación significativa entre esta variable, localización y estadio tumoral ($p=0,876$; $0,167$).

Tabla 11. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable tiempo de evolución.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	< 12	19	17,0
	12-35	50	44,6
	> 36	27	24,1
Total		100,0	100,0

Hábitos tóxicos

Con respecto a la variable hábito tabáquico, apreciamos que el 91,8% de los pacientes se manifestaron fumadores en la entrevista médica (Tabla 12). El grado de hábito tabáquico queda reflejado en la Tabla 13.

Tabla 12. Estadístico descriptivo de la variable hábito tabáquico.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Fumador	101	91,8
	No Fumador	9	8,2

Figura 30. Gráfico de sectores correspondiente a la variable hábito tabáquico.

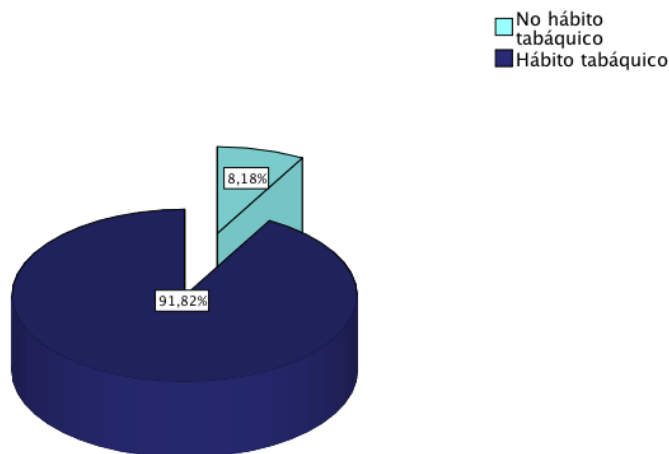


Tabla 13. Estadístico descriptivo correspondiente al grado de hábito tabáquico.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Severo	89	85,6
	Moderado	9	8,7
	Leve	3	2,9
Total		100,0	100,0

Atendiendo a la variable consumo de alcohol, el 66,4% de los pacientes manifestaron un consumo diario continuado. El 39,5% se manifestó bebedor empedernido, el 36,5% bebedor moderado y el 24,3% bebedor ocasional.

Tabla 14. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable alcohol.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Hábito alcohólico	73	66,3
	No hábito alcohólico	37	33,6

Figura 31. Gráfico de sectores correspondiente a la variable hábito alcohólico.

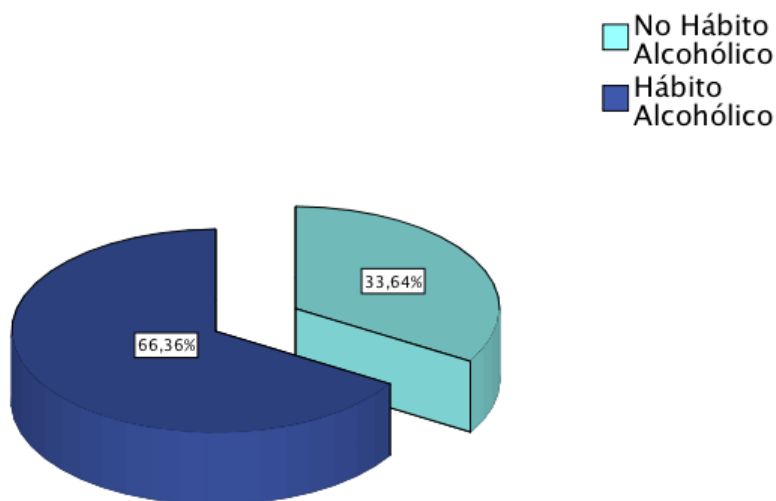


Tabla 15. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable hábito alcohólico.

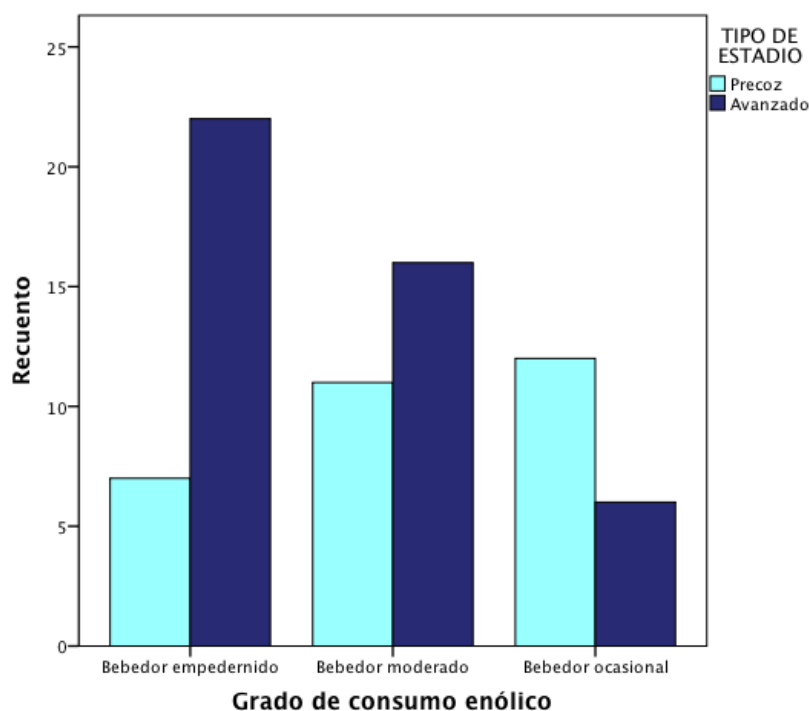
		Frecuencia	Porcentaje
Válidos	Empedernido	29	39,2
	Moderado	27	36,5
	Ocasional	18	24,3
Total		100,0	100,0

No se apreciaron diferencias significativas entre el hábito tabáquico y su grado de actividad con la localización laríngea del tumor primario ($p=0,298$; $0,852$); sí se encontró en la asociación entre hábito enólico y localización laríngea del tumor primario en la región supraglótica ($p=0,013$). El 83,8% de los pacientes con tumoración supraglótica presentaron hábito enólico continuo, descendiendo este porcentaje al 54,8% en la localización glótica.

El hábito enólico empedernido se relacionó con la localización supraglótica (45,2%) y el moderado con la localización glótica (41,2%) sin ser esta relación estadísticamente significativa ($p=0,349$).

Se halló asociación estadísticamente significativa entre la presencia de hábito tabáquico leve y moderado, con la estadificación clínica en fases precoces ($p=0,004$), y entre hábito tabáquico severo con estadios avanzados, ya que el 94,7% y el 85,0% de los pacientes en estadio IV y III, respectivamente, eran fumadores con hábito severo. En cuanto al hábito enólico, se objetivó que los pacientes con hábitos empedernidos se diagnosticaron en etapas clínicas más avanzadas ($p=0,045$).

Figura 32. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre hábito alcohólico y el tipo de estadio tumoral ($p=0,013$).



Antecedentes personales clínicos

En 112 pacientes se detectaron antecedentes clínicos, de los cuales en 64 (56,6%) se encontró patología asociada. La patología clínica de base asociada más frecuente fue la respiratoria; patología obstructiva crónica se halló en el 32,7% de los pacientes; le siguió la patología cardíaca (isquémica, insuficiencia cardíaca y arritmias) en el 23,9%. El 28,3% de los pacientes tenían hipertensión arterial en tratamiento y el 17,7% Diabetes Mellitus. No tuvimos pacientes con infección por Virus de la

Inmunodeficiencia Adquirida ni trasplantados. Un 5,3% de los pacientes referían antecedentes de patología digestiva (reflujo gastroesofágico).

Antecedentes personales tumorales

Se encontraron antecedentes personales tumorales en 15 pacientes (13,4%): 7 (6,2%) presentaron antecedentes tumorales prostáticos; 2 (1,8%) antecedentes de pulmón, oral y digestivo; 1 (0,9%) de mama y 1 (0,9%) de otras localizaciones.

Antecedentes familiares tumorales

En 87 pacientes no se encontró ningún tipo de antecedente familiar tumoral de interés. En 24 (21,4%) se hallaron antecedentes familiares tumorales: 4 de ellos (3,5%) se relacionaron con familiares próximos mediante vínculos sanguíneos de cáncer de laringe; 20 (17,9%) tenían algún familiar próximo con vínculos de sangre con cáncer no laríngeo.

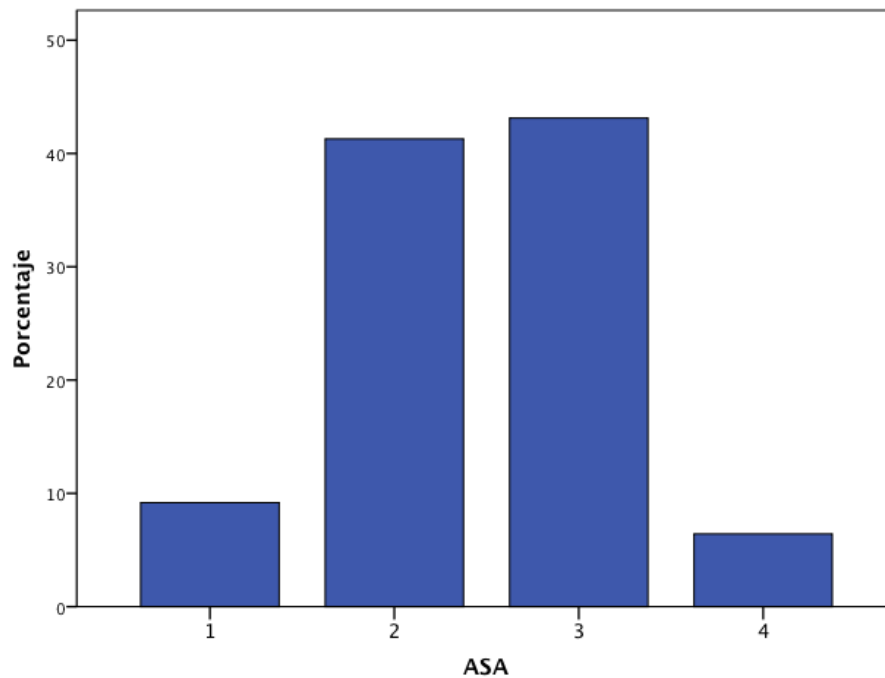
Características Anestésicas

Con respecto al sistema de clasificación que emplea la America Society of Anesthesiologist (ASA), el 42,0% de los pacientes se clasificó como ASA III en el estudio anestésico previo a la cirugía; el 41,3% como ASAI, el 9,2% como ASA I y el 6,4%, como ASA IV.

Tabla 16. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable anestésica: ASA.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	ASA I	10	9,2
	ASA II	45	41,3
	ASA III	47	42,0
	ASSA IV	7	6,4

Figura 33. Gráfico de barras correspondiente a la distribución por categorías de la variable ASA (I, II, III y IV).



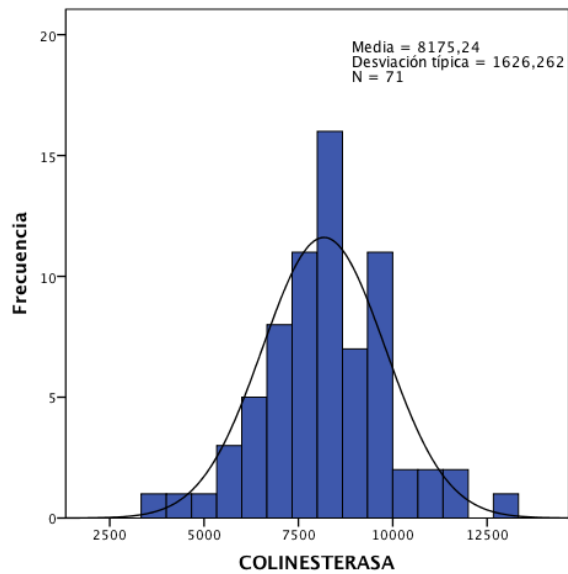
Colinesterasa en suero

En la Tabla 17 y en la Figura 34 se reflejan las distribuciones obtenidos a partir de la variable valor de colinesterasa en suero.

Tabla 17. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable colinesterasa.

N	112
Media	8175,24
Desviación típica	1626,262
Mínimo	3827
Máximo	12744

Figura 34. Histograma de la variable colinesterasa en suero



Teniendo en cuenta el rango de normalidad del parámetro analizado se encontró que el 95,8% permaneció en valores de 5.321-12.920, considerados como normales, el 4,2% por debajo de 5.320 y el 0% por encima de 12.920. Tabla 18.

Tabla 18. Estadístico descriptivo correspondiente a la agrupación de la variable colinesterasa

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	<5320	3	4,2
	5321-12.920	68	95,8
	>12.920	0	0

4.1.3. Características del tumor primario

Características del tumor en estudio

El 75,0% de los tumores de la muestra se correspondieron con tumores primarios de localización faringolaríngea; el 25,0% restantes eran recidivas de otros tumores primarios, segundos tumores de otra localización o metástasis ganglionares de origen no conocido de cabeza y cuello, según se refleja en la Tabla 19 y en la Figura 35.

Tabla 19. Estadístico descriptivo de la distribución del tumor en estudio.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Tumor Primario	84	75,0
	Recidiva tumoral	21	18,8
	Segundo tumor	3	2,7
	Metástasis ganglionar OD	4	3,6
	Total	112	100,0

Figura 35. Diagrama de sector correspondiente a la distribución de la variable características del tumor a estudio.

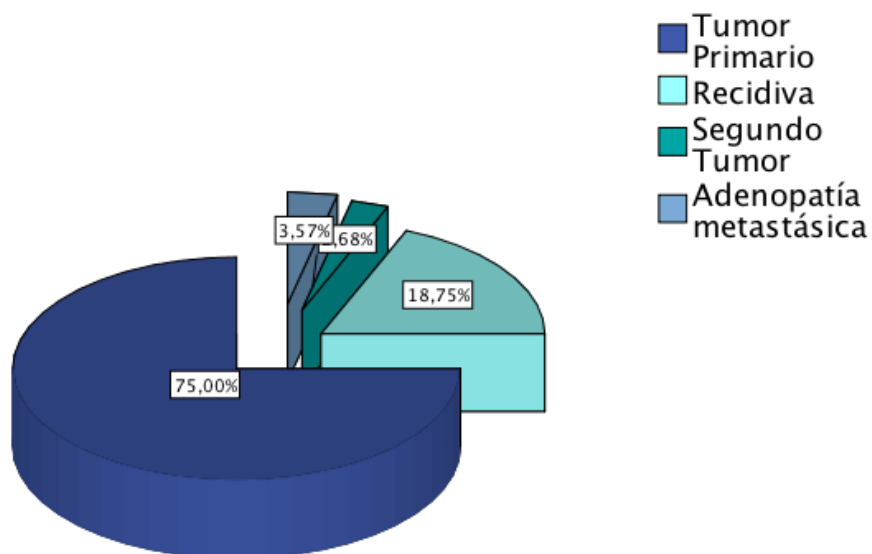


Tabla 20. Estadístico descriptivo correspondiente a la distribución de la variable recidiva tumoral.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Recidiva Local	12	57,1
	Recidiva ganglionar	2	9,5
	Recidiva	7	33,3
	locoganglionar		
		21	100,0

Tabla 21. Estadística descriptiva e inferencial correspondiente al tipo de tratamiento previo ofertado en función del tamaño tumoral (T) en los pacientes con recidiva tumoral (p=0,001).

		RT/QT	Qx
Válidos	T1	8	1
	T2	1	3
	T3	5	1
	T4	1	1
		15	6

Localización anatómica del tumor primario

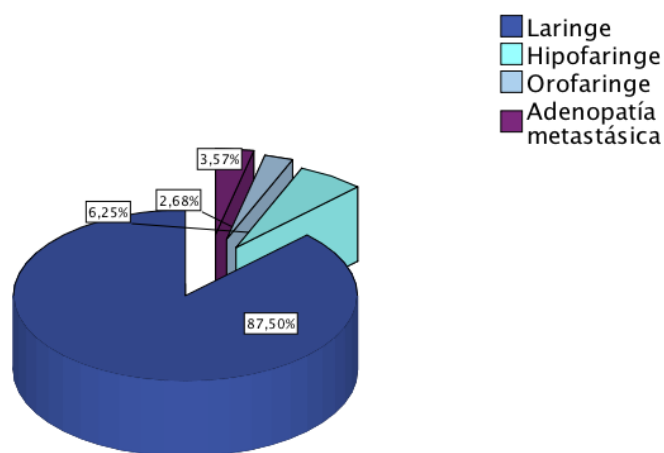
La localización del órgano laríngeo fue la más frecuentemente afectada, con un total de 98 pacientes, lo que se correspondió con el 87,5% de la muestra; le siguió la localización faríngea, 10 (9,0%), y ganglionar cervical, 4 (3,6%) (Tabla 22 y Figura 36)

Tabla 22. Estadísticos descriptivos correspondiente a la localización anatómica del tumor primario.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Laringe	98	87,5
Hipofaringe	7	6,2
Orofaringe	3	2,6

Válidos	Afectación	4	3,5
	Ganglionar cervical		
	Total	112	100,0

Figura 36. Distribución por frecuencia correspondiente a la localización anatómica del tumor primario.



La afectación global faringolaríngea de la muestra se correspondió con el **96,4% del total**; el 3,6% restante con afectación ganglionar metastásica con tumor primario epidermoide de localización desconocida.

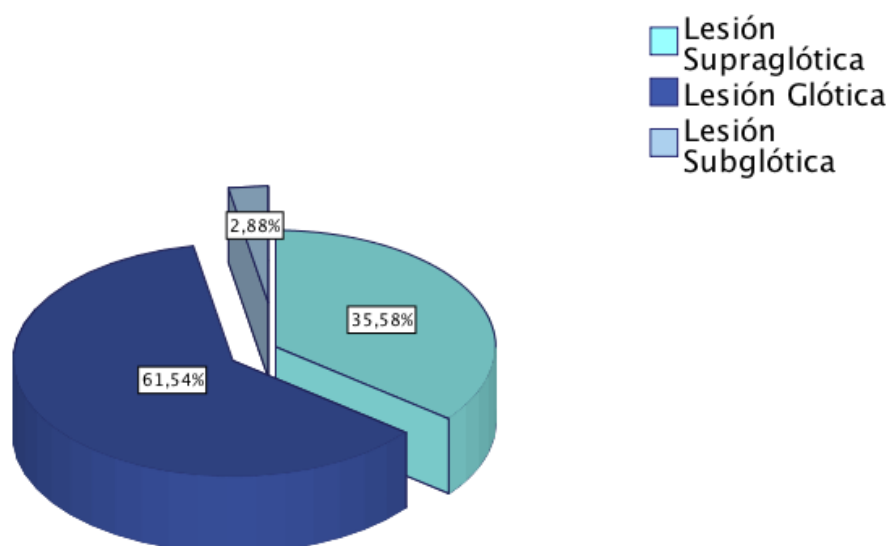
Con respecto a la afectación global laríngea, se encontraron un total de 104 pacientes (92,9%); resultado de la suma de tumores laríngeos propiamente dichos (n=98) y aquellos primarios faríngeos con extensión laríngea (n=6).

El área anatómica en la que las neoplasias iniciaron su desarrollo con mayor frecuencia en nuestra serie fue la región glótica (61,5%) seguida de la región supraglótica (35,6%) y de la región subglótica (2,9%) (Tabla 23).

Tabla 23. Estadístico descriptivo de la distribución del tumor por localización anatómica en los compartimentos laríngeos.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Lesión Supraglotis	37	35,5
	Lesión Glotis	64	61,5
	Lesión Subglotis	3	2,8
	Total	104	100,0

Figura 37. Gráfico de sectores correspondiente a la distribución por frecuencias del tumor en los compartimentos laríngeos.



Clasificación TNM

El sistema de clasificación de la “American Joint Committee on Cancer (AJCC)” ha sido el que hemos utilizado para la nomenclatura y estadiaje de cada tipo de tumoración primaria.

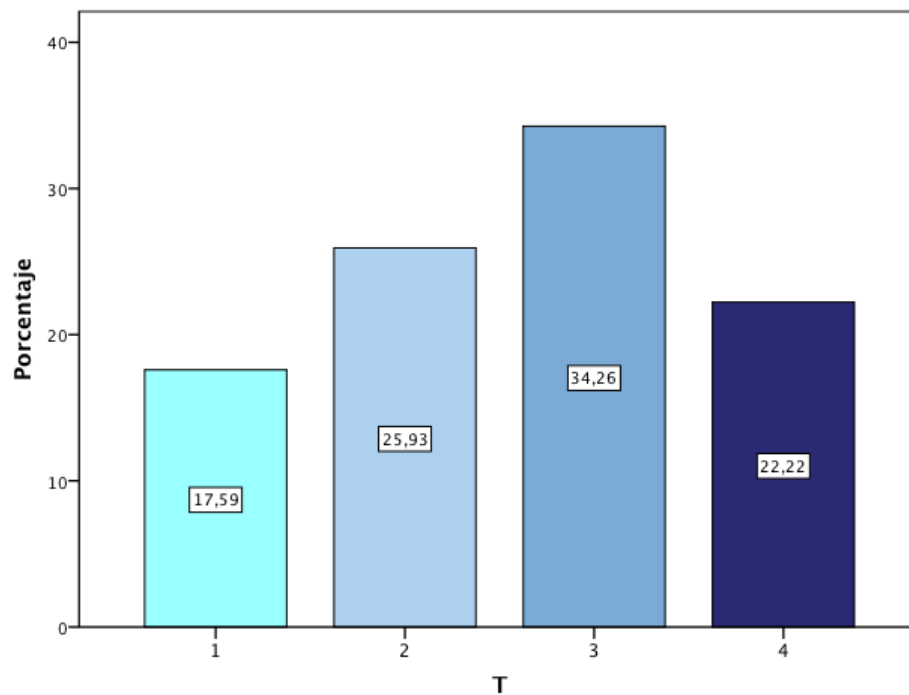
Tamaño y Extensión del Tumor primario (T)

De forma global, apreciamos que el grupo más frecuente fue el perteneciente al tamaño o extensión T3 (34,2%), seguido del T2 (25,9%), del T4 (22,2%) y del T1 (17,5%), tal y como se muestra en la Tabla 24 y en la Figura 38.

Tabla 24. Estadístico descriptivo del tamaño y extensión tumoral (T).

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	T1	19	17,5
	T2	28	25,9
	T3	37	34,2
	T4	24	22,2
Total		108	96,4

Figura 38. Gráfico de barras correspondiente a la distribución de la variable tamaño y extensión del tumor primario (T).

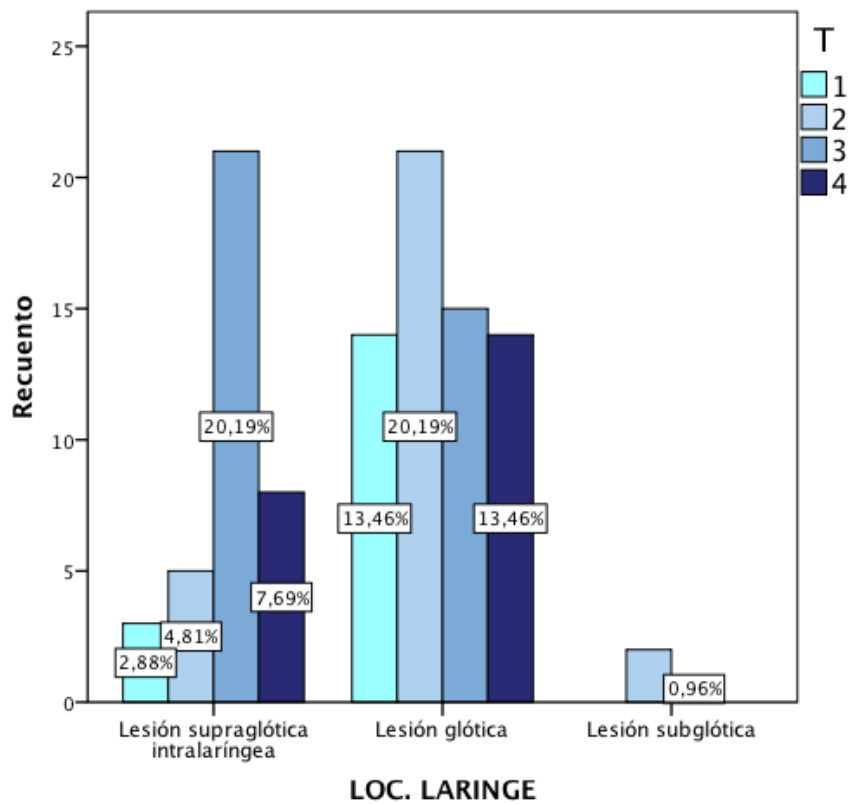


Como podemos apreciar en la Figura 39, en los tumores laríngeos de origen supraglótico, los T3 representaron el grupo más frecuente (56,8%); sin embargo, en los tumores glóticos, el grupo más frecuente fue el T2 (32,8%).

Tabla 25. Asociación entre la localización tumoral y el T. Expresado en número de pacientes y porcentaje dentro del grupo localización tumoral.

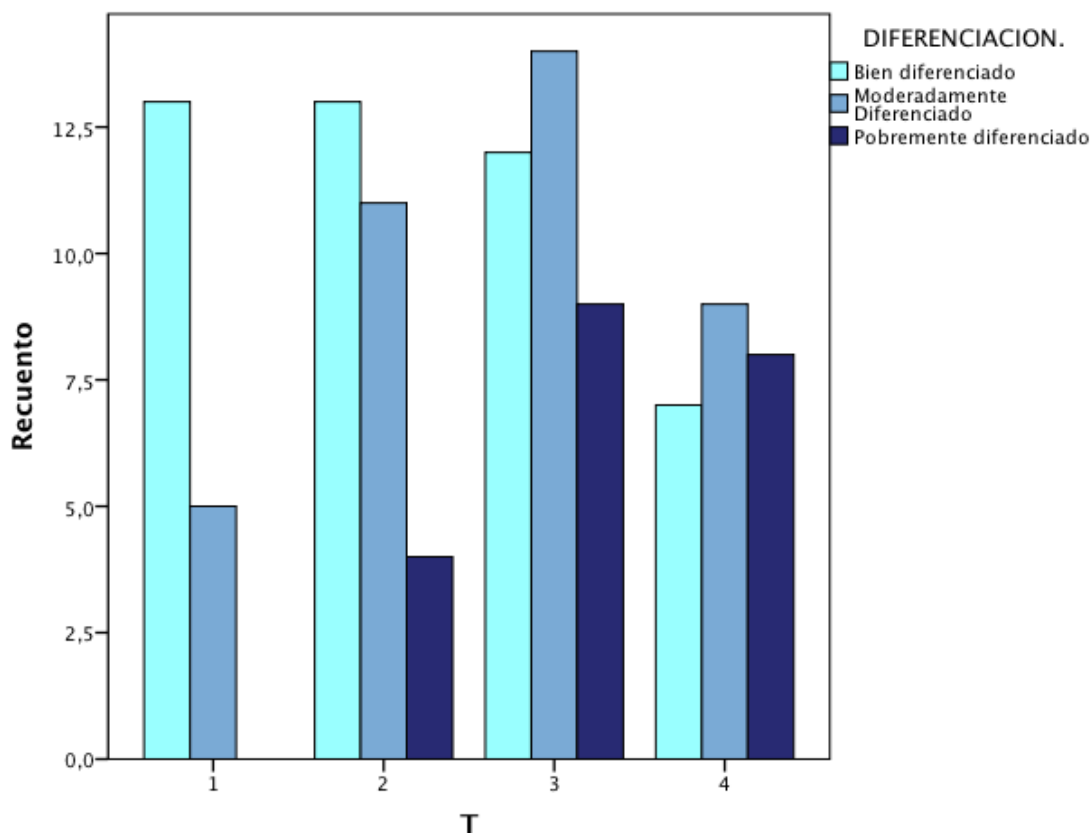
	T1	T2	T3	T4	Total
Supraglotis	3	5	21	8	37
%Localiz.	8,1%	13,5%	56,8%	21,6%	
Glottis	14	21	15	14	64
%Localiz.	21,9%	32,8%	23,4%	21,9%	
Subglottis	0	2	1	0	3
%Localiz.	0,0%	66,7%	33,3%	0%	
Hipofaringe	0	0	3	4	7
%Localiz.	0,0%	0,0%	42,9%	57,1%	
Orofaringe	2	0	0	1	3
%Localiz.	66,0%	0,0%	0,0%	33,3%	

Figura 39. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la localización laríngea del tumor primario con el tamaño o extensión tumoral (T). ($p=0,012$).



La sintomatología de inicio se relacionó con el T clínico, de tal forma que se observó una asociación significativa entre el T3 tumoral y el síntoma disfonía ($p=0,017$), disfagia ($p=0,023$) y disnea ($p=0,005$), sin ser esta asociación significativa para el síntoma odinofagia ($p=0,421$). Los tumores con T3 y T4 se asociaron con resultados anatomopatológicos de carcinoma epidermoide con pobre diferenciación, mientras que los T1 y T2 se asociaron con carcinomas epidermoides bien y moderadamente diferenciados, con una significación estadística ($p=0,008$); Figura 40. No se observó relación entre T y la presencia de rotura capsular.

Figura 40. Asociación entre el T y el grado de diferenciación anatomopatológica (p=0.045).



Ganglios regionales (N)

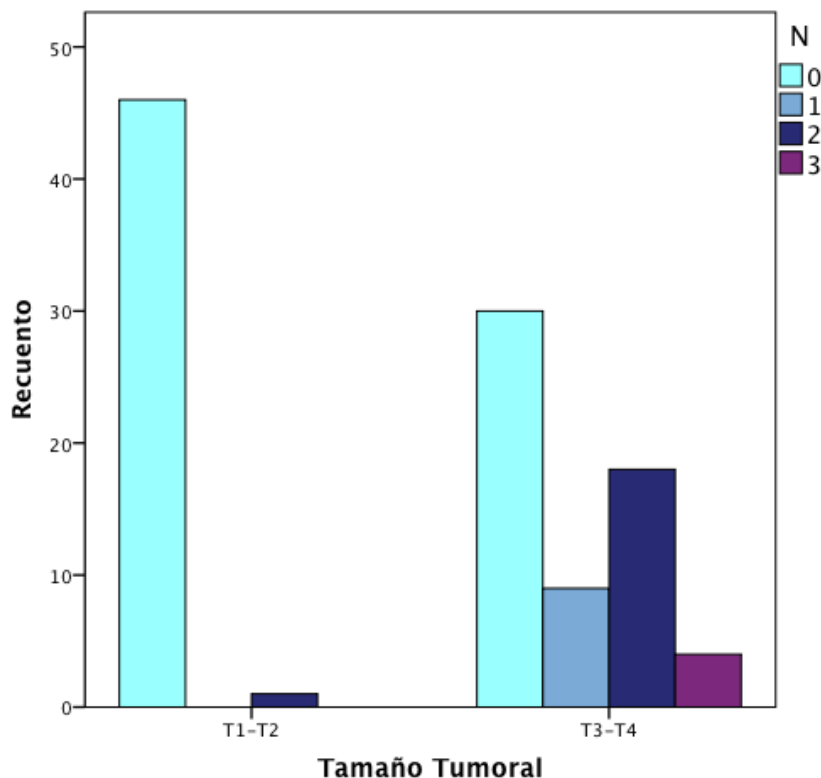
En el análisis de las adenopatías metastásicas, se detectó que **en la mayoría de los pacientes estudiados (67,6%) no se encontraron adenopatías en la exploración física ni radiológica, compatibles con malignidad (N0)**; en el 17,1% se hallaron adenopatías metastásicas ipsilaterales o bilaterales con tamaño comprendido entre 3 y 6 centímetros (N2); en el 8,1%, se describieron adenopatías metastásicas en un solo ganglio linfático ipsilateral y con diámetro < de 3cms (N1). En el 7,2% de los pacientes se detectaron adenopatías metastásicas de gran tamaño, con diámetro >6 cm (N3).
Tabla 26.

Tabla 26. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable ganglios regionales (N).

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	N0	76	67,9
	N1	9	8,1
	N2	19	17,1
	N3	8	7,2
	Total	112	100,0

En los tumores precoces (T1-T2) el porcentaje de N0 fue del 97,9%, detectándose adenopatías metastásicas tan sólo en el 2,1% restante (N2). En tumores avanzados (T3-T4), se manifestaron adenopatías metastásicas en el 50,9% de los casos.

Figura 42. Asociación entre la variable N y el tamaño tumoral T, agrupado como precoz (T1-T2) y avanzado (T3-T4). ($p=0,001$).



Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas ($p=0,001$) entre la presencia de tumor primario en la región supraglótica y los estadios avanzados con

adenopatías regionales N2 (76,5%) y N3 (100%). En los tumores primarios glóticos son más frecuentes los estadios menos avanzados N0 (74,7%) y N1 (50,0%). En los tumores de localización subglótica no se manifestaron adenopatías regionales positivas en ningún paciente; N0 (100%). Figura 43 y Tabla 27.

Figura 43. Asociación entre la variable N y la localización del tumor primario (p=0,001).

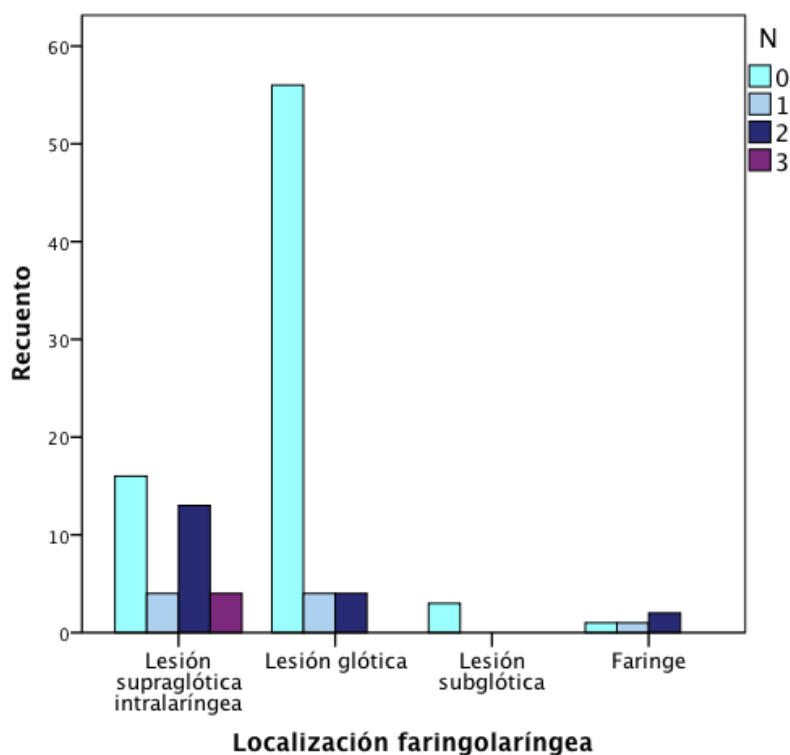


Tabla 27. Asociación N con localización tumoral primaria laríngea. (p=0,001).

	N0	N1	N2	N3	Total
Supraglotis	16	4	13	4	37 (35,6%)
%Localiz	43,2%	10,8%	35,1%	10,8%	
%N	21,3%	50,0%	76,5%	100,0%	
%Total	15,4%	3,8%	12,5%	3,8%	
Glottis	56	4	4	0	64 (61,5%)
%Localiz	87,5%	6,3%	6,3%	0%	
%N	74,7%	50,0%	23,5%	0%	
%Total	53,8%	3,8%	3,8%	0%	

Subglotis	3	0	0	0	3 (2,9%)
%Localiz	100%	0%	0%	0%	
%N	4,0%	0%	0%	0%	
%Total	2,9%	0%	0%	0%	

Tabla 28. Asociación N con localización tumoral primaria faríngea.

	N0	N1	N2	N3	Total
Hipofaringe	3	0	3	1	7
Orofaringe	1	1	1	0	3

Con respecto a la asociación entre el N y la diferenciación anatomopatológica, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,308$), pero sí se apreció una tendencia hacia la disminución de casos N0, relacionada con la mala diferenciación celular.

Metástasis a distancia (M)

No se apreciaron lesiones metastásicas en el momento de la recogida de datos en los pacientes seleccionados (M0). Este parámetro fue designado previamente como un criterio de exclusión para el estudio.

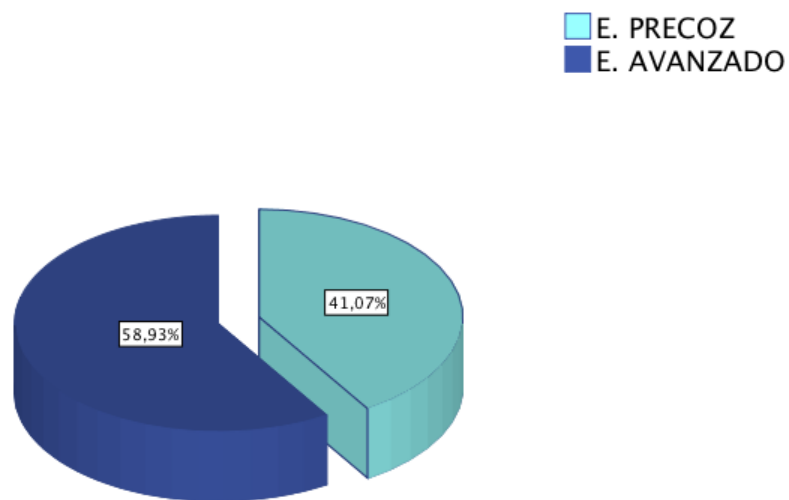
Estadio tumoral

La mayoría de los pacientes estudiados se encontraban en estadios avanzados de la enfermedad (58,9%) por invasión de estructuras adyacentes o metástasis locorreionales, en el momento del diagnóstico; es decir, en estadios tumorales en fase III o IV (Tabla 28 y Figura 44).

Tabla 28. Estadístico descriptivo de la distribución por estadios tumorales.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Estadio precoz	46	41,1
	Estadio Avanzado	66	58,9
	Total	112	100,0

Figura 44. Gráfico de sectores correspondiente a la variable estadio tumoral, en función de las agrupaciones: precoz (EI-EII) y avanzado (EIII-EIV).

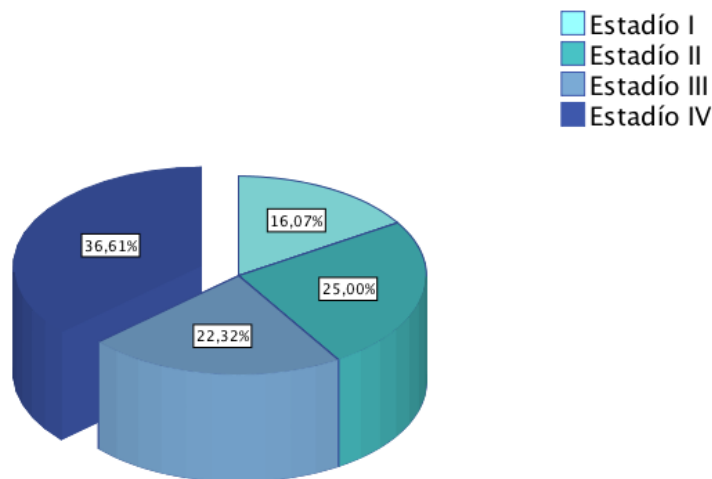


El estadio tumoral más frecuente en nuestra serie fue el IV, con un 36,6%, seguido del estadio II, con el 25,0%, el estadio III, con el 22,3% y el estadio I, con el 16,1%. Tabla 29 y Figura 45.

Tabla 29. Estadístico descriptivo correspondiente con la variable estadio tumoral.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Estadio I	18	16,1
	Estadio II	28	25,0
	Estadio III	25	22,3
	Estadio IV	41	36,6
	Total	112	100,0

Figura 45. Gráfico de sectores correspondientes a la variable estadio tumoral.



Los tumores laríngeos de localización supraglótica se presentaron, en su mayoría, en estadios avanzados de la enfermedad (51,4% en estadio IV); los tumores glóticos lo hicieron con mayor frecuencia en estadios precoces (32,8%, EII). Figuras 46 y 47.

En el análisis de los tumores faríngeos, apreciamos que el 90% de los mismos se distribuyeron en estadios avanzados de la enfermedad. Figura 48.

Figura 46. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre el estadio tumoral y la localización laríngea del tumor primario (p=0,022).

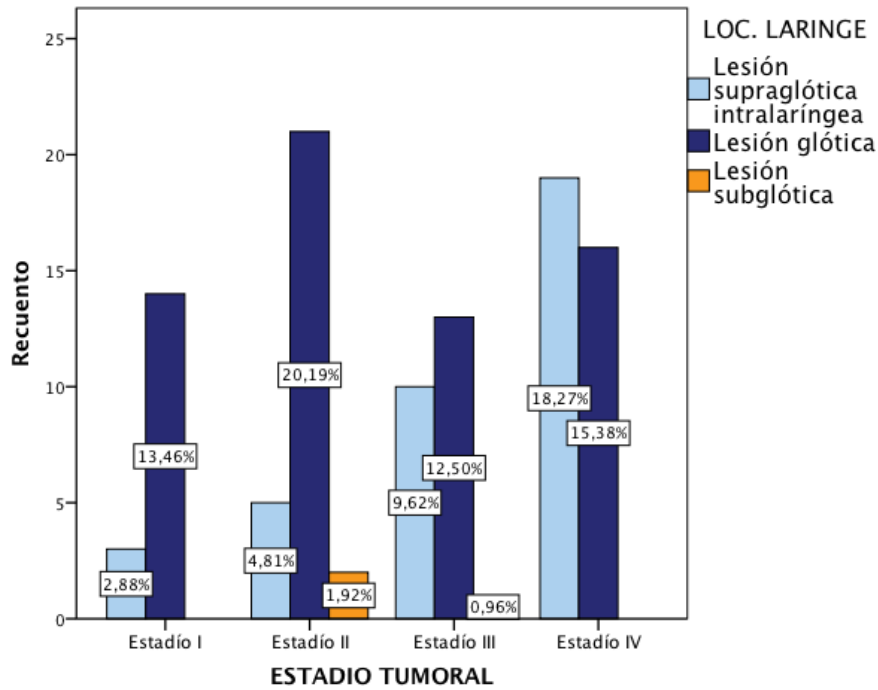


Figura 47. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre el estadio tumoral y la localización laríngea del tumor primario (p=0,022).

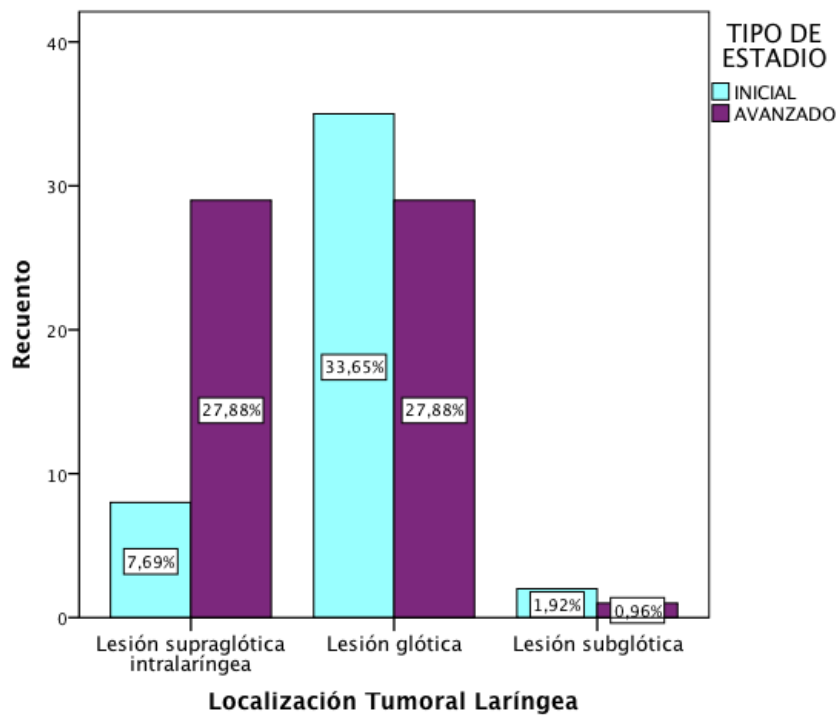
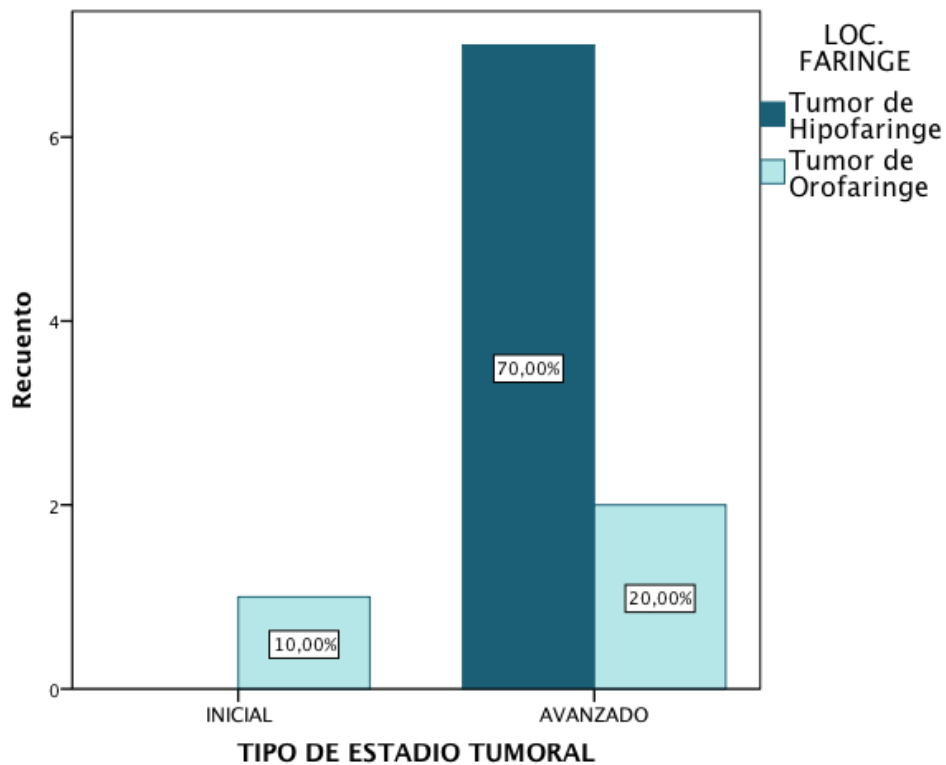


Figura 48. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre tipo de estadio tumoral y localización faríngea del tumor primario ($p=0,107$).



4.1.4. Imagen radiológica y correlación clinicopatológica de las regiones ganglionares

Imagen radiológica tumoral

En la descripción ganglionar llevada a cabo mediante TC, se encontraron adenopatías patológicas en el 41% de los pacientes estudiados; mientras que en el 59% restantes no se hallaron ganglios compatibles con malignidad.

Se detectó destrucción cartilaginosa o infiltración en 30,7% ($n=31$) de la muestra.

Correlación clinicopatológica de las regiones ganglionares

En la exploración física mediante palpación digital, se detectó un total de 30 pacientes en los que se localizaron ganglios compatibles con malignidad en las

diferentes cadenas ganglionares (28%), mientras que en 77 (72%) la palpación fue libre de adenopatías.

Se compararon los hallazgos de la palpación cervical con los del TC; para ello, se utilizaron los resultados histopatológicos de los vaciamientos ganglionares como “patrón de oro” (Gold Standart). Tabla 30 y 31.

Tabla 30. Tabla de contingencia que muestra los resultados de la palpación cervical. La certeza de sano o enfermo se otorga con la anatomía patológica (Gold Standart).

	Enfermo	Sano	Total
Palpación -	5 11,1%	40 88,9%	45 100,0%
Palpación +	15 88,2%	2 11,8%	17 100,0%
Total	20 77,1%	42 22,9%	62 100,0%

De la Tabla 30 podemos extraer los siguientes datos:

- *Sensibilidad: 75,0%*
- *Especificidad: 88,9%*
- *Verdaderos negativos: n= 40*
- *Verdaderos positivos: n= 15*
- *Falsos negativos: n= 5*
- *Falsos positivos: n= 2*

Tabla 31. Tabla de contingencia que muestra los resultados de la palpación cervical. La certeza de sano o enfermo se otorga con la anatomía patológica (Gold Standart).

	Enfermo	Sano	Total
Palpación -	2 5,6%	34 94,4%	36 100,0%
Palpación +	20 76,9%	6 23,1%	26 100,0%
Total	22 35,5%	40 64,5%	62 100,0%

De la Tabla 31 extraemos los siguientes datos:

- *Sensibilidad: 76,9%*
- *Especificidad: 94,4%*
- *Verdaderos negativos: n= 34*
- *Verdaderos positivos: n= 20*
- *Falsos negativos: n= 2*
- *Falsos positivos: n= 6*

Al calcular el *Valor Global*, es decir, resultado de la suma de los Verdaderos Positivos (VP) y de los Verdaderos Negativos (VN) y su división por el total (T), obtuvimos el resultado del 88% para la palpación cervical y del 87% para la TC ($p > 0,005$). De manera inversa se calculó el *Error Global* que fue de 22% y 23%, respectivamente.

En la siguiente Tabla se refleja el nivel de correlación entre ambas estructuras diagnósticas. En todos los casos (100%) en los que la palpación cervical fue positiva, el TC también lo fue. Sin embargo, se encontró que en 10 casos (13,9%) en los que la palpación fue negativa, el TC fue informado como positivo. En 5 casos (50%) se descubrieron adenopatías positivas en la exploración histopatológica (2N1 y 3N2); el resto fue considerado como N0.

Tabla 32. Tabla de contingencia que muestra el nivel de correlación entre los resultados de la palpación cervical y el TC.

	TC+	TC -	Total
Palpación -	10 13,9%	62 86,1%	72 100,0%
Palpación +	30 100,0%	0 0,0%	30 100,0%
Total	40 39,2%	62 60,8%	102 100,0%

4.1.5. Manejo y tratamiento de los pacientes

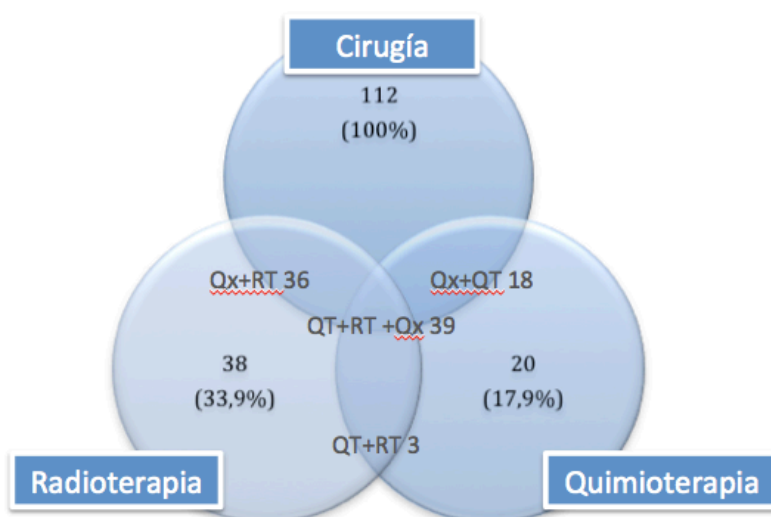
Comité de Tumores

El 52,2% de los pacientes englobados en el estudio fue evaluado por el Comité de Tumores de Cabeza y Cuello del HUVA, constituido por especialistas de diferentes unidades de cabeza y cuello (59). En 54 pacientes (47,8%) se estableció la indicación terapéutica de forma interna en el Servicio de Otorrinolaringología.

Tratamiento Quirúrgico Faringolaríngeo

De todos los pacientes incluidos en el estudio, el 100% se sometió a algún tipo de procedimiento quirúrgico en el momento de la inclusión; en el 97,3% de los pacientes esta cirugía se realizó con intención curativa y en el 2,7% restante se hizo con fines diagnósticos o paliativos; el 55,7% de los pacientes con estadio avanzado de la enfermedad recibió algún tipo de tratamiento concomitante con quimioterapia y/o radioterapia.

Figura 49. Gráfico de Venn correspondiente a la relación de las opciones terapéuticas en el tratamiento del CECC.



Traqueotomía

La traqueotomía se realizó, previa a la intervención, en un total de 85 pacientes (76,8%). Se llevó a cabo una traqueotomía de manera urgente en 20 pacientes (18,5%); en 63 pacientes se realizó previa a la cirugía pero de forma programada sin ser urgente (58,3%).

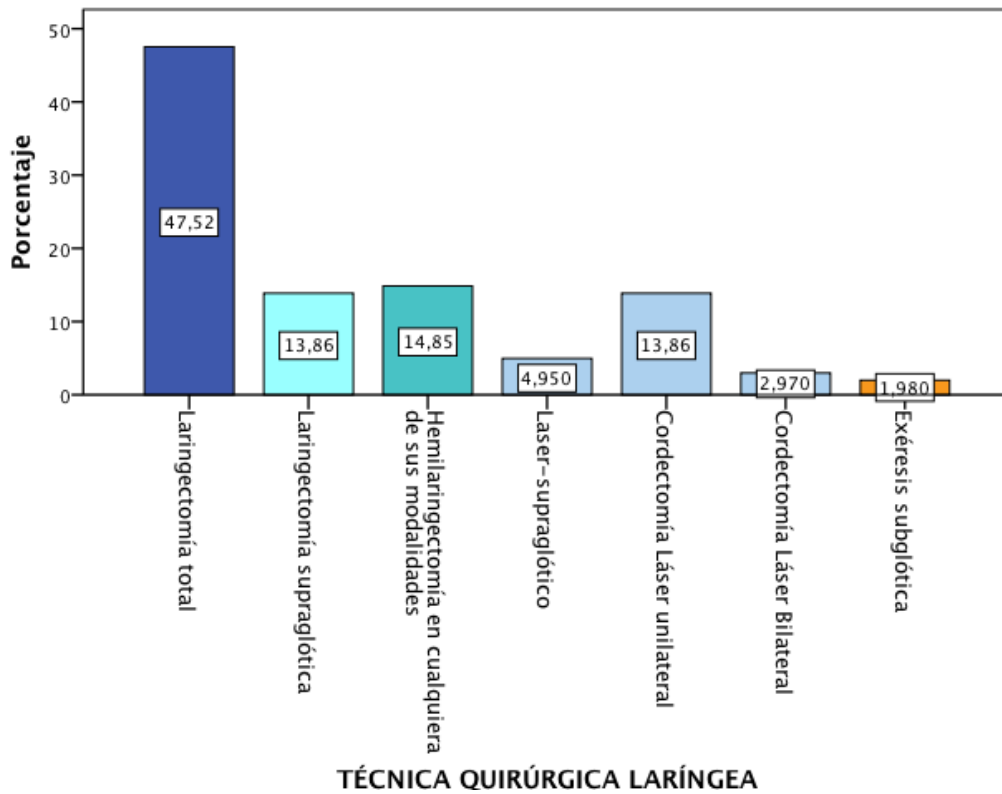
Tratamiento quirúrgico.

Como se aprecia en la Tabla 33, **el procedimiento quirúrgico que con mayor frecuencia se realizó fue la laringectomía total, en el 47,5% de los casos**; seguido de la hemilaringectomía en cualquiera de sus modalidades en el 14,9%; la laringectomía supraglótica en el 13,9%; la cirugía láser Co₂ (13,9% cordectomía láser unilateral, 5,0% láser supraglótico y 3,0% cordectomía láser bilateral), y la exéresis subglótica en el 2,0%. La faringectomía se practicó de forma independiente en el 3,6% de los pacientes.

Tabla 33. Estadístico descriptivo correspondiente a la distribución por el tipo de cirugía del órgano laríngeo.

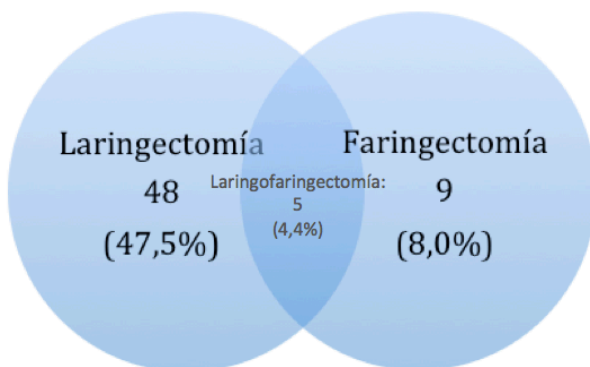
	Frecuencia	Porcentaje (%)
Laringectomía Total	48	47,5
Laringectomía supraglótica	14	13,9
Hemilaringectomía en cualquier modalidad	15	14,9
Cirugía láser CO2 supraglótico	4	5,0
Cordectomía láser CO2 unilateral	14	13,9
Cordectomía láser Co2 bilateral	3	3,0
Exéresis subglótica	2	2,0
Válidos Total	101	100,0

Figura 50. Gráfico de barras correspondiente a la frecuencia de las distintas modalidades de cirugía laríngea.



El 2,7% de los pacientes se trató con QT y RT al considerarse la cirugía como no curativa y en el 3,6% restante se llevó a cabo vaciamiento ganglionar al no encontrarse tumor epidermoide primario.

Figura 51. Gráfico de Venn correspondiente a la asociación entre la cirugía laringectomía total y faringectomía.



Asociación entre estadio tumoral y tipo de cirugía laríngea

- ✓ La cirugía más efectuada en estadios avanzados fue la LT (80,4%); en estadios iniciales la cirugía más frecuente fue la realizada con láser CO₂ (44,4%).
- ✓ La cirugía endoscópica mediante láser fue la modalidad quirúrgica más empleada para el tratamiento de los tumores primarios en estadio I (64,7%).
- ✓ La hemilaringectomía, en cualquiera de sus modalidades, fue la técnica más empleada para el tratamiento de los tumores primarios en estadio II de la enfermedad (32,6%).
- ✓ Tanto en estadio III como en IV, la LT fue la técnica más empleada (79,2% y 81,3%), respectivamente. Esta asociación entre el procedimiento quirúrgico y el estadio clínico resultó estadísticamente significativa ($p=0,001$).
- ✓ El 92,3% de la cirugía extralaríngea se relacionó con estadios avanzados.

Los resultados se expresan gráficamente en las Figuras 52, 53 y 54.

Figura 52. gráfico de barras correspondiente a la asociación entre el tipo de cirugía laríngea y el estadio tumoral. ($p=0,001$).

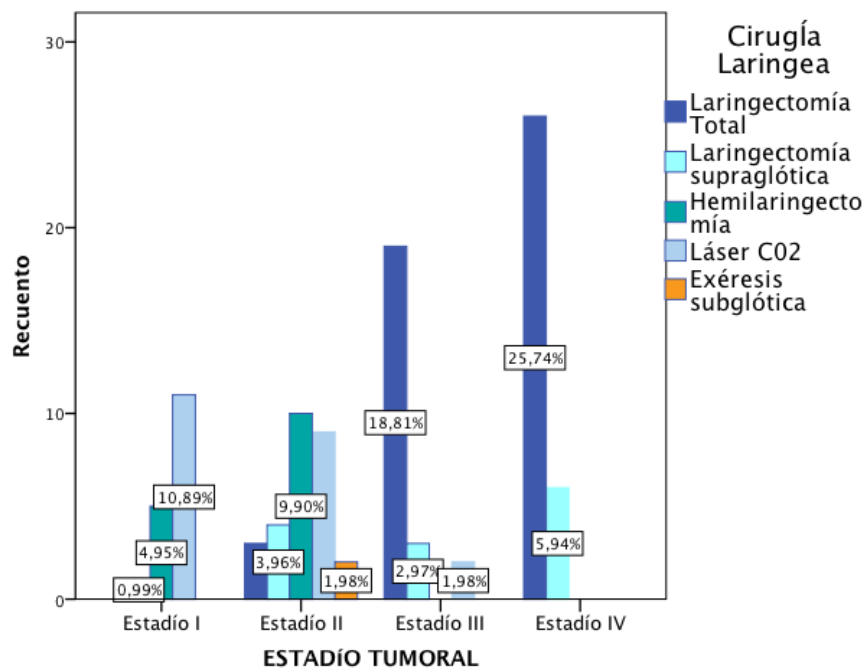


Figura 53. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre el tipo de cirugía y el estadio precoz o avanzado. ($p=0,001$).

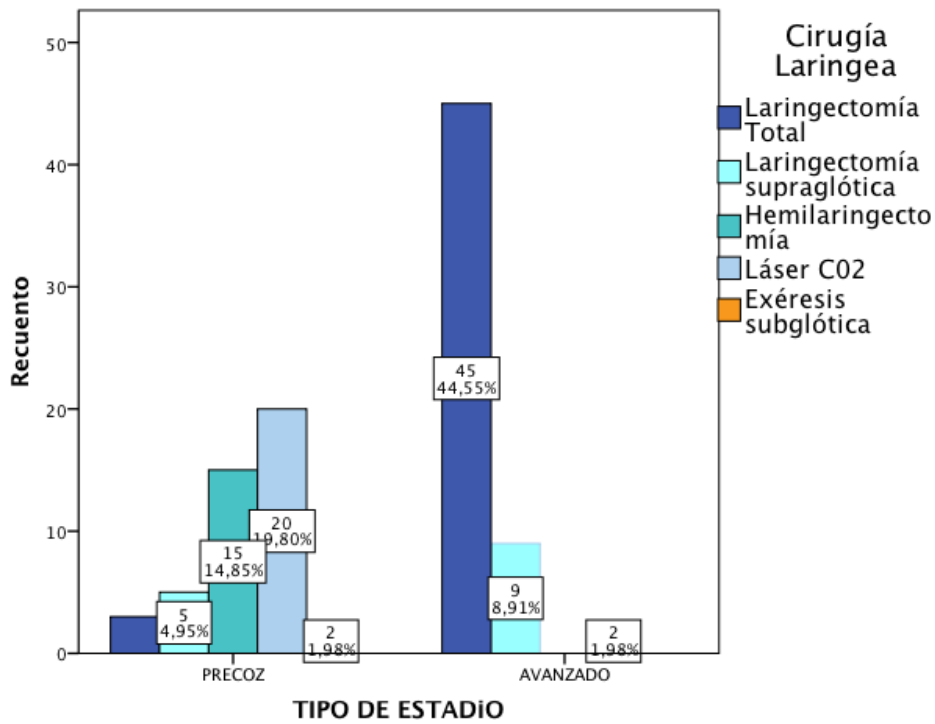
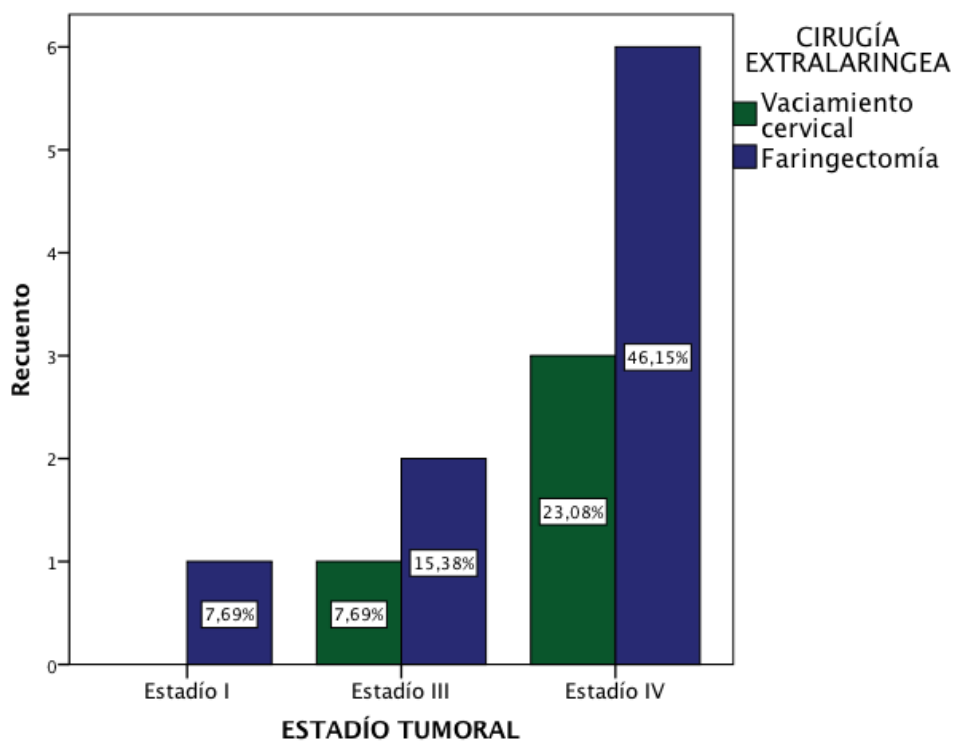


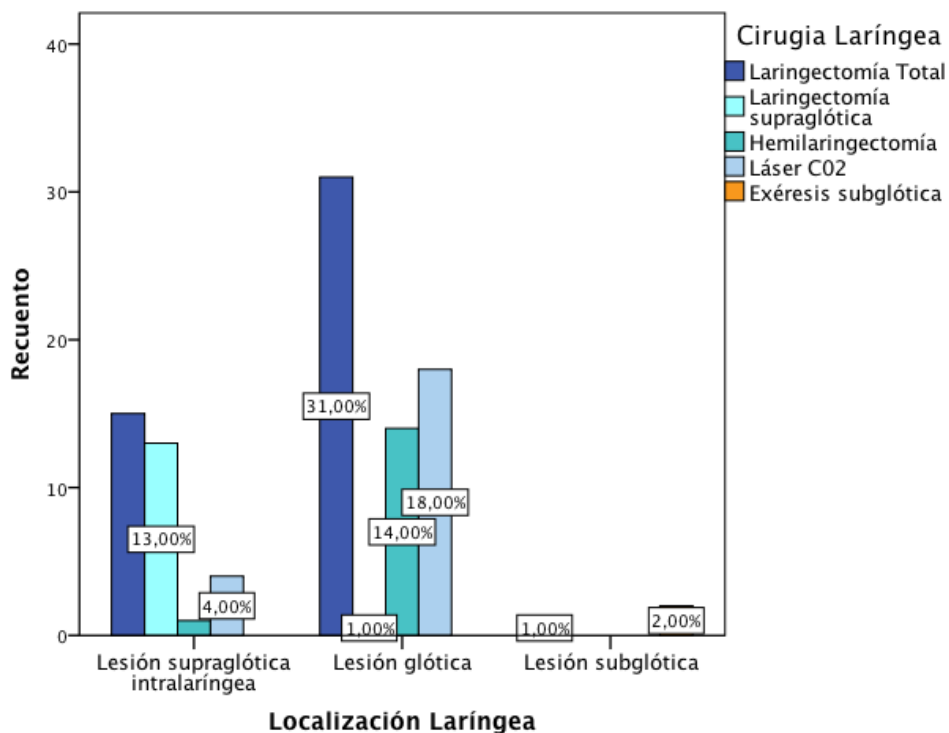
Figura 54. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre el estadio tumoral y la cirugía extralaringea. ($p=0,358$).



Asociación entre estadio tumoral y tipo de cirugía laríngea

- ✓ La LT fue la técnica quirúrgica más empleada en los tumores con localización glótica, llevándose a cabo en el 48,4% de los tumores primarios de esta localización. En el 45,5% de los tumores de localización supraglótica se practicó la LT como técnica quirúrgica y en el 33,3% de los tumores subglóticos. Figura 55.
- ✓ La laringectomía supraglótica se realizó en el 38,2% de los pacientes con tumor primario de localización supraglótica. Figura 55.

Figura 55. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la cirugía laríngea y la localización anatómica tumoral del órgano laríngeo. ($p=0,002$).



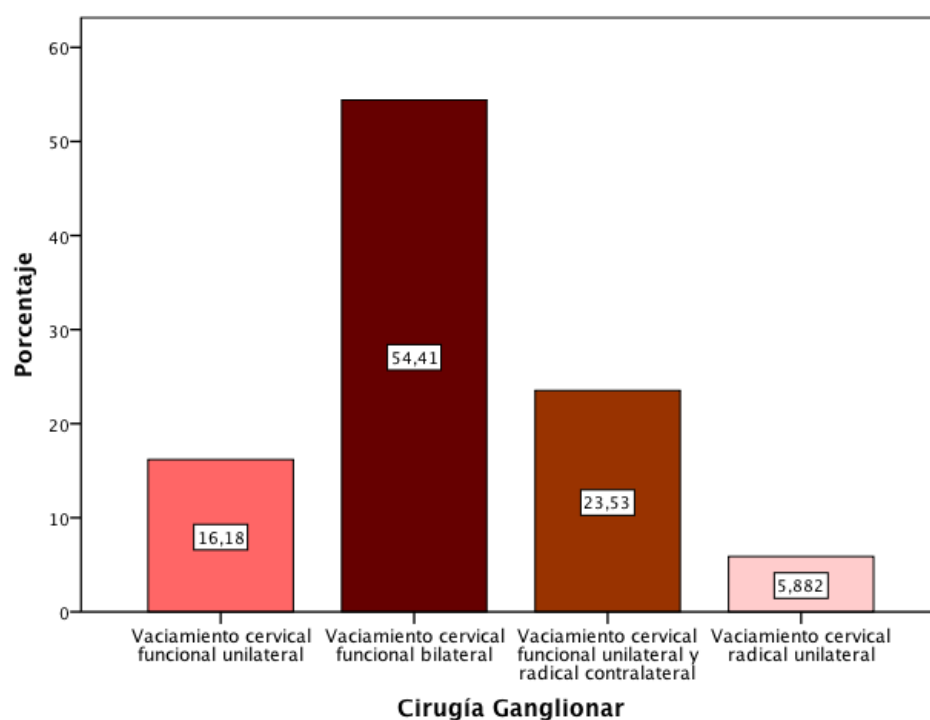
Tratamiento Ganglionar Cervical

Como se aprecia en la Tabla 34 y en la Figura 56, se realizó cirugía ganglionar, en cualquiera de sus modalidades, en el 60,7% de los pacientes.

Tabla 34. Estadística descriptiva correspondiente a la variable cirugía ganglionar.

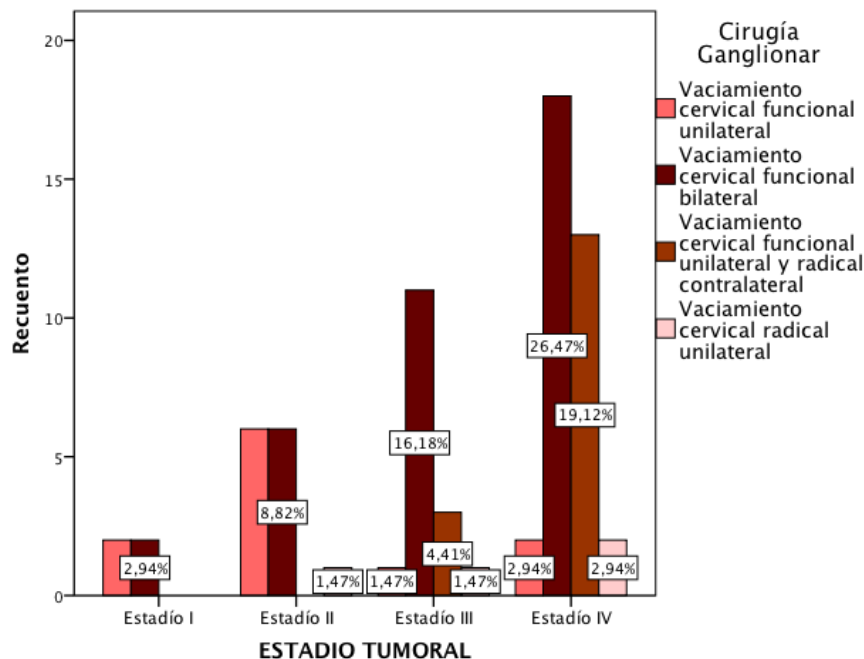
	Frecuencia	Porcentaje (%)
Vaciamiento Cervical Funcional Unilateral	11	16,2
Vaciamiento Cervical Funcional Bilateral (VCFB)	37	54,4
Vaciamiento cervical funcional unilateral y Radical contralateral	16	23,5
Vaciamiento cervical radical unilateral (VCR)	4	5,9
Válidos		
Total	112	100,0

Figura 56. Gráfico de barras correspondiente a la cirugía ganglionar en sus distintas modalidades.



Atendiendo al estadiaje tumoral, el 75,0% de la cirugía ganglionar se realizó en estadios avanzados de la enfermedad, mientras que el 25,0% restante se llevo a cabo en estadios iniciales. Figura 57.

Figura 57. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la cirugía ganglionar y el estadio tumoral. ($p=0,011$).



Asociación entre la localización primaria y el tipo de cirugía ganglionar

- ✓ En el 72,9% de los tumores de origen primario supraglótico se llevó a cabo un **Vaciamiento Cervical (VC)** en cualquiera de sus modalidades. El 48,1% de dichos VC se correspondieron con VCFB; el 44,4% con un vaciamiento cervical funcional unilateral y radical contralateral y el restante 7,4%, con un vaciamiento cervical funcional y radical unilateral, respectivamente. En el 71,4% de tumores faríngeos, propiamente dichos, se realizó VC.
- ✓ En los tumores de localización glótica se practicó VC en el 51,5% de los casos. El tipo de VC realizado con mayor frecuencia fue el VCFB (66,7%).

Esta asociación entre el tipo de VC y la localización laríngea del tumor primario fue estadísticamente significativa ($p=0,018$). Figura 58.

Figura 58. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la cirugía ganglionar cervical y la localización laríngea del tumor primario (p=0.018).

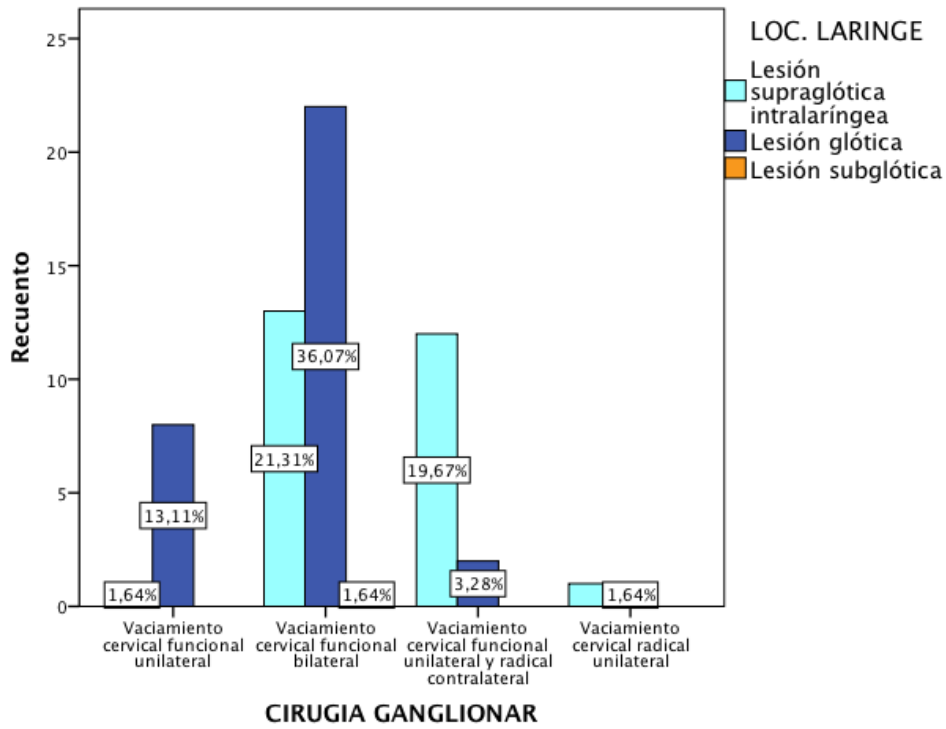
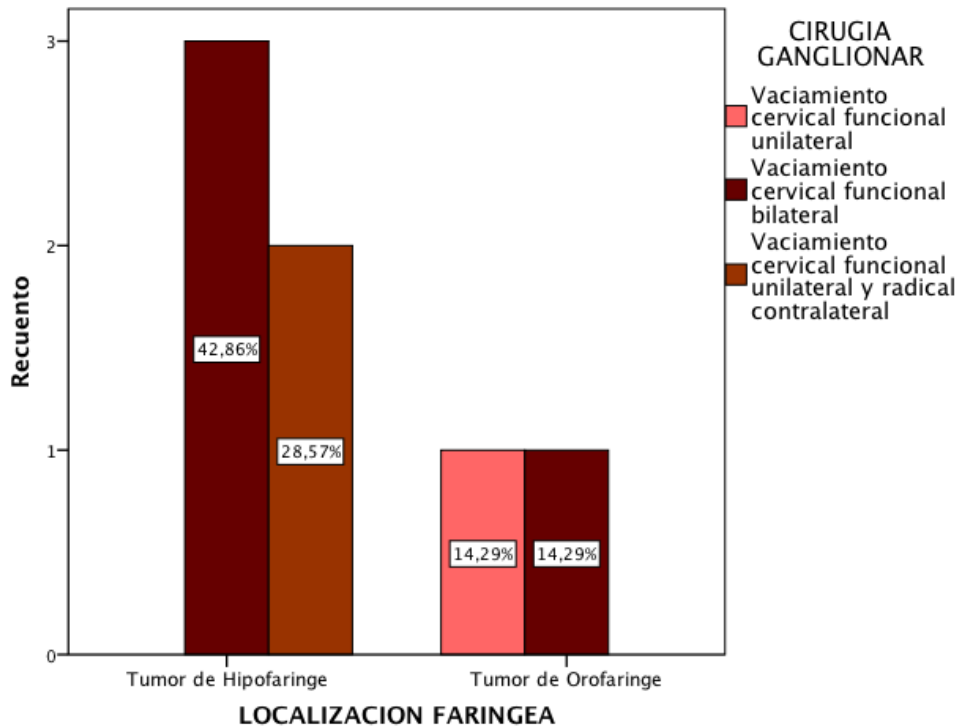


Figura 59. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la cirugía ganglionar y la localización tumoral faríngea (p=0,190).



4.1.6. Estancia hospitalaria y complicaciones relacionadas con la enfermedad tumoral

Estancia Hospitalaria

Se corresponde con el tiempo comprendido entre el acto quirúrgico y el día del alta hospitalaria. **La media de estancia hospitalaria fue de 19,15 con un máximo de 65 y un mínimo de 1.** La desviación típica fue de 14,814, según se aprecia en la Tabla 35 y en la Figura 60.

En función del tipo de estadio tumoral, se modifica la estancia hospitalaria como se muestra en la Figura 61.

Tabla 35. Estadística descriptiva correspondiente con la variable estancia hospitalaria.

N	Válidos: 112
Media	19,15
Moda	2
Desviación típica	14,86
Mínimo	1
Máximo	65

Figura 60. Histograma correspondiente a la variable estancia hospitalaria, expresada en días.

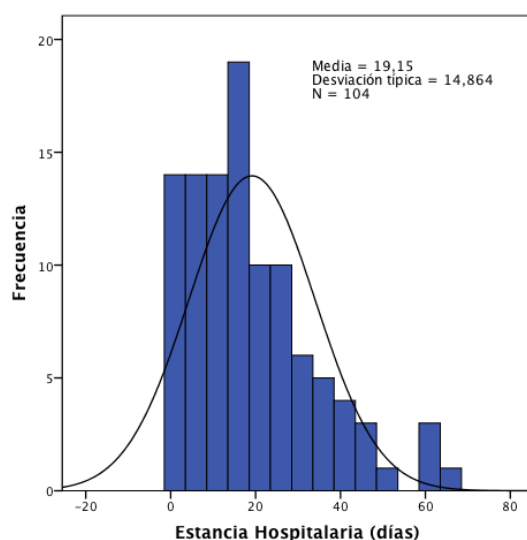
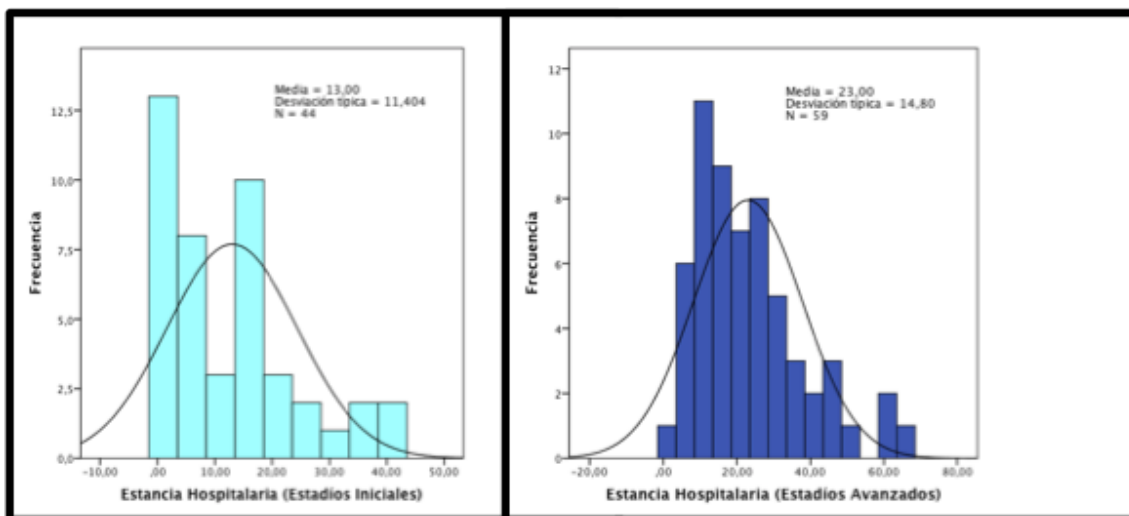


Figura 61. Histograma correspondiente a la variable estancia hospitalaria en pacientes con estadios tumorales precoces y avanzados; expresada en días.



Complicaciones relacionadas con el acto quirúrgico y la estancia hospitalaria.

Un total de 47 pacientes presentaron algún tipo de complicación relacionada con el acto quirúrgico (42,2%). **La complicación más frecuente fue la fístula faringocutánea (26,8%).**

El mayor índice de complicaciones se relacionó con el procedimiento quirúrgico de LT (71,7%), seguido de las LS (15,2%). Las principales complicaciones relacionadas con el acto quirúrgico se resumen en la Tabla 36.

Tabla 36. Estadística descriptiva relacionadas con las principales complicaciones del acto quirúrgico.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos Fístula Faringocutánea	30	26,8
Infección herida quirúrgica	27	24,1
Hemorragia herida quirúrgica	8	7,1
Total	101	100,0

Atendiendo a las características de los pacientes que presentaron fístula faringocutánea en el postoperatorio, obtuvimos los siguientes datos:

- ✓ El 21,9% de los pacientes intervenidos presentaron fístula faringocutánea en el postoperatorio, excluyendo aquellos pacientes previamente irradiados.
- ✓ El 83,3% de los faringostomas se distribuyeron entre los estadios avanzados III y IV ($p=0,001$).
- ✓ El 36,8% de los pacientes que presentan faringostoma, asocian cirugía relacionada con el sistema ganglionar ($p=0,008$).

En función de las características de los pacientes que presentaron infección en el postoperatorio, observamos:

- ✓ El 14,8% eran diabéticos insulino dependientes.
- ✓ El 92,0% tenía hábito tabáquico severo y el 50% enólico empedernido.
- ✓ El grupo de edad más frecuente fue el comprendido entre los 60 y los 69 años, representando el 37,0%.
- ✓ El 74,1% se clasificó dentro de un estadio avanzado, y la laringectomía total fue la intervención con mayor tasas de infecciones con un 44,6%.
- ✓ En 4 pacientes (3,5%), se ratificó el éxito en el periodo postoperatorio por diferentes causas.

El 75% de los pacientes que presentaron hemorragia relacionada con el acto quirúrgico habían sido intervenidos previamente de cirugía ganglionar. No se encontró relación estadísticamente significativa entre el tipo de cirugía y la presencia de hemorragia postoperatoria ($p=0,485$).

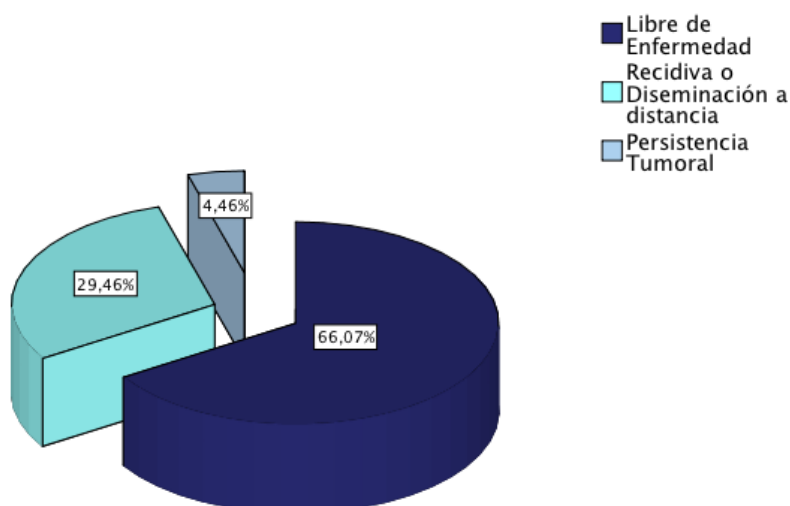
4.1.7. Evolución de la enfermedad tumoral

La distribución en la evolución de la enfermedad tumoral se refleja en la Figura 62 y en la Tabla 37.

Tabla 37. Frecuencia y porcentaje (%) de la variable evolución de la enfermedad.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Libre de Enfermedad	74	66,1
Recidiva locoregional o	33	29,5
Válidos Diseminación a distancia		
Persistencia tumoral	5	4,5
Total	101	100,0

Figura 62. Gráfico de sectores correspondiente a la distribución de la variable evolución de la enfermedad tumoral.



Progresión de la enfermedad: persistencia tumoral, recidiva tumoral y enfermedad metastásica.

Persistencia Tumoral

Como persistencia tumoral se consideraron todos aquellos casos que presentaron enfermedad tumoral en los primeros 6 meses de la evolución. Se observó dicha persistencia en el 4,5% de los pacientes analizados. Tabla 38.

Tabla 38. Relación entre la variable persistencia tumoral y la clasificación TNM.

T	N	M	ESTADIO	TIEMPO (meses)
4	2b	0	IV	0
4	2b	0	IV	0
4	3	0	IV	0
3	2	0	IV	5
3	2	0	IV	5

Recidiva tumoral

El 18,4% de la muestra presentó recidiva local o regional a partir del 6º mes de evolución. El tiempo medio de aparición de recidiva tumoral fue de 13,24 meses con un mínimo de 6 y un máximo de 40. La mediana fue de 11 meses.

En las siguientes Figuras y Tablas se reflejan las peculiaridades relacionadas con los casos de recidiva tumoral.

Figura 63. Histograma correspondiente al tiempo de intervalo de la variable recidiva tumoral.

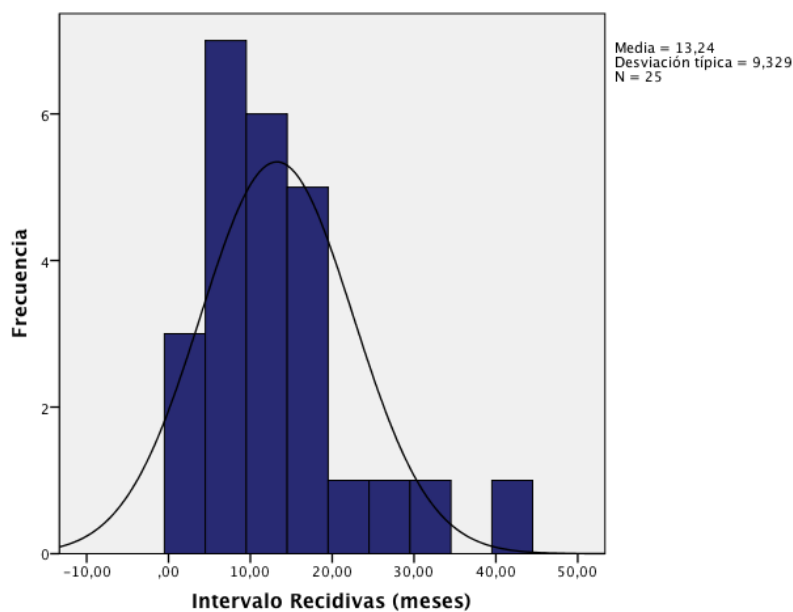
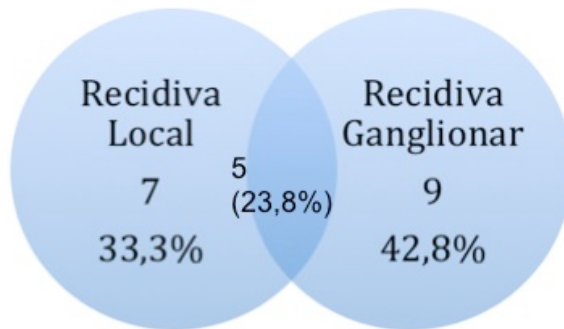


Figura 64. Gráfico de Venn correspondiente a la asociación entre la variable recidiva local y recidiva ganglionar.



El 85,7% de las recidivas tumorales se asociaron con estadios avanzados de la enfermedad (III-IV), mientras que solamente el 14,3% lo hicieron con estadios iniciales.

Figura 65. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre recidiva tumoral y estadio tumoral. ($p=0,006$).

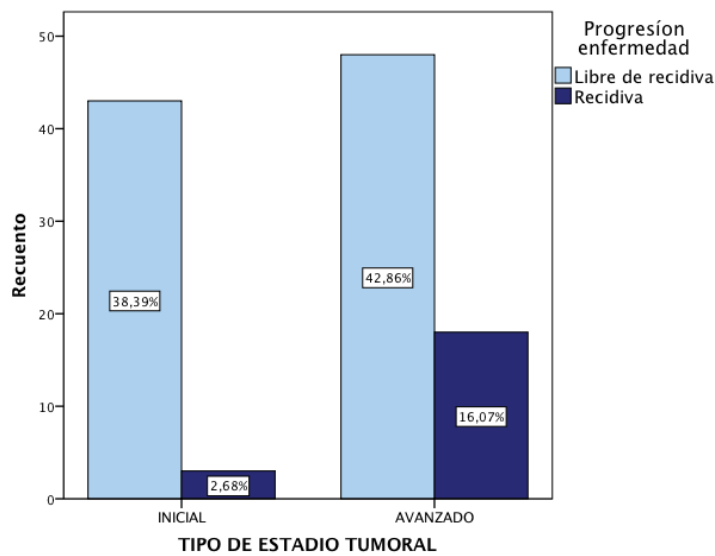
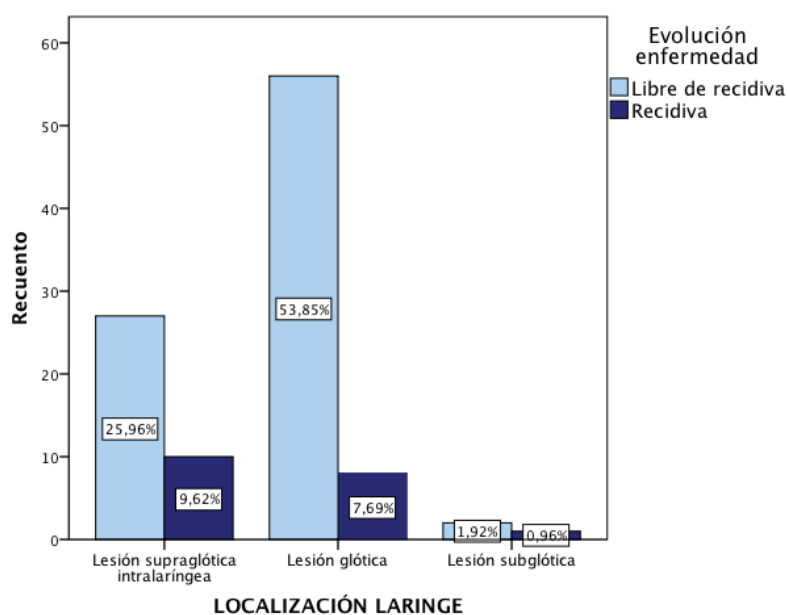


Tabla 40. Asociación entre la variable recidiva tumoral y la localización del tumor primario. ($p=0,7422$).

Localización Tumor Primario	Recidiva Tumoral (% Localización)
Laringe	18,4%
Hipofaringe	28,6%
Orofaringe	0,0%

Figura 66. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre recidiva tumoral y localización laríngea. ($p= 0,151$).



Recidiva Ganglionar

En las siguientes Tablas se reflejan las peculiaridades relacionadas con los casos de recidiva tumoral ganglionar.

Tabla 41. Asociación entre la variable recidiva ganglionar y N tumoral. ($p=0,992$).

N	n	%
0	9	64,3%
1	1	11,1%
2	3	17,6%
3	1	16,7%
Total	14	100,0%

Tabla 42. Distribución en función del T y del tratamiento ganglionar en los casos de recidiva ganglionar con N0 tumoral.

N0	Localización	T	V. Ganglionar
1	Supraglotis	1	1
1	Glottis	2	0

4	2SG/2 Glotis	3	3
3	Glottis	4	3

Tabla 43. Asociación entre la variable recidiva ganglionar y el T tumoral (p=0,134).

T	n (N)	%
1	1	7,7%
2	1	7,7%
3	6	46,2%
4	5	38,5%
Total	14	100,0%

Tabla 44. Asociación entre la variable recidiva ganglionar y la localización tumoral laríngea. (p=0,511).

Localización laríngea	n	%
Glótica	7	63,0%
Supraglótica	4	34,0%
Subglótica	1	3,0%
Total	14	100,0%

Recidiva Local

En las siguientes Tablas se reflejan las peculiaridades relacionadas con los casos de recidiva tumoral local.

Tabla 45. Asociación entre la variable recidiva local y el T tumoral. (p=0,992).

T	n	%
1	1	8,3%
2	0	0,0%

3	7	58,3%
4	4	33,3%
Total	12	100,0%

Tabla 46. Asociación entre la variable recidiva local y la localización tumoral laríngea. (p=0,13).

Localización laríngea	n	%
Glótica	3	25,0%
Supraglótica	8	66,7%
Subglótica	1	8,3%
Total	12	100,0%

Segundos tumores

En 7 de los 112 pacientes incluidos, (6,2%), se produjo una segunda neoplasia relacionada con el tumor primario. En 2 pacientes (1,8%), se correspondió con un tumor de tipo sincrónico al aparecer en los primeros 6 meses de seguimiento y en 5 pacientes (4,4%) fue metacrónico al aparecer a partir de los 6 meses. El tratamiento de los 7 pacientes se llevó a cabo con ciclos de quimioterapia.

Se encontró diferencia estadísticamente significativa (p=0,22) entre la mayor asociación de segundos tumores en relación con la localización glótica, respecto a la supraglótica (66,7% vs 16,7%).

Metástasis

Se objetivaron lesiones a distancia del tumor primario en el 22,3% de los pacientes. El tiempo medio de aparición fue de 18,2 meses, a partir de la intervención, con una desviación típica de 9,36 meses. Tabla 47.

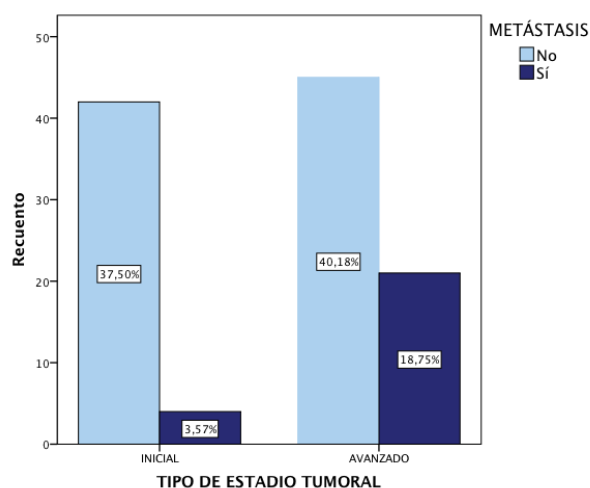
La localización anatómica más frecuentemente afectada fue el pulmón, en el 72,0% de los casos.

Tabla 47. Estadístico descriptivo de la variable metástasis (tiempo/meses).

N	Válidos: 110
Media	18,2
Desviación típica	9,36
Mínimo	3
Máximo	42

En la Figura 67 se refleja la asociación entre estadio tumoral y la presencia de metástasis a distancia.

Figura 67. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre metástasis a distancia y tipo de estadio tumoral. ($p=0,004$).



Alrededor del 40% de los tumores de localización orofaríngea e hipofaríngea y del 20,4% de los tumores de localización laríngea, evolucionaron en lesiones metastásicas. Tabla 48.

El 32,4% de los tumores supraglóticos se relacionaron con metástasis a distancia en su evolución; siendo la localización laríngea la que mayor tasa de diseminación presentó.

Tabla 48. Asociación entre la variable metástasis a distancia y la localización del tumor primario. ($p=0,54$).

Localización primario	Tumor	N	Recuento (%) dentro de la localización	Recuento (%) dentro de metástasis
Laringe		20	20,4%	80,0%
Hipofaringe		3	42,9%	12,0%
Orofaringe		1	33,1%	4,0%
Ganglionar		1	25,0%	4,0%

Las asociaciones entre los parámetros clínicos y la presencia de metástasis a distancia se resumen en la Tabla 49.

Tabla 49. Asociación entre la variable metástasis a distancia y los distintos parámetros clínicos.

	(χ^2 ; p)	Recuento (%) dentro del grupo específico	Recuento (%) dentro de metástasis
Edad	0,939		
<50		18,2%	8,0%
50-59		25,0%	36,0%
60-69		23,7%	36,0%
70-79		15,8%	12,0%
>80		25,0%	8,0%
T	0,087		
T1		10,5%	8,3%
T2		10,7%	12,5%
T3		29,7%	45,8%
T4		33,3%	33,3%
N	0,206		
N0		17,1%	52,0%
N1		22,0%	8,0%
N2		36,8%	28,0%

N3		37,5%	12,0%
Estadio	0,036		
EI		5,6%	4,0%
EII		10,7%	12,0%
EIII		32,0%	32,0%
EIV		31,7%	52,0%
Diferenciación	0,565		
Bien Dif.		20,0%	37,5%
Mod. Dif.		20,0%	33,3%
Pob. Dif.		30,4%	29,2%

4.1.8. Características anatomopatológicas

Todas las muestras histológicas analizadas fueron catalogadas como carcinomas epidermoides; parámetro utilizado como criterio de inclusión "sine qua non". El 1,8% de la muestra se correspondió con carcinomas epidermoides de variante sarcomatoide.

Diferenciación celular

Los carcinomas epidermoides BD constituyeron el grupo que con mayor frecuencia se recogió en la descripción histopatológica (41,7%). Tabla 50 y Figura 69.

Tabla 50. Estadístico descriptivo correspondiente a la diferenciación celular histopatológica.

		Frecuencia	Porcentaje (%)
Válidos	Buena Diferenciación	45	41,7
	Moderada	40	37,0
	Pobre Diferenciación	23	21,3
	Total	108	100,0

Figura 69. Gráfico de sectores correspondiente a la distribución en subgrupos de la variable diferenciación celular.

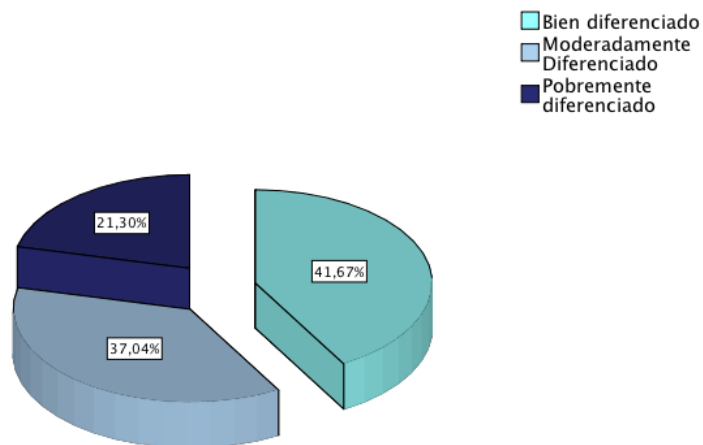
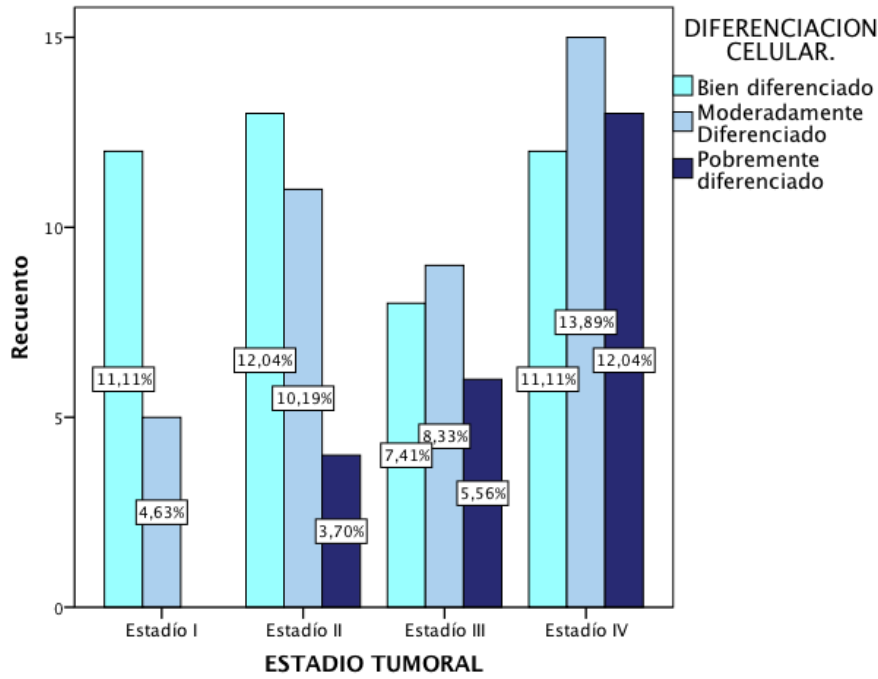


Tabla 51. Asociación entre la variable diferenciación celular y el estadio tumoral ($p=0,055$).

	Buena Diferenciación	Moderada Diferenciación	Pobre Diferenciación	Total
Estadio I	12	5	0	17
%	70,6%	29,4%	0,0%	
Estadio II	14	11	4	28
%	46,4%	39,3%	14,3%	
Estadio III	8	9	6	23
%	30,0%	37,5%	32,5%	
Estadio IV	12	15	13	40
%	30,0%	37,5%	32,5%	

Figura 70. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la variable diferenciación celular y estadio tumoral.



En la Figura 71 y en las Tablas 52 y 53 se exponen las asociaciones entre las variables histopatológicas, el estadio tumoral y la localización primaria.

Figura 71. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre la variable diferenciación celular y estadio tumoral. (p=0,010).

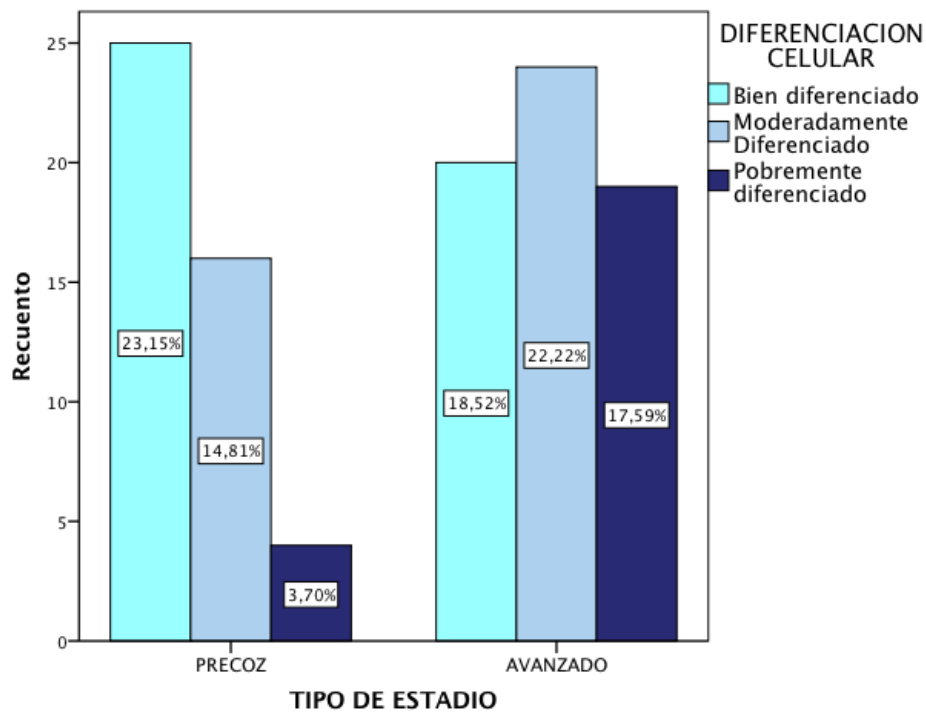


Tabla 52. Asociación entre la variable diferenciación celular y localización tumor primario. (p=, p=0,041).

	BD	MD	PB	Total
Hipofaringe	2	3	0	5
%	40,0%	60,0%	0,0%	
Orofaringe	2	1	0	3
%	66,7%	33,3%	0,0%	
Supraglotis	10	16	10	36
%	27,8%	44,4%	27,8%	
Glottis	32	21	9	62
%	51,6%	33,9%	14,5%	
Subglottis	1	0	2	3
%	33,3%	0,0%	66,7%	
Adenopatía	3	1	0	
Metastásica	75,0%	25,0%	0,0%	
%				

Márgenes quirúrgicos

Se localizaron en el estudio anatomopatológico de la muestra extraída márgenes quirúrgicos libres de afectación tumoral en el 72,1%; en el 27,8% restante los márgenes fueron positivos como se describe en la Tabla 53.

Tabla 53. Estadístico descriptivo correspondiente a la variable márgenes quirúrgicos.

	Frecuencia	Porcentaje (%)
Márgenes Libres	75	72,1
Márgenes invadidos con menos de 5mm de	12	11,5
Válidos		

profundidad		
Márgenes invadidos con más de 5mm de profundidad	17	16,3
Total	104	100,0

Rotura capsular

Se informó de rotura capsular ganglionar en el 5,3% de las muestras analizadas. El 100% de las muestras con rotura capsular se asociaron a estadios tumorales IV ($p=0,008$). Atendiendo a la clasificación N, el 83,3% de las muestras con rotura capsular se catalogaron dentro del grupo N2. ($p=0,001$).

Infiltración vascular, linfática y nerviosa del tumor primario

Encontramos infiltración vascular en el 5,3% del total de la muestra, infiltración linfática en el 8,8% y nerviosa en el 13,2%. En la Tabla 54 se exponen las asociaciones entre estos hallazgos y los casos de progresión de enfermedad o éxito.

Tabla 54. Asociación entre las variables de progresión tumoral y éxito con los marcadores anatomopatológicos siguientes: rotura capsular, i. linfática, i. Vascular e i. nerviosa. (estadístico utilizado chi cuadrado).

	Recidiva Local	Recidiva Ganglionar	Recidiva LG	Metástasis	Éxito
Rotura Capsular	50,0% 0,004	50,0% 0,031	50,0% 0,09	50,0% 0,099	83,3% 0,007
I. Linfática	30,0% 0,223	40,0% 0,126	40,0% 0,274	30,0% 0,829	60,0% 0,251
I. Vascular	16,7% 0,964	33,3% 0,532	33,3% 0,798	16,7% 0,437	33,3% 0,824
I. Nerviosa	33,3% 0,050	33,3% 0,176	40,0% 0,238	13,3% 0,649	46,7% 0,518

4.2. Estudio de las Sondas Salivares ABPP para la detección de perfiles SH

Se analizaron un total de 132 muestras salivares durante el período de estudio. Siguiendo los criterios de inclusión y exclusión diseñados, se descartaron un total de 24 muestras para el análisis estadístico correspondiente al estudio pronóstico.

4.2.1. Definición de los grupos control y patológico

El grupo control quedó constituido por un total de 32 muestras salivares, distribuidas en tres bloques:

- ✓ Pacientes fumadores, n=14 (43,75%)
- ✓ Pacientes no fumadores, n=11 (34,37%)
- ✓ Pacientes con patología faringolaríngea no tumoral: nódulos, quistes, edema de Reinke. N=7 (21,87%)

No existían diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo patológico para las variables sexo y edad. Tabla 55.

Tabla 55. Características correspondientes a la variable sexo y edad en los grupos control y patológico.

	Grupo Control	Grupo Patológico	<i>p</i>
Sexo	30V vs 1M	109V vs 3M	0,135
Edad	65,01±8,32	62,52±10,40	0,365
n	32	112	

En las Figuras 72 y 73 se refleja la distribución de las sondas salivares en el grupo patológico (n=100) y en el grupo control (n=32).

Figura 72. Esquema de distribución de todas las sondas salivares pertenecientes al Grupo Patológico (n=100).

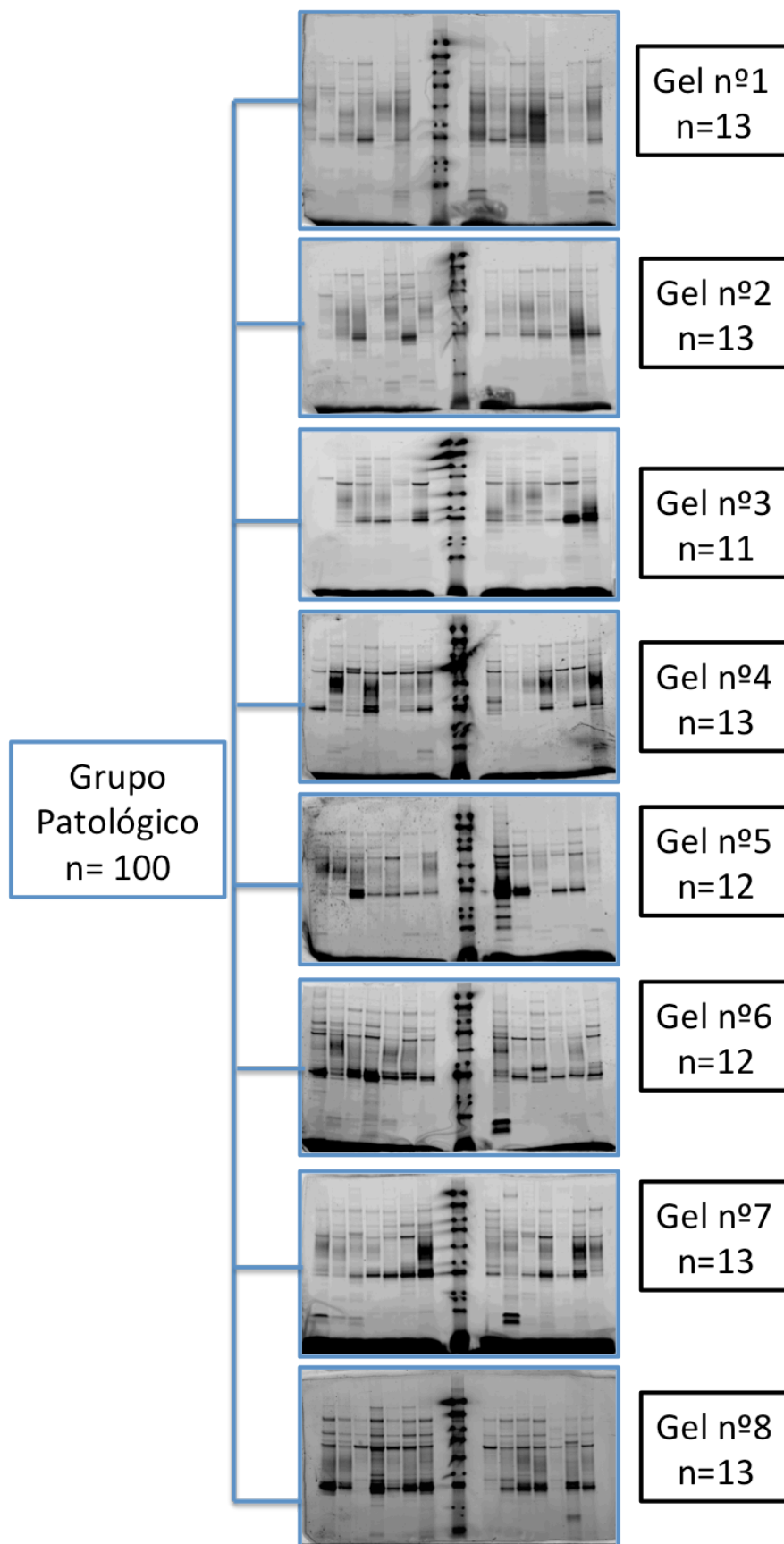
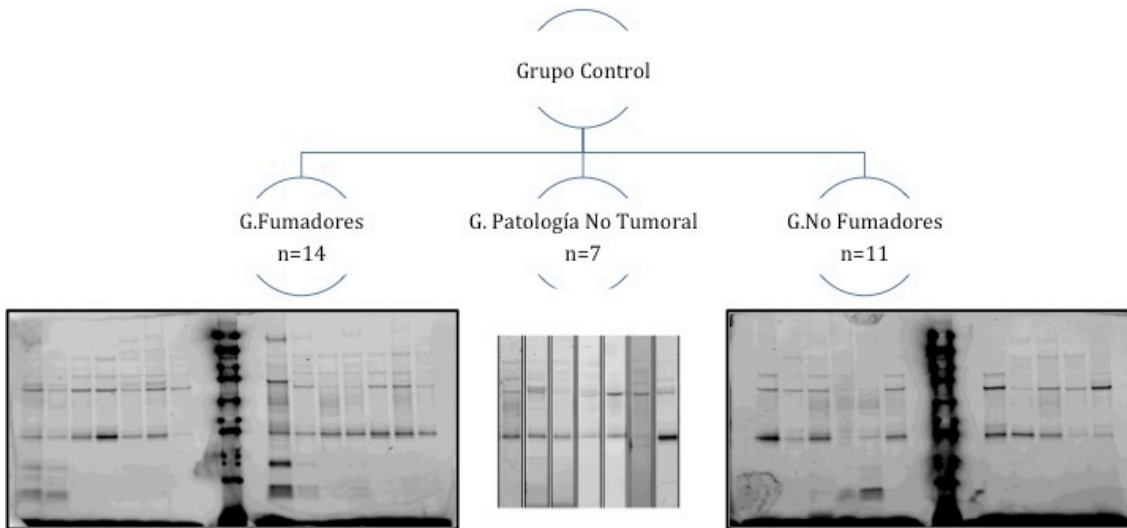


Figura 73. Algoritmo de distribución del Grupo control. (n=32).



Se procedió al análisis de agrupación jerárquica, según el método de WARD descrito en Material y Métodos. Los resultados obtenidos del porcentaje relativo de intensidad de cada una de las bandas patológicas se normalizaron respecto al porcentaje medio en el grupo control, según la fórmula: “Porcentaje Relativo Patológico/Porcentaje Relativo Control” (PRP/ PRC), obteniéndose 6 grupos diferentes. (Tabla 56 y Figuras 74, 75 y 76).

Figura 74. Resultado del análisis de agrupación jerárquica cluster mediante el Método de WARD, para las muestras salivares.

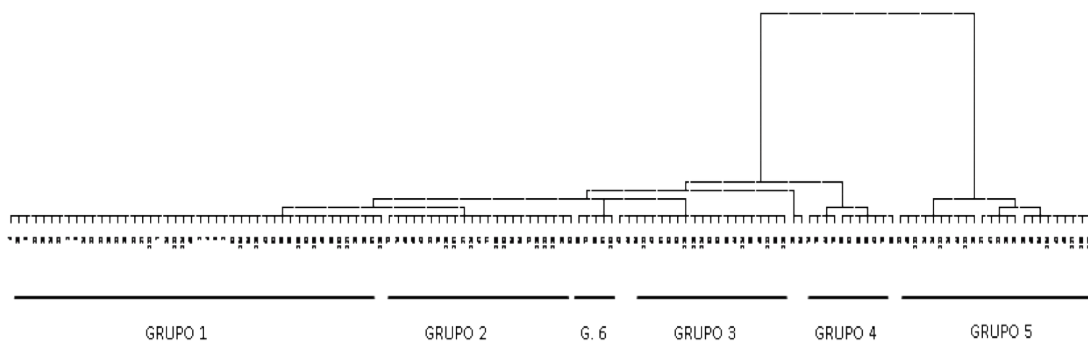


Tabla 57. Estadística descriptiva de los grupos establecidos a partir de la jerarquización de las sondas salivares.

	Frecuencia	Porcentaje (%)	
Válidos	Grupo 1	14	18,4
	Grupo 2	17	22,4
	Grupo 3	15	19,7
	Grupo 4	5	6,6
	Grupo 5	19	25,0
	Grupo 6	6	7,9
	Total	76	100,0

Figura 75. Representación de los distintos grupos obtenidos a partir de la jerarquización de las sondas salivares.

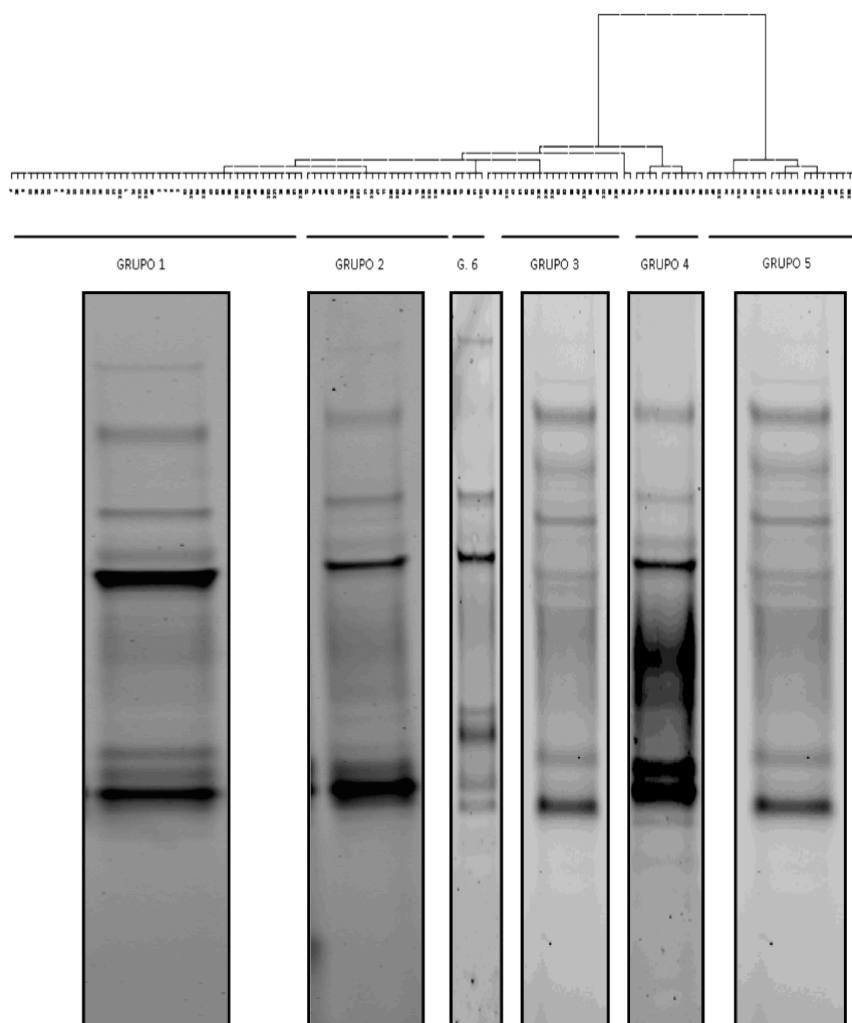
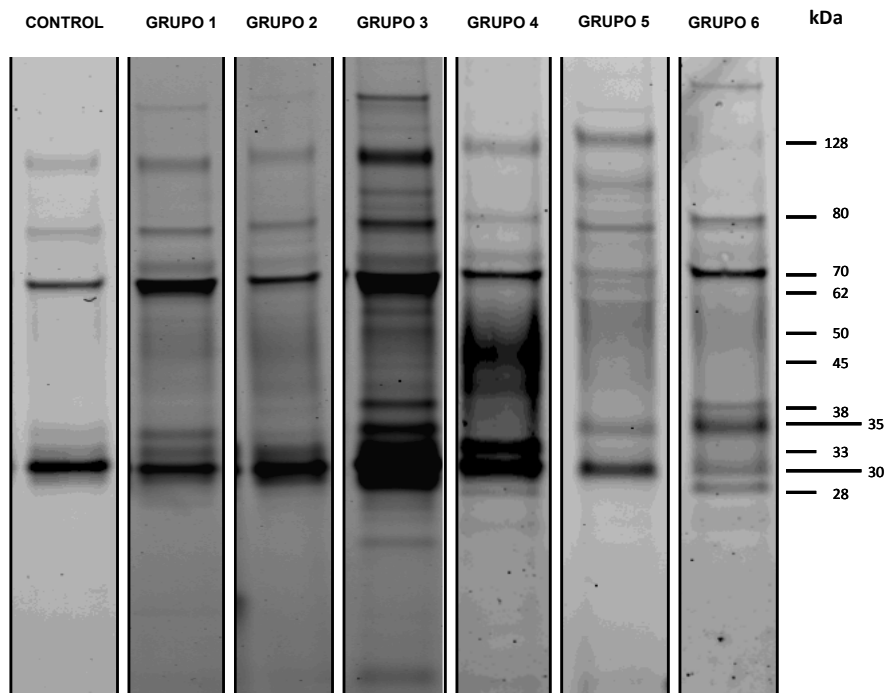


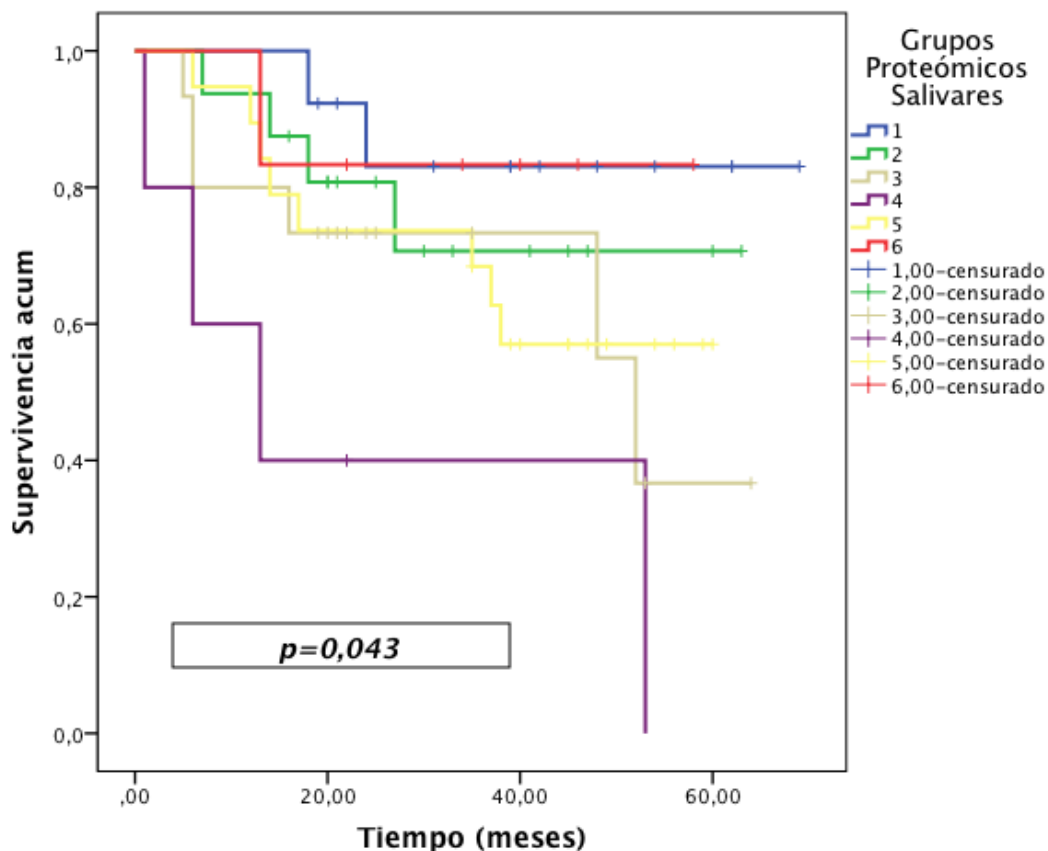
Figura 76. Perfil de los 6 grupos patológicos + Perfil del Grupo Control.

4.2.2. Análisis y estimación de la Supervivencia Global y Libre de Enfermedad en función de los grupos proteómicos salivares

Supervivencia Global (SG)

Se realizó el análisis de supervivencia de la muestra mediante el método de Kaplan-Meier, en función de los grupos establecidos jerárquicamente a partir del estudio proteómico salivar, apreciándose diferencias significativas en las probabilidades de supervivencias entre los grupos. Figura 77.

Figura 77. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a los grupos salivares establecidos mediante el análisis jerárquico.



Mediante el estudio no paramétrico de los diferentes grupos, siguiendo el método Log Rank (Mantel Cox), se apreciaron **diferencias significativas ($p=0,043$)** para la SG entre los 6 grupos estudiados.

Estimación de SG

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estimación de supervivencia expresada en meses, según el análisis Log Rank, entre los grupos salivares 1/4; 2/4 y 4/5 (Tabla 58). En la Tabla 59 se expresa la estimación en meses de supervivencia en cada uno de los grupos.

Tabla 58. Análisis de la SG por estratos.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	
Log Rank (Mantel- Cox)	1		,0425	0,115	0,002	0,148	0,878
	2	0,425		0,464	0,018	0,553	0,677
	3	0,115	0,464		0,176	0,771	0,412
	4	0,002	0,018	0,176		0,046	0,062
	5	0,148	0,553	0,771	0,046		0,386
	6	0,878	0,677	0,412	0,062	0,386	

Tabla 59. Estimación de tiempo de SG en meses.

Grupos	Media del tiempo de supervivencia			
	Estimación de supervivencia (meses)	Error Típico	Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Grupo 1	60,92	5,229	50,67	71,17
Grupo 2	49,77	5,68	38,63	60,91
Grupo 3	44,00	6,18	31,88	56,11
Grupo 4	25,20	11,88	1,90	48,49
Grupo 5	43,59	4,73	34,32	52,86
Grupo 6	50,50	6,84	37,08	63,91
Global	49,84	3,07	43,82	55,86

Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE)

Se apreciaron diferencias en la estimación de la SLE para los diferentes grupos, atendiendo al análisis de Kaplan-Meier, sin ser estadísticamente significativa en función del estudio Log Rank ($p=0,577$). Figura 78 y Tabla 60.

Figura 78. Gráfico de Kaplan-Meier. Estimación de supervivencia libre de enfermedad, con exclusión de pacientes con persistencia tumoral, en función de los grupos y agrupaciones de los perfiles salivares. (p=0,536 y 0,086).

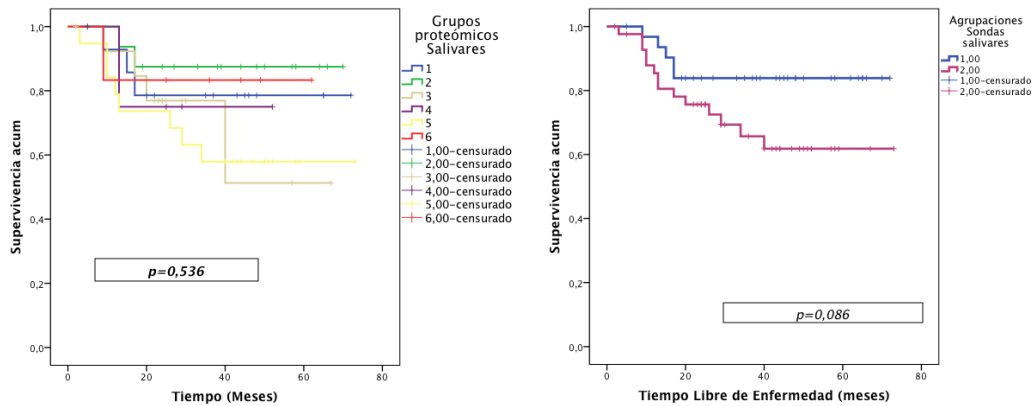


Tabla 60. Estimación de tiempo de SLE, establecida en meses.

Grupos	Media del tiempo de supervivencia			
	Estimación de supervivencia (meses)	Error Típico	Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Grupo 1	59,50	6,41	46,93	72,06
Grupo 2	59,50	5,41	49,08	70,32
Grupo 3	44,85	7,70	29,75	59,96
Grupo 4	34,80	9,48	16,20	53,39
Grupo 5	49,47	6,51	36,71	62,237
Grupo 6	53,16	8,06	37,36	68,97
Global	55,16	3,205	48,88	61,44

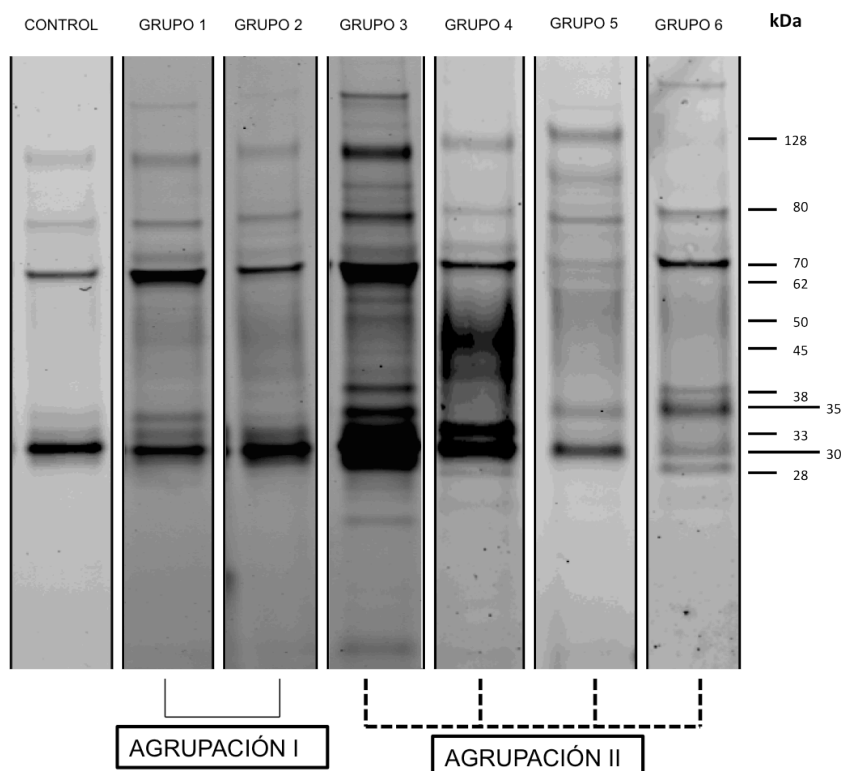
4.2.3. Agrupaciones salivares

Se realizó la agrupación de los grupos salivares (Tabla 61 y), en función de sus similitudes reflejadas en el análisis cluster. No se encontraron diferencias significativas para las variables edad y sexo entre ambos grupos (p=0,679).

Tabla 61. Agrupaciones de los grupos establecidos mediante el algoritmo jerárquico en función de sus características pronósticas.

Agrupaciones	Grupos Salivares	n	Edad	Sexo
Agrupación 1	G1+ G2	37	60,08±9,82 (38-83)	37H
Agrupación 2	G3+ G4+G5+G6	39	63,72±10,87 (41-86)	38H/1M

Figura 79. Agrupación de los distintos perfiles obtenidos a partir de la jerarquización de las sondas salivares. Agrupación I: G1+G2; Agrupación II: G3+G4+G5+G6.



4.2.4. Asociaciones clínicomoleculares

Mediante el estudio con Tablas de contingencia y la prueba estadística “Chi Cuadrado (χ^2) se analizaron las posibles asociaciones entre los grupos salivares y las variables utilizadas en el estudio clínico de la muestra: localización del tumor primario, T y N tumoral, estadio tumoral y diferenciación anatomopatológica. Se señaló en **negrita** aquellas asociaciones que se consideraron significativas mediante el análisis de los residuos tipificados (>2 y <-2).

Localización laríngea del Tumor Primario

Como se aprecia en la Tabla 62 y 63, los tumores de localización primaria laríngea supraglótica se asociaron con el grupo salivar 5, sin ser esta correlación significativa. Los tumores de localización glótica, por su parte, se asociaron con los grupos 1 y 2.

Tabla 62. Tabla de contingencia correspondiente a las variables localización del tumor primario y grupos salivares. ($\chi^2= 0,793$).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Supraglotis	11,5%	19,2%	23,1%	3,8%	34,6%	7,7%
Glottis	23,8%	21,4%	19,0%	7,1%	19,0%	9,5%
Subglottis	50,0%	50,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Tabla 63. Tabla de contingencia correspondiente a las variables localización del tumor primario y agrupación de los grupos salivares. ($\chi^2= 0,152$).

	Agrupación I	Agrupación II
Supraglotis	38,5%	61,5%
Glottis	54,8%	45,2%
Subglottis	100%	0%

Clasificación TNM

Tamaño tumoral (T)

Como podemos apreciar a través de las Tablas 64-65 y de la Figura 80 se correlacionó de forma positiva el resultado en las muestras salivares correspondientes al grupo 1 con tumores con extensión T1; así como, el grupo 4 y 5 con tumores con extensión T3 y T4.

Tabla 64. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar junto con el T tumoral. (χ^2 ; $p=0,045$).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
T1	42,9%	29,4%	7,1%	0,0%	5,6%	0,0%
T2	35,7%	23,5%	28,6%	50,0%	11,1%	50,0%
T3	14,3%	35,3%	50,0%	0,0%	61,1%	33,3%
T4	7,1%	11,8%	14,3%	50,0%	22,2%	16,7%

Figura 80. Gráfico de barras que refleja la Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar junto con el T tumoral. (χ^2 ; $p=0,045$).

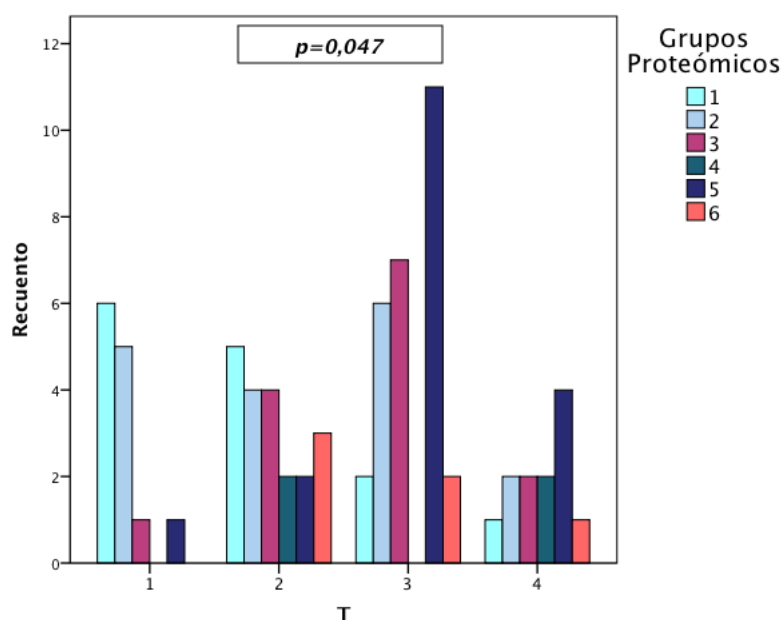


Tabla 65. Tabla de contingencia correspondiente a la asociación entre la variable tamaño tumoral (T1,T2,T3 y T4), y la agrupación de las bandas salivares (Agrupación I y II). ($\chi^2=0,004$).

	Agrupación I	Agrupación II
T1	84,6%	15,4%
T2	50,0%	50,0%
T3	28,6%	71,4%
T4	25,0%	75,0%

Estadio tumoral

Se encontraron diferencias significativas ($p=0,014$) en el análisis global de las asociaciones entre el estadio tumoral y los diferentes grupos salivares. En las Tablas 66 y 67, así como en la Figura 81 se refleja la asociación entre el estadio tumoral y los grupos o agrupaciones salivares.

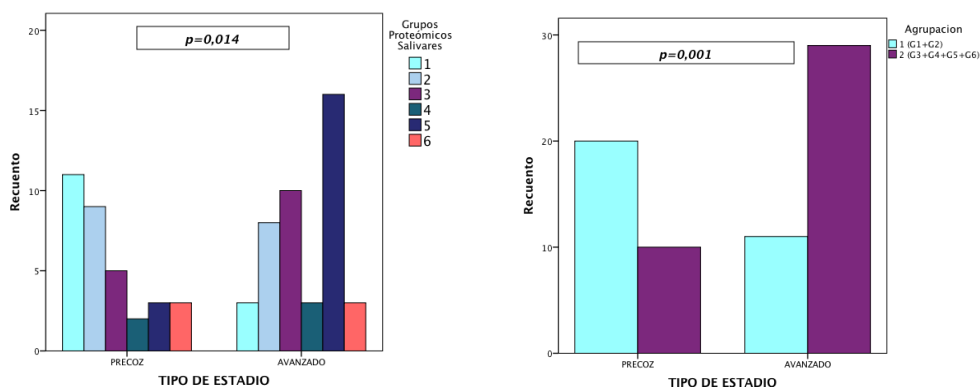
Tabla 66. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar junto con el estadio tumoral. (χ^2 ; $p=0,014$). Porcentaje (%) dentro del grupo salivar.

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Estadio I	42,9%	29,4%	6,7%	0,0%	5,3%	0,0%
Estadio II	35,7%	23,5%	26,7%	40,0%	10,5%	50,0%
Estadio III	14,3%	35,3%	20,0%	0,0%	47,4%	33,0%
Estadio IV	7,1%	11,8%	46,7%	60,0%	36,8%	16,7%

Tabla 67. Tabla de contingencia correspondiente a la asociación entre la variable estadio tumoral agrupado (precoz y avanzado), y la agrupación de las bandas salivares (Agrupación I y II). ($\chi^2 = 0,001$).

	Agrupación I	Agrupación II
Estadio Precoz	63,6%	36,4%
Estadio Avanzado	25,6%	74,4%

Figura 81. Estadística inferencial correspondiente con la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar y sus agrupaciones, junto con el estadio tumoral clasificado en precoz y avanzado. (χ^2 ; $p=0,014$ - χ^2 ; $p=0,001$).



Diferenciación celular anatomopatológica

Como se pone de manifiesto en las Tablas 68-70 y Figura 82, los perfiles salivares englobados en la Agrupación I (G1+G2) se asociaron con patrones de buena diferenciación anatomopatológica, mientras que los englobados en la Agrupación II (G3+G4+G5+G6), parecen asociarse a patrones de peor diferenciación (moderada diferenciación+ pobre diferenciación).

Tabla 68. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar junto con el análisis anatomopatológico. (χ^2 ; $p=0,021$).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Buena Diferenciación	71,4%	43,8%	53,3%	20,0%	22,2%	16,7%
Moderada Diferenciación	7,1%	56,3%	20,0%	60,0%	38,9%	33,3%
Pobre Diferenciación	21,4%	0,0%	26,7%	20,0%	38,9%	50,0%

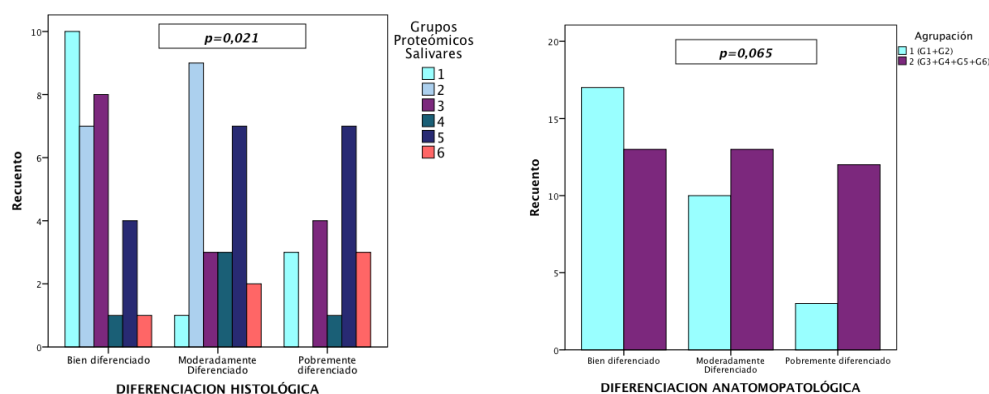
Tabla 69. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar junto con el análisis anatomopatológico agrupado en alta diferenciación y baja diferenciación. (χ^2 ; $p=0,046$).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Alta Diferenciación (BD)	71,4%	43,8%	53,3%	20,0%	22,2%	16,7%
Baja Diferenciación (MD + PD)	28,6%	56,3%	46,7%	80,0%	77,8%	83,3%

Tabla 70. Tabla de contingencia correspondiente a la asociación entre la variable diferenciación anatomopatológica (Buena diferenciación BD y mala diferenciación: MD+PD), y la agrupación de las bandas salivares (Agrupación I y II). ($\chi^2= 0,05$).

	Agrupación I	Agrupación II
Buena Diferenciación	54,8%	45,2%
Mala Diferenciación	32,6%	67,4%

Figura 82. Estadística inferencial correspondiente a la asociación entre los grupos jerarquizados del estudio proteómico salivar y sus agrupaciones junto con el análisis anatomopatológico. (χ^2 ; $p=0,021$ - χ^2 ; $p=0,065$).



En la siguiente Tabla queda patente la asociación entre las agrupaciones salivares y los factores de buen o mal pronóstico definidos a partir de las variables clínicas.

Tabla 71. Resumen correspondiente a la asociación entre los factores pronósticos clínicos previamente establecidos y las agrupaciones salivares (I y II).

	Buen Pronóstico				Mal Pronóstico			
	EI-II	T1-T2	BD	Glottis	EIII-EIV	T3-T4	MD	Supraglottis
Agrupación I	63,6 %	65,6%	54,8%	54,8%	25,6%	29,3%	32,6%	38,5%
Agrupación II	36,4 %	34,4%	45,2%	45,2%	74,4%	70,7%	67,4%	61,5%
P	0,001	0,004	0,05	0,152	0,001	0,004	0,05	0,152

SG por Agrupaciones

Como se refleja en la Figura 83 y en la Tabla 72, se encontraron diferencias significativas entre las distintas agrupaciones, en función de la SG.

Figura 83. Kaplan-Meier para las diferentes agrupaciones en función de los grupos salivares. ($p=0,044$).

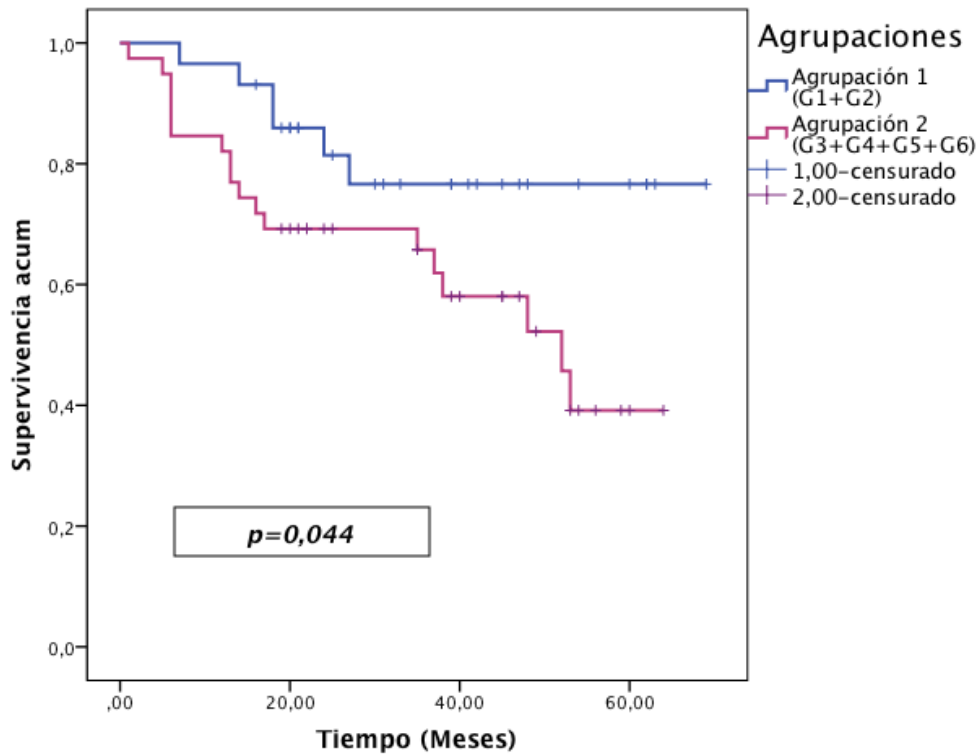


Tabla 72. Estimación media del tiempo de SG para las agrupaciones salivares 1y 2. Log Rank (Mantel Cox): 0,044.

Grupos	Media del tiempo de supervivencia			
	Estimación de supervivencia (meses)	Error Típico	Intervalo de Confianza	
			Límite inferior	Límite superior
Agrupación 1	57,739	3,795	50,301	65,177
Agrupación 2	41,772	3,904	34,119	49,425

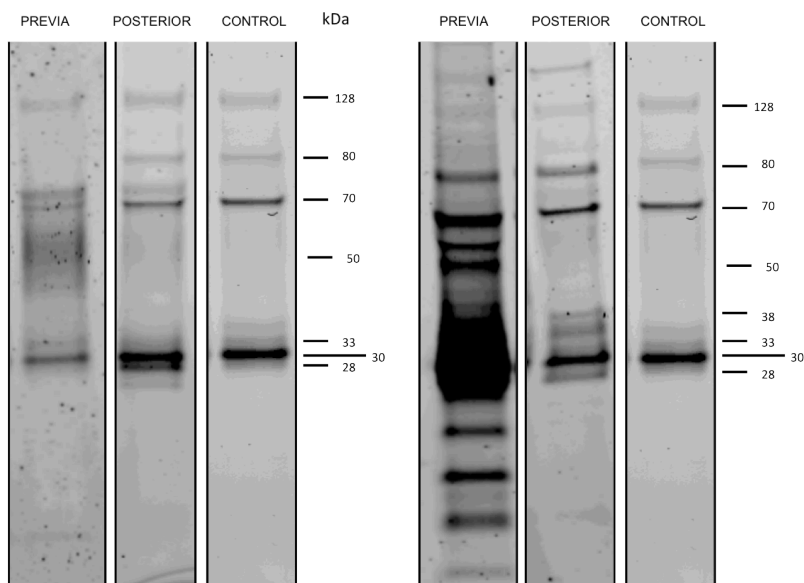
4.2.5. Análisis del pronóstico y de la evolución clínica, en función de las agrupaciones salivares.

4.2.5.1. Evolución clínica reflejada en las sondas salivares

Tumor Primario y evaluación postquirúrgica en el primer mes

Una de las aplicaciones con más utilidad clínica en los pacientes con carcinoma epidermoide faringolaríngeo es el control de su evolución a lo largo de su seguimiento. La Figura 84 muestra los notables cambios cualitativos en las sondas salivares de dos pacientes con diagnóstico de CECC, tratados quirúrgicamente, en el análisis realizado al mes siguiente de la intervención.

Figura 84. Representación de las sondas salivares de dos pacientes con tumor primario faringolaríngeo intervenidos quirúrgicamente y su evolución posterior en el primer mes. Como perfil de referencia se toma el grupo control.



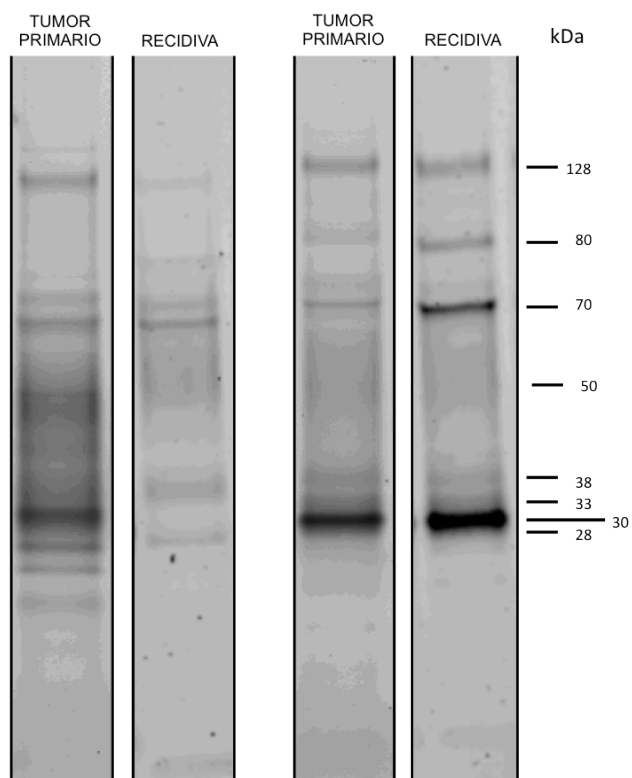
Tumor Primario y Progresión de la enfermedad

Determinados pacientes presentan una evolución clínica hacia la progresión de la enfermedad en forma de recidiva, segundo tumor o metástasis a distancia. Resulta complicado evaluar clínicamente esos cambios, sobre todo cuando el paciente esta

sometido a otros tratamientos postquirúrgicos que producen procesos inflamatorios y edematosos secundarios.

Como se puede apreciar en la siguiente Figura 85, las sondas salivares en muestras con tumor primario y recidiva presentan patrones en la configuración de las bandas muy parecidos, que nos indican que la cuantificación enzimática SH es similar. Añadido al contexto clínico, podrían ayudar en el diagnóstico de progresión de la enfermedad.

Figura 85. Representación de sondas de tumor primario y de progresión de la enfermedad (recidiva). Patrones cualitativamente semejantes.



4.2.5.2. Análisis pronóstico de las sondas ABPP

Con la finalidad de poder evaluar la capacidad de las sondas ABPP en el estudio del comportamiento biológico tumoral se establecieron cuatro grupos de trabajo; en cada uno de ellos se tuvo en cuenta el pronóstico y la evolución de los pacientes, tal y

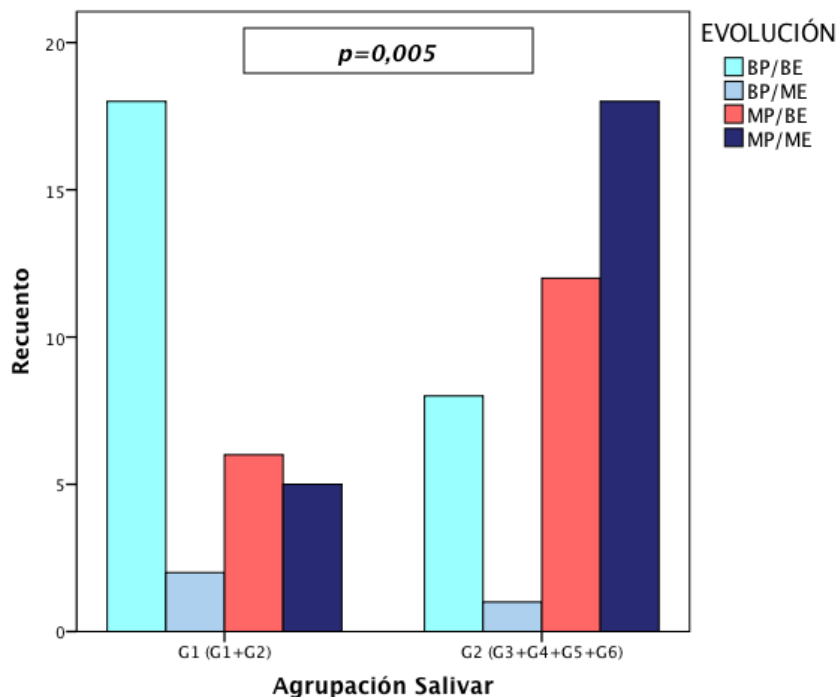
como se aprecia en la Tabla 73.

Tabla 73. Distribución de los grupos pronósticos y evolutivos en función de los criterios clínicos previamente establecidos.

Grupos	Criterios
Buen Pronóstico (BP)	Estadios iniciales tumorales (EI-EII)
Buena evolución (BE)	No progresión de enfermedad ni muerte relacionada con el tumor.
Mal Pronóstico (MP)	Estadios avanzados Tumorales (EIII-EIV)
Mala Evolución (ME)	Progresión de enfermedad y/o Éxitus

De la Figura 86 se deduce que el agrupamiento de los grupos salivares 1 y 2 (G1) y de los grupos 3, 4, 5 y 6 (G2), trajo como consecuencias diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los pacientes ($p=0,005$), principalmente en la asociación entre buen pronóstico y buena evolución en los englobados en la Agrupación I, y mal pronóstico/mala evolución en la Agrupación II.

Figura 86. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre las agrupaciones salivares y la evolución y pronóstico de los pacientes ($p=0,005$).



4.2.6. Validez de las sondas salivares ABPP en el diagnóstico precoz y avanzado del cáncer faringolaríngeo

Curvas ROC y Área Bajo la Curva (AUC).

Se realizó el análisis estadístico mediante las curvas ROC y el AUC para las bandas (kd) 28, 30, 33, 38, 50, 62 y 80 de cada una de las 132 sondas salivares analizadas. Los mejores resultados se obtuvieron del análisis de la banda 33 con una AUC de 0,80, tal y como se representa en la Tabla 74 y en la Figura 87.

Tabla 74. Características de los resultados de las bandas 33, 38 y 50, obtenidos a partir de las curvas ROC.

Área Bajo la Curva ROC			
Variables de contraste	Área	Error Típico	Sig. Asintótica
Banda 28	0,65		
Banda 30	0,50	0,052	0,924
Banda 33	0,80	0,043	0,001
Banda 38	0,62	0,051	0,040
Banda 50	0,68	0,051	0,002
Banda 62-65	0,73	0,058	0,001
Banda 80	0,72	0,047	0,001

Sensibilidad y Especificidad; Valor Global y Error Global.

La Sensibilidad y Especificidad de cada una de las bandas y sus combinaciones se calculó mediante la identificación del punto de corte que produjo la mayor suma de Sensibilidad y Especificidad en las curvas ROC (Punto de Yoiden). La **Banda 33** mostró los mejores resultados de validez diagnóstica salivar: porcentaje debajo de la *curva ROC del 80,0%*, *S: 77,2* y *E:70,0*; *VPP:89,7*, *VPN: de47,7*; *VG: 75,0%* y *EG: 25,0%*, para un punto de corte establecido en 1,39.

Figura 87. Curva ROC y Área bajo la curva (AUC) para las Bandas salivares 28, 30, 33, 38, 50, 62 y 80

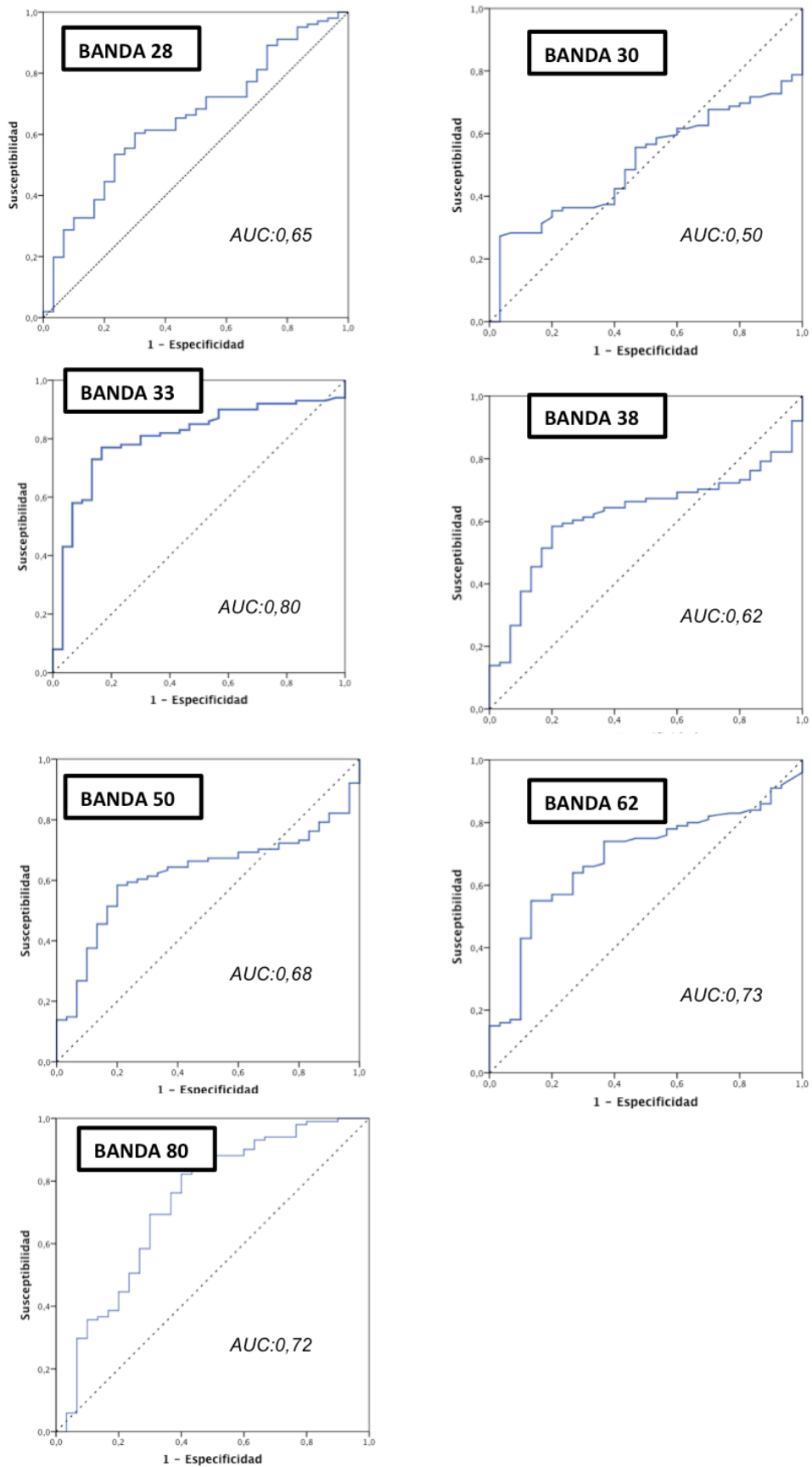


Tabla 75. Tabla de contingencia que muestra los resultados de la Banda 33. La certeza de sano o enfermo se otorga con la anatomía patológica (Gold Standart).

	Enfermo	Sano	Total
Test +	78 89,7%	9 10,3%	87 100,0%
Test -	23 52,3%	21 47,7%	44 100,0%
Total	101 77,1%	30 22,9%	131 100,0%

Se agruparon las bandas que presentaron mayor área bajo la curva (AUC) en las curvas ROC (33, 62-65 y 80), con la finalidad de establecer la validez de la prueba mediante el cálculo de Sensibilidad, Especificidad y Área bajo la curva ROC, para dos supuestos diferentes:

Supuesto 1. Son necesarios dos resultados patológicos (punto de corte superior al estandar) en alguna de las bandas establecidas para considerar la prueba como positiva. Tabla 76.

Tabla 76. Tabla de contingencia que muestra los resultados de la prueba diagnóstica para el supuesto 1.

	Enfermo	Sano	Total
Test +	84 88,4%	11 11,6%	95 100,0%
Test -	17 47,2%	19 52,8%	36 100,0%
Total	101 77,1%	30 22,9%	131 100,0%

Esta Tabla nos permite establecer los siguientes datos:

- *Sensibilidad: 83,1%*
- *Especificidad: 63,5%*
- *Verdaderos negativos: n= 19*
- *Verdaderos positivos: n= 84*

- *Falsos negativos: n= 17*
- *Falsos positivos: n= 11*
- *Valor Predictivo Positivo: 88,4%*
- *Valor Predictivo Negativo: 52,8%*

Supuesto 2. Al menos un resultado patológico en alguna de las bandas establecidas, se consideró como positivo. Tabla 77.

Tabla 77. Tabla de contingencia que muestra los resultados de la prueba diagnóstica para el supuesto 2.

	Enfermo	Sano	Total
Test +	100 84,0%	19 16,0%	119 100,0%
Test -	1 8,3%	11 91,7%	12 100,0%
Total	101 77,1%	30 22,9%	131 100,0%

De la Tabla 77 se pueden extrapolar los datos siguientes:

- *Sensibilidad: 99,0%*
- *Especificidad: 35,5%*
- *Verdaderos negativos: n= 11*
- *Verdaderos positivos: n= 100*
- *Falsos negativos: n= 1*
- *Falsos positivos: n= 19*
- *Valor Predictivo Positivo: 84,0%*
- *Valor Predictivo Negativo: 91,7%*

Al calcular el *Valor Global (VG)*, es decir, la suma de los Verdaderos Positivos (VP) y de los Verdaderos Negativos (VN) y su división por el total (T), obtuvimos el resultado de 84,7% para la agrupación del supuesto 2, y del 77,0% para el supuesto 1 ($p>0,05$). De manera inversa se calculó el *Error Global (EG)* que fue de 15,3% y de 23%, respectivamente.

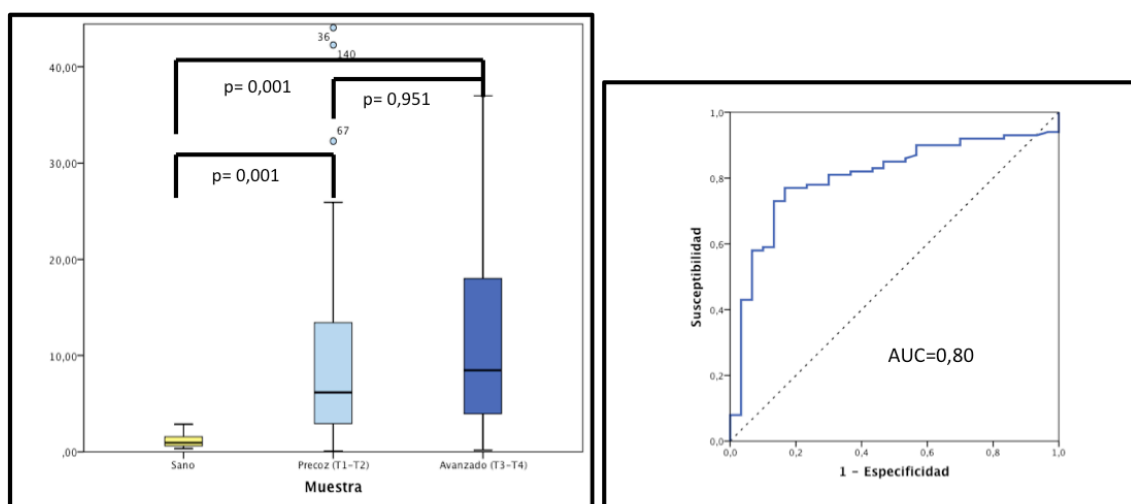
Importancia de las Bandas salivares para el diagnóstico en etapas precoces del cáncer faringolaríngeo

Mediante el análisis por el método ANOVA para muestras independientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el perfil de las enzimas SH en las bandas 33 y 80, para el grupo control y los pacientes en estadios iniciales de la enfermedad ($p=0,001$).

En las siguientes Tablas y Figuras se refleja de forma esquemática la validez diagnóstica de las bandas salivares 33, 62-65 y 80 para estadios iniciales y avanzados.

Banda 33

Figura 88. Gráfico de dispersión para las muestras: sano, tamaño tumoral T1-T2 y T3-T4. Representación de la Curva ROC para la banda 33, y resumen validez diagnóstica.



Punto de Corte	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VG	EG
1,39	0,80	77,2	70,0	75,0%	25,0%

Muestra	n	Media/ D.T	p= Sano/T1-T2/T3-T4
Sano	24	1,14±0,70	$p<0,05/p<0,05$
T1-T2 (Precoz)	35	10,11±11,35	$P<0,05/p>0,05$
T3-T4 (Avanzado)	41	11,75±11,59	$P<0,05/p>0,05$

Tabla 78. Estadística inferencial correspondiente a la comparación de medias mediante la prueba T de Student para muestras independientes, entre el grupo control y el grupo estadio precoz ($p=0,001$).

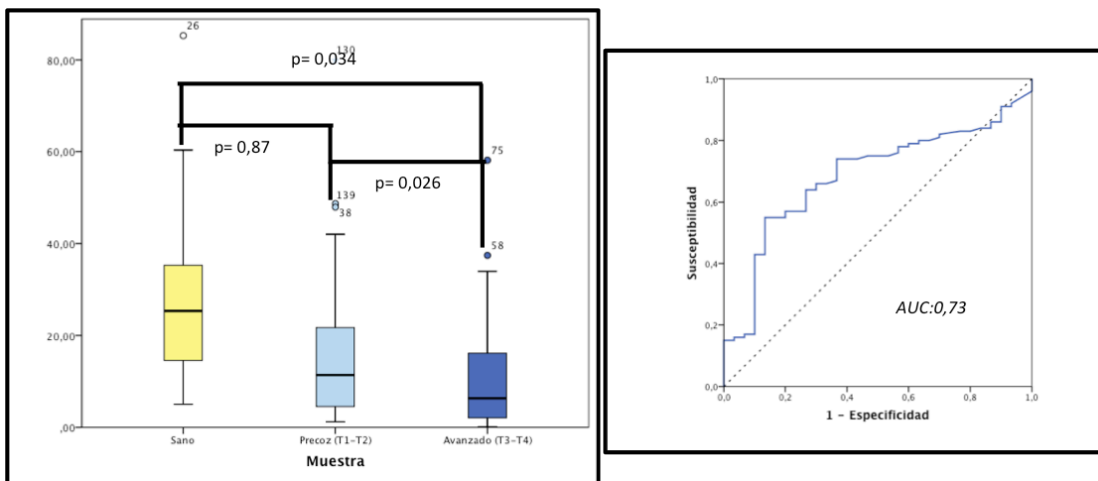
	N	Media
Grupo Control	24	1,14
Estadio Precoz (T1-T2)	35	10,11

Tabla 79. Estadística inferencial correspondiente a la comparación de medias para el grupo control y el grupo T1 ($p=0,001$).

	N	Media
Grupo Control	24	1,14
T1(lesiones iniciales)	12	5,29

Banda 62-65

Figura 89. Gráfico de dispersión para las muestras: sano, tamaño tumoral T1-T2 y T3-T4. Representación de la Curva ROC para la banda 62-65, y resumen validez diagnóstica.

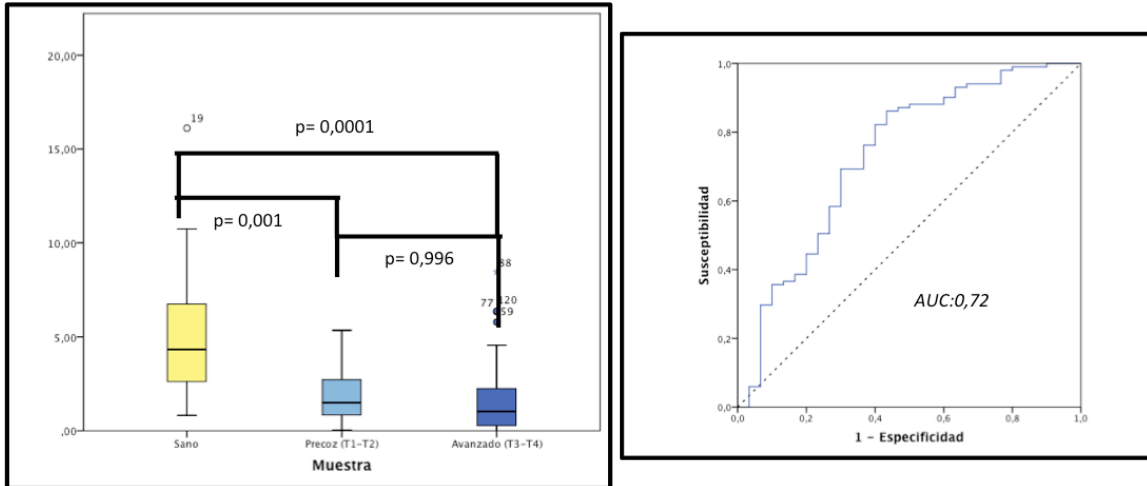


Punto de Corte	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VG	EG
15,1	73,3%	74,3	50,0	72,5%	27,5%

Muestra	n	Media/ D.T	p= Sano/T1-T2/T3-T4
Sano	24	28,9±19,44	p>0,05/p<0,05
T1-T2 (Precoz)	35	18,42±21,35	P>0,05/p<0,05
T3-T4 (Avanzado)	41	10,80±12,23	P<0,05/p<0,05

Banda 80

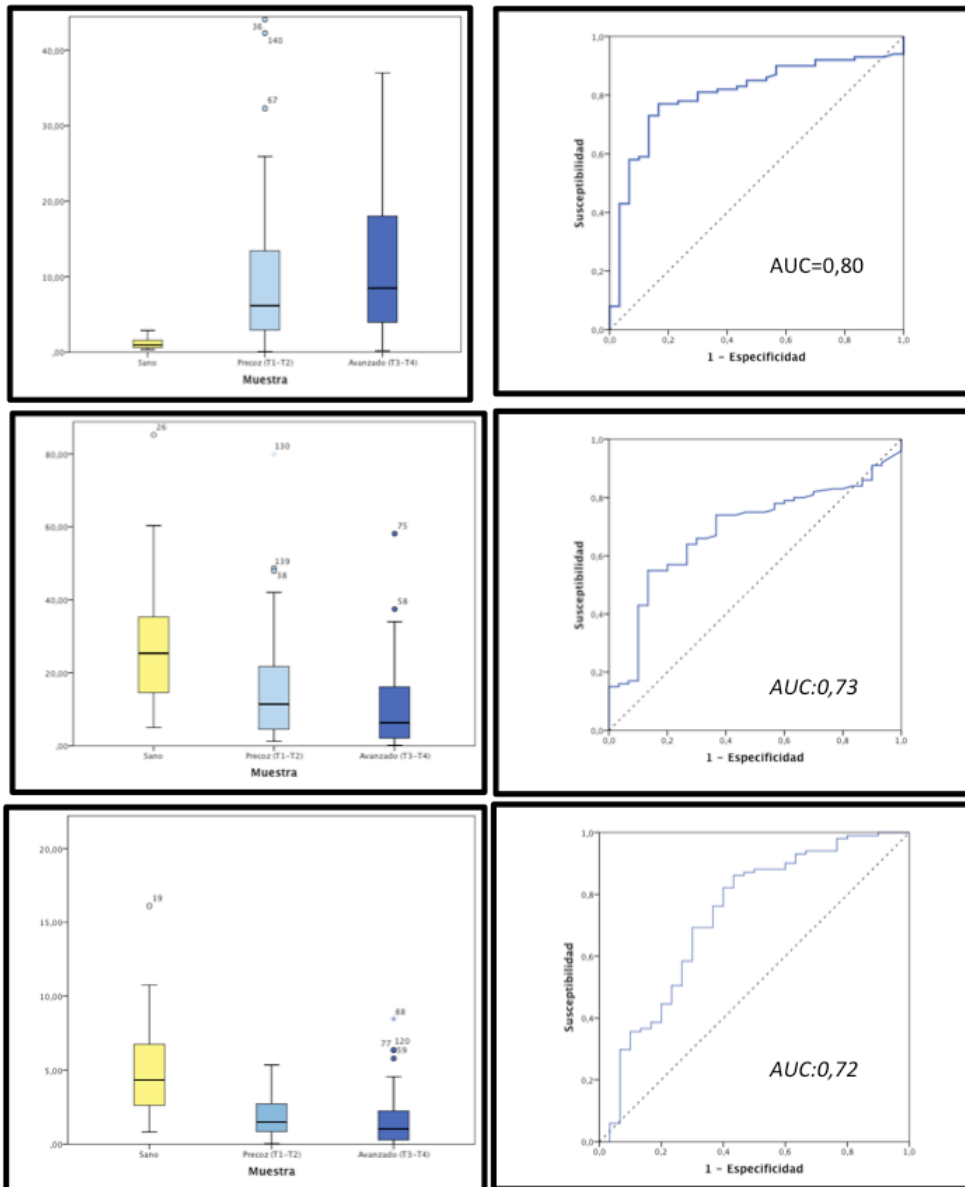
Figura 90. Gráfico de dispersión para las muestras: sano, tamaño tumoral T1-T2 y T3-T4. Representación de la Curva ROC para la banda 33, y resumen validez diagnóstica.



Punto de Corte	AUC	Sensibilidad	Especificidad	VG	EG
2,53	72,3%	75,9	50,0	66,4%	33,6%

Muestra	n	Media/ D.T	p= Sano/T1-T2/T3-T4
Sano	24	5,23±3,58	P<0,05/p<0,05
T1-T2 (Precoz)	35	1,8,4±1,39	P<0,05/p>0,05
T3-T4 (Avanzado)	41	1,79±2,01	P<0,05/p>0,05

Figura 91. Resumen gráfico gráficos de dispersión, curvas ROC, S y E y significación.



	S y E	T1-T2 vs Sano
Banda 33	77,2 y 70	0,001
Banda 62-65	74,3 y 50	0,087
Banda 80	75,9 y 50	0,001
Agrupación I	83,1 y 63,5	0,001
Agrupación II	99,0 y 33,5	0,001

4.3. Análisis de la Supervivencia Global y Libre de Enfermedad

4.2.1 Estudio de la Supervivencia Global

El análisis de supervivencia fue realizado mediante el método Kaplan-Meier (Figura 92) y regresión de Cox de los 109 pacientes en seguimiento desde el comienzo del estudio hasta la fecha 1 de Julio de 2014 (73 meses), excluyendo a 3 pacientes que se consideraron perdidos.

El 63,1% (n=68) de los pacientes permanecieron con vida en el momento de la evaluación mientras que el 36,9% (n=41) restante fallecieron a lo largo del período de estudio (Tabla 80 y Figura 93). El tiempo medio de fallecimiento de los pacientes fue de 32,40 meses, según se refleja en la Tabla 81.

Figura 92. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la función de SG para la muestra.

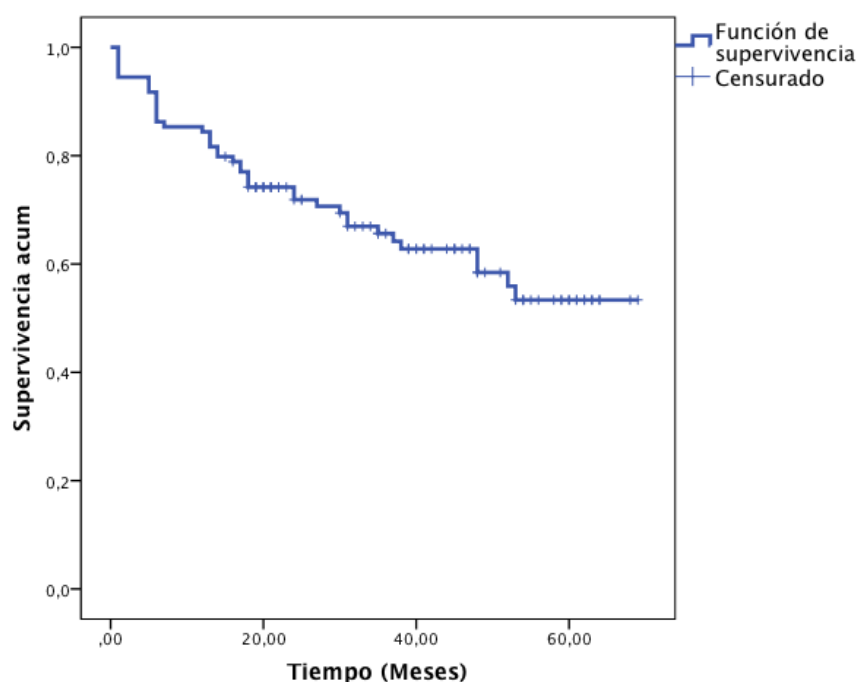


Tabla 80 . Resumen del número de eventos éxitus y supervivientes de la serie.

Nº Total	Eventos (Éxitus)		Supervivientes	
	n	Porcentaje	n	Porcentaje
109	41	36,9%	68	63,1%

Figura 93. Gráfico de sectores correspondiente a la distribución de la variable éxitus.

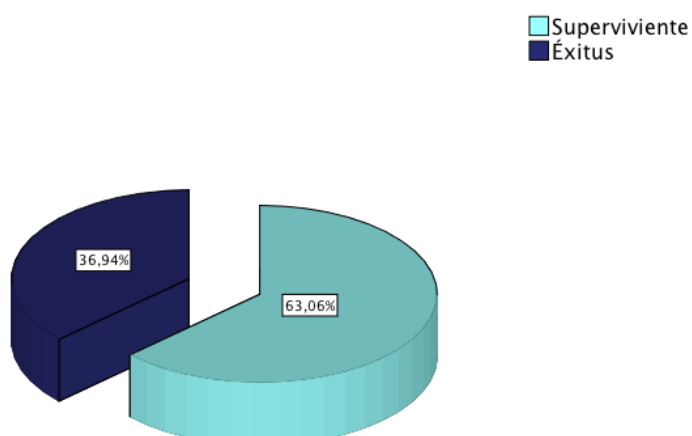


Tabla 81. Estadístico descriptivo de la variable estudiada éxitus.

N	Válidos: 110
Media	32,40
Desviación típica	19,47
Mínimo	1,00
Máximo	69,00

La estimación de SG para la muestra fue de 47,40 meses (Tabla 82). Las estimaciones de la SG por meses así como la función de impacto, se reflejan en la Tabla 83 y en la Figura 94.

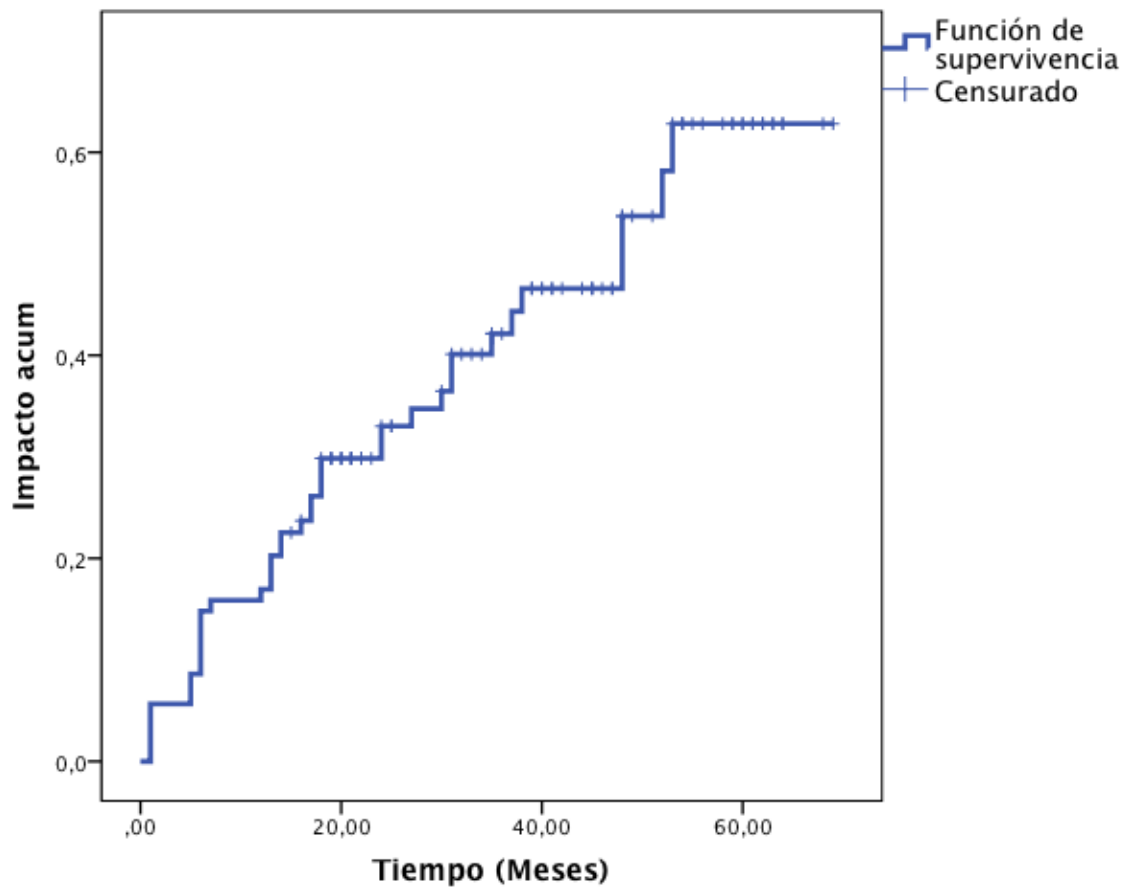
Tabla 82. Estimación y media del tiempo de SG de la muestra.

		Media	
Estimación	Error Típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
47,40	2,65	42,20	52,60

Tabla 83. Estimación de la SG en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	84,4%	0,035	17	92
24	74,2%	0,042	28	79
36	65,6%	0,048	35	49
48	58,4%	0,055	39	27
60	53,4%	0,61	41	21

Figura 94. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la Función de Impacto sobre la SG.

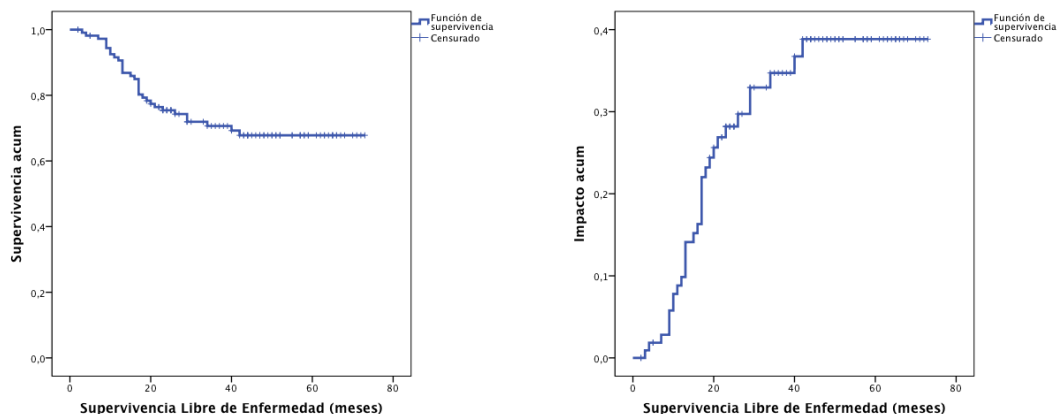


4.2.2. Estudio de la Supervivencia Libre de Enfermedad

En el estudio de la SLE se agruparon los eventos: recidiva local y regional junto con enfermedad a distancia (metástasis), para definir la variable progresión tumoral. Definimos la SLE como el tiempo que transcurre entre el tratamiento realizado y el evento progresión tumoral.

Desde el comienzo del trabajo en Enero de 2008 hasta la fecha final de seguimiento en Julio de 2014 se recopilaron un total de 32 eventos, correspondientes a progresión de enfermedad tras el tratamiento. En la siguiente Figura, se aprecian los gráficos diseñados tras el análisis de Kaplan-Meier para la SLE.

Figura 95. Grafico de Kaplan-Meier, correspondiente a la función de SLE y función de impacto para la muestra.



La estimación media de la muestra libre de enfermedad fue de 55,43 meses (Tabla 84) con un error estándar de 2,60 y un intervalo de confianza al 95% comprendido entre 50,32 y 60,53 meses.

A los 24 meses de seguimiento la estimación de SLE fue del 85,0% y a los 48 meses del 74,3%. Tabla 85.

Tabla 84. Tabla. Estimación y media del tiempo de SLE de la muestra.

Media			
Estimación	Error Típico	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
55,43	2,60	50,32	60,53

Tabla 85. Estimación de la SLE en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	90,6%	0,028	10	96
24	85,0%	0,035	16	90
36	75,4%	0,042	26	76
48	74,3%	0,043	27	65
73	67,8%	0,048	32	47

4.4. Análisis de los factores pronósticos relacionados con el CECC

4.3.1 Análisis univariante de la SG

Localización tumoral primaria.

Análisis de la SG según la localización tumoral primaria

En el estudio gráfico de las curvas de supervivencia según la estimación de Kaplan-Meier por localización tumoral primaria (tumores laríngeos y faríngeos) se apreciaron diferencias entre los diferentes grupos, disminuyendo de forma significativa la SG en tumores de afectación faríngea, tal y como se refleja en la siguiente Figura:

Figura 96. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función de la localización tumoral primaria. ($p=0,014$).

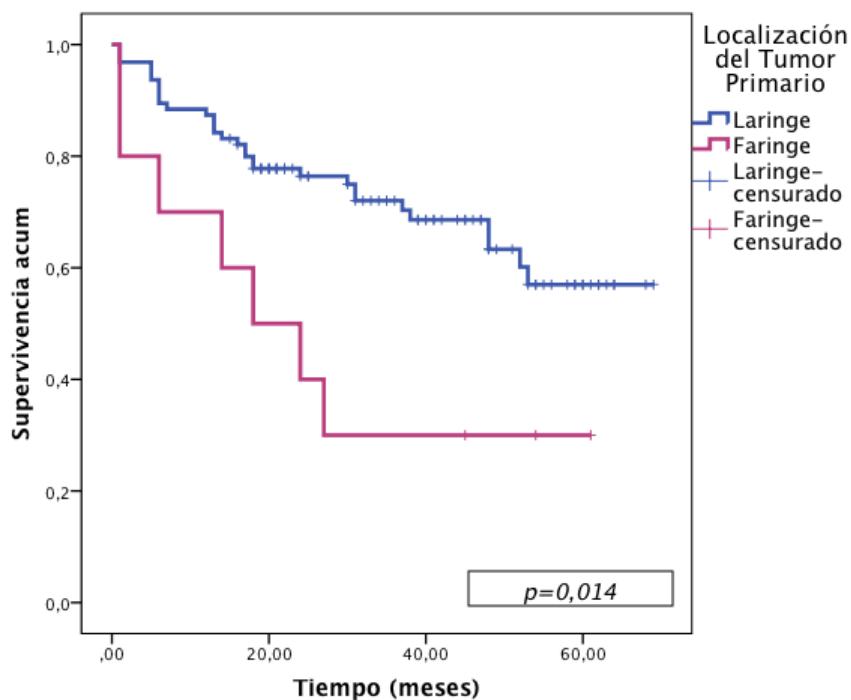


Tabla 86. Estimación media de la SG en función de la localización tumoral laríngea.

		Media		
		Intervalo de confianza al 95%		
Localización tumoral	Estimación	Error Típico	Límite inferior	Límite superior
Laríngea				
Localización	50,26	2,73	44,90	55,62
Supraglótica				
Localización	27,40	7,42	12,84	41,96
Glótica				

Según el modelo de regresión de Cox, suponiendo tendencia lineal, se concluyó que existían diferencias significativas entre los grupos de localización tumoral laríngea ($p=0,001$).

En las Tablas 87 y 88, se reflejan las distintas estimaciones de SG en función de la localización tumoral primaria.

Tabla 87. Estimación de la SG por localización tumoral primaria laríngea, en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	87,4%	0,034	10	85
36	72,0%	0,048	25	49
60	57,0%	0,069	31	18

Tabla 88. Estimación de la SG por localización tumoral primaria faríngea, en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	70,0%	0,126	2	8
36	40,0%	0,155	4	6
60	30,0%	0,145	7	3

Distribución por edad

Análisis de SG según la distribución por edad

Se realizó el análisis siguiendo la metodología de Kaplan-Meier y se establecieron diferencias significativas en la probabilidad de SG entre los diferentes grupos.

Figura 97. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función de la edad agrupada. (p=0,033).

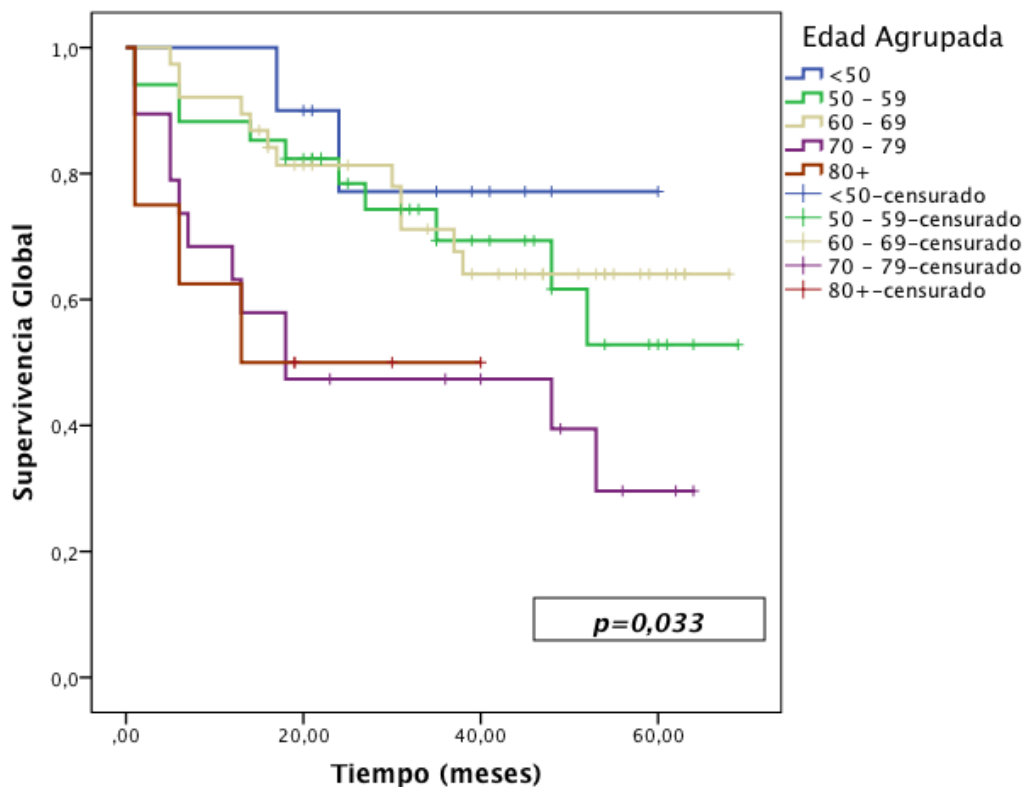


Tabla 89. Estimación del tiempo medio de SG.

Edad Agrupada	Estimación	Error Típico	Media	
			Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
<50	51,07	5,59	40,11	62,03
50-59	49,87	4,60	40,85	58,89
60-69	51,40	3,96	43,62	59,17
70-79	32,49	6,01	20,70	44,28
>80	22,62	6,26	10,34	34,90

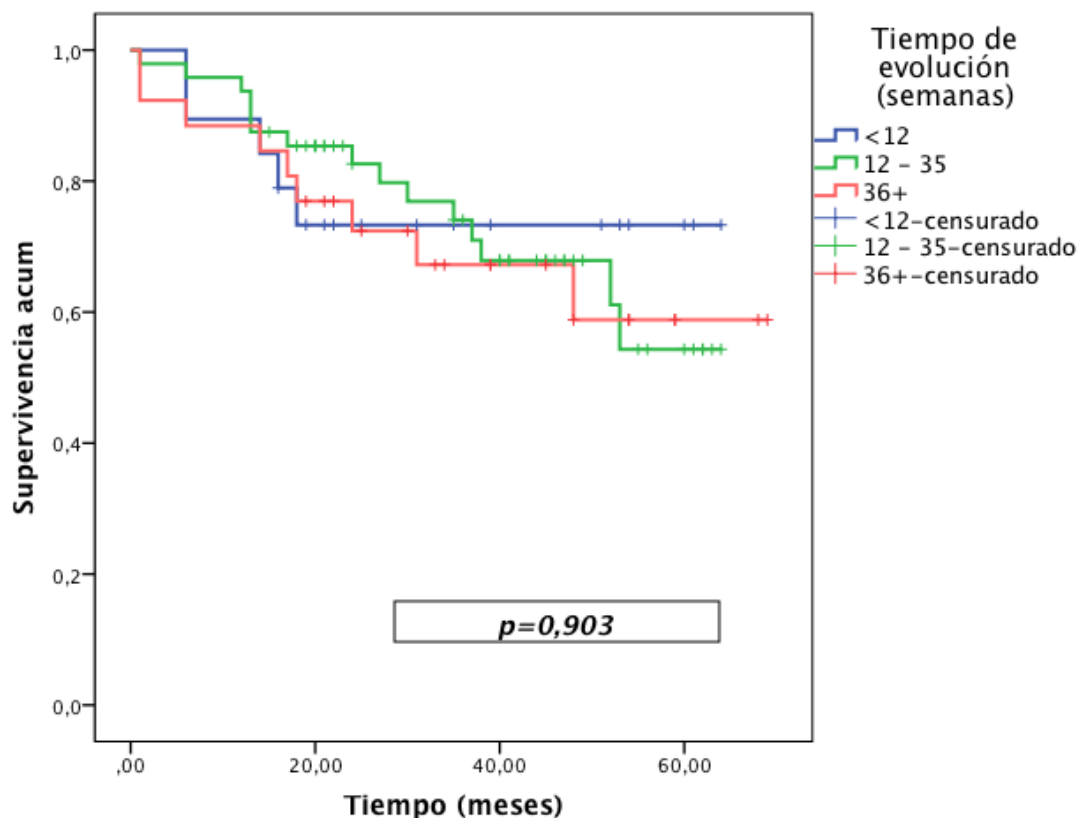
En el estudio con contraste de Mantel-Cox (Log Rank) suponiendo tendencia lineal, se llegó a la conclusión de que existían diferencias significativas en la variable SG entre los diferentes grupos de edad (p=0,033).

Evolución del tumor primario (semanas)

Análisis de la SG en función del tiempo de evolución del tumor primario

El análisis de supervivencia de la muestra se llevó a cabo siguiendo el método de Kaplan-Meier, en función del tiempo de demora entre la aparición de la sintomatología y la consulta a Otorrinolaringología; sin apreciarse diferencias significativas en las probabilidades de supervivencias entre los grupos, como se aprecia en la Figura 98

Figura 98. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función del tiempo de evolución de la enfermedad. ($p=0,903$).



Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos, utilizando el método Log Rank (Mantel-Cox), no se apreciaron diferencias significativas ($p=0,885$) para la SG entre los grupos asignados.

Localización tumoral laríngea

Análisis de la SG según la localización tumoral laríngea

En el estudio gráfico de las curvas de supervivencia según la estimación de Kaplan-Meier por localización tumoral laríngea (tumores glóticos y supraglóticos [excluyendo tumoraciones subglóticas por muestreo insuficiente]), se apreciaron diferencias entre los grupos, disminuyendo de forma significativa la SG en tumores de afectación supraglótica, tal y como se refleja en la siguiente Figura:

Figura 99. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función de la localización tumoral laríngea. ($p=0,001$).

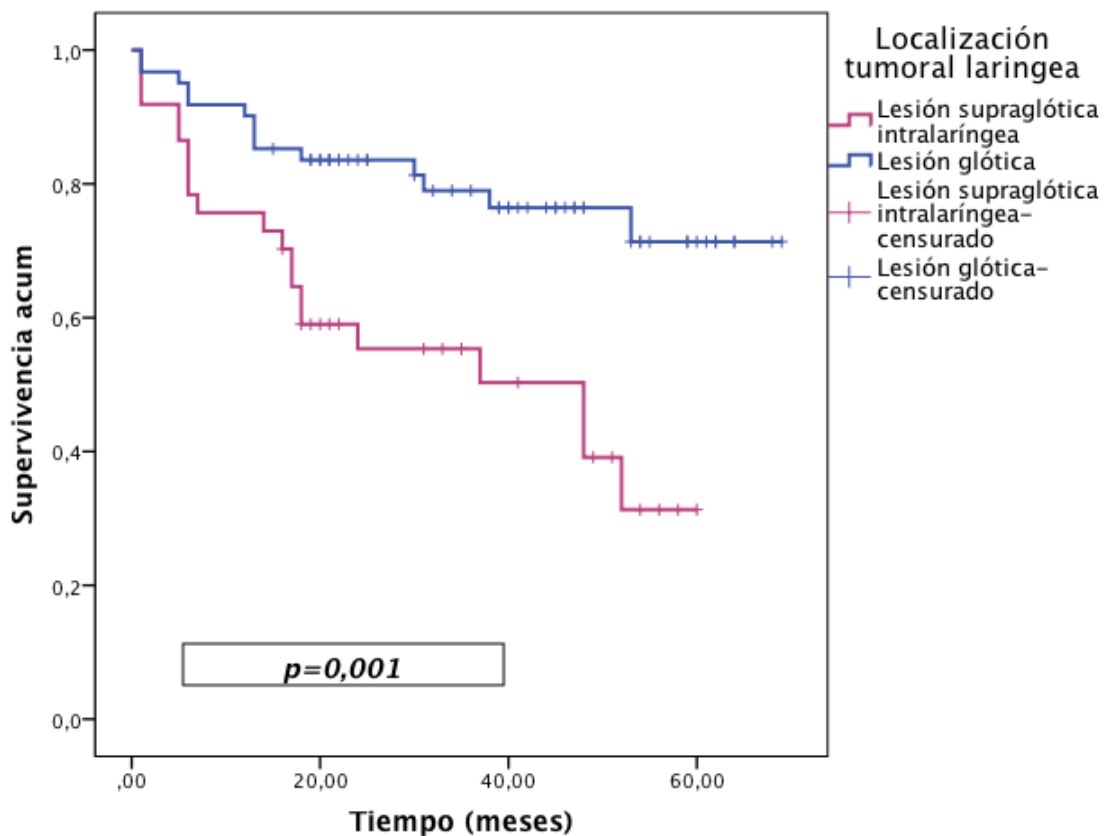


Tabla 90. Estimación media de la supervivencia global en función de la localización tumoral laríngea.

		Media		
		Intervalo de confianza al 95%		
Localización tumoral	Estimación	Error Típico	Límite inferior	Límite superior
Laríngea				
Localización Supraglótica	34,76	3,95	27,03	42,51
Localización Glótica	55,74	3,11	49,64	61,84

Según el modelo de Log-Rank, suponiendo tendencia lineal, se apreciaron diferencias significativas entre los grupos de localización tumoral laríngea ($p=0,001$).

Estadio Tumoral

Análisis de la SG según el estadio tumoral

De la misma manera, el análisis de supervivencia de la muestra se realizó mediante el método de Kaplan-Meier para los diferentes estadios tumorales (estadio I, estadio II, estadio III, estadio IV), apreciándose diferencias significativas en las estimaciones de supervivencias en los diferentes grupos, tal y como se observa en la siguiente Figura:

Figura 100. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la supervivencia global en función del estadio tumoral. ($p=0,001$).

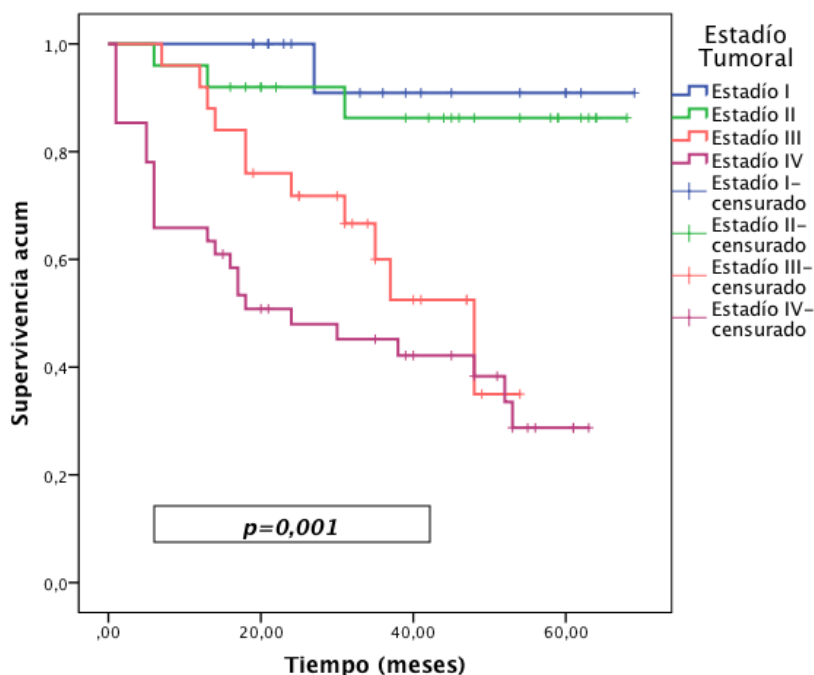


Tabla 91. Estimación media de la SG en función del estadio tumoral.

		Media		
		Intervalo de confianza al 95%		
Estadio Tumoral	Estimación	Error Típico	Límite	
			Límite inferior	superior
Estadio I	65,18	3,64	58,04	72,31
Estadio II	61,19	3,68	53,97	68,41
Estadio III	38,28	3,49	31,43	45,13
Estadio IV	31,27	4,04	23,34	39,20

Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos utilizando el método Log Rank (Mantel Cox), se apreciaron diferencias significativas ($p=0,001$) para la SG de los distintos estadios tumorales.

Análisis de la SG en función del estadio tumoral agrupado (precoz y avanzado)

Se apreciaron diferencias en las curvas de Kaplan Meier para la SG, así como un valor estadísticamente significativo utilizando el método Log-Rank para comparación entre los dos grupos ($p=0,001$).

Figura 101. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función del estadio tumoral agrupado (precoz y avanzado). ($p=0,001$).

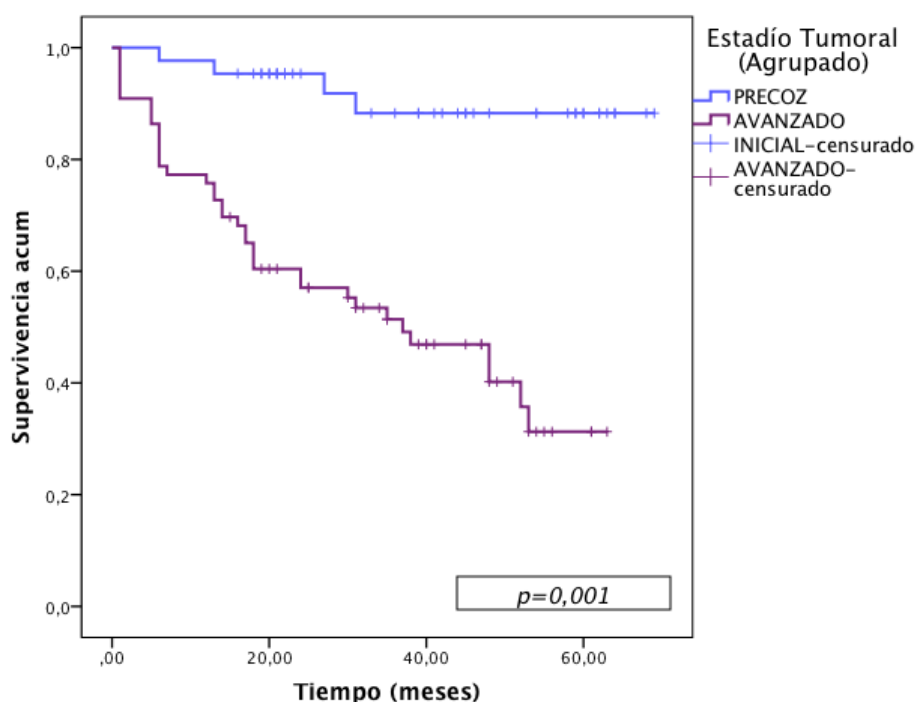


Tabla 92. Estimación de la SG en estadios iniciales en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	97,7%	0,023	1	42
24	95,3%	0,32	2	41
36	88,3%	0,057	4	25
48	88,3%	0,057	4	25
73	88,3%	0,057	4	25

Tabla 93. Estimación de la SG en estadios avanzados en función del tiempo en meses.

Tiempo (meses)	Estimación	Error Típico	Nº casos acumulados	Nº casos que permanecen
12	75,8%	0,053	16	50
24	60,4%	0,060	26	39
36	57,0%	0,062	29	31
48	46,9%	0,065	33	21
63	31,3,3%	0,079	37	7

En las Figuras 102 y 103 se muestran las gráficas de Kaplan-Meier correspondientes a la SG en función de la localización laríngea (estratificada por estadios).

Figura 102. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función del estadio tumoral y la localización tumoral laríngea supraglótica ($p=0,012$), y la localización tumoral laríngea glótica ($p=0,005$).

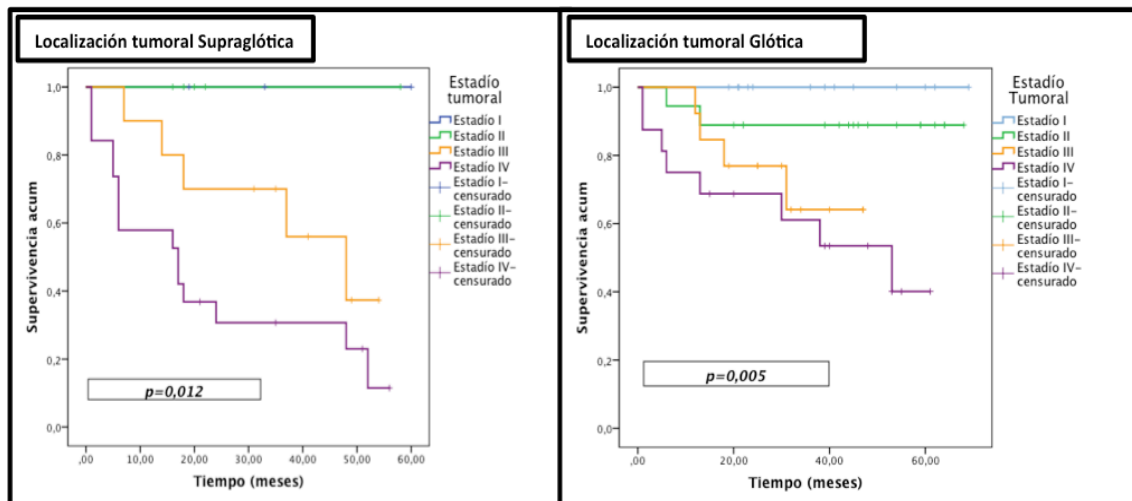
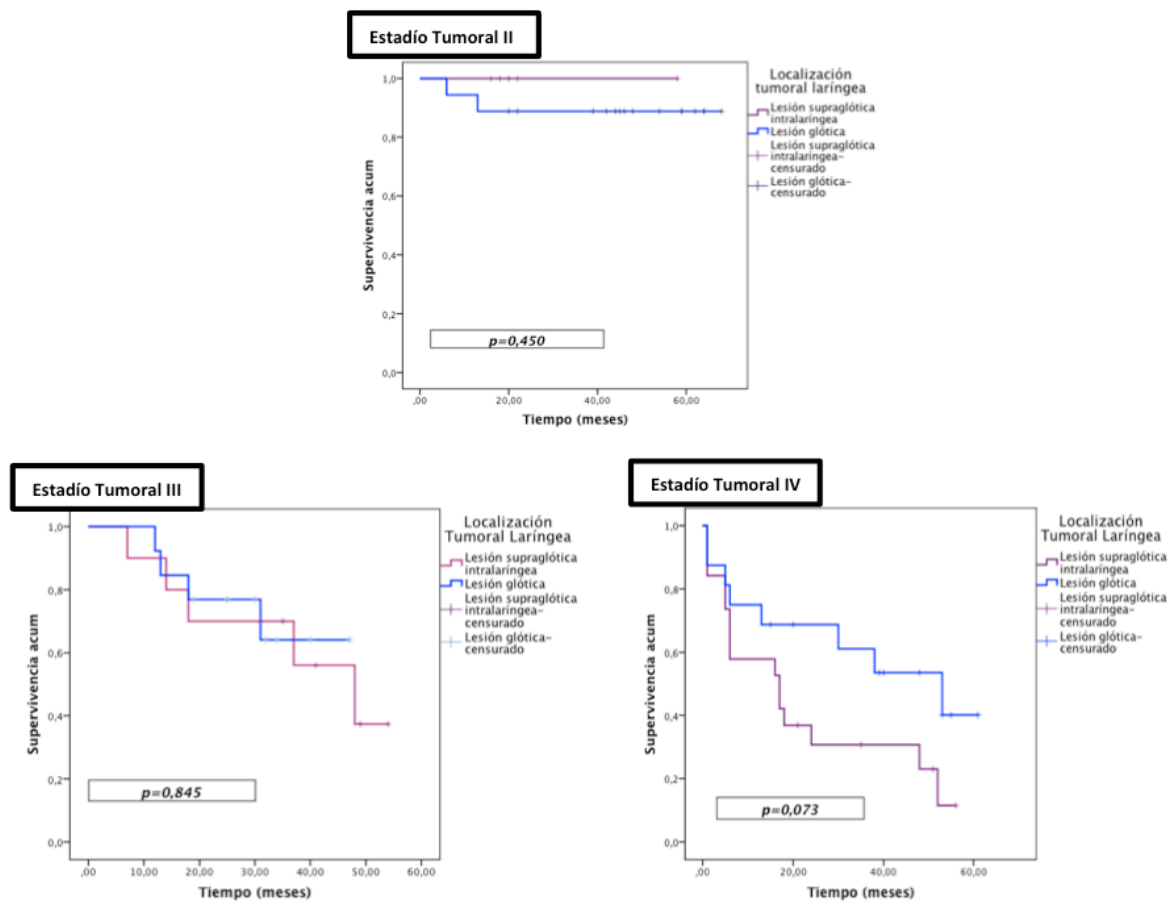


Figura 103. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la comparación de la SG en las diferentes localizaciones tumorales glóticas y supraglóticas en función de los estadios II, III y IV ($p=0,450$; $0,845$; $0,073$).



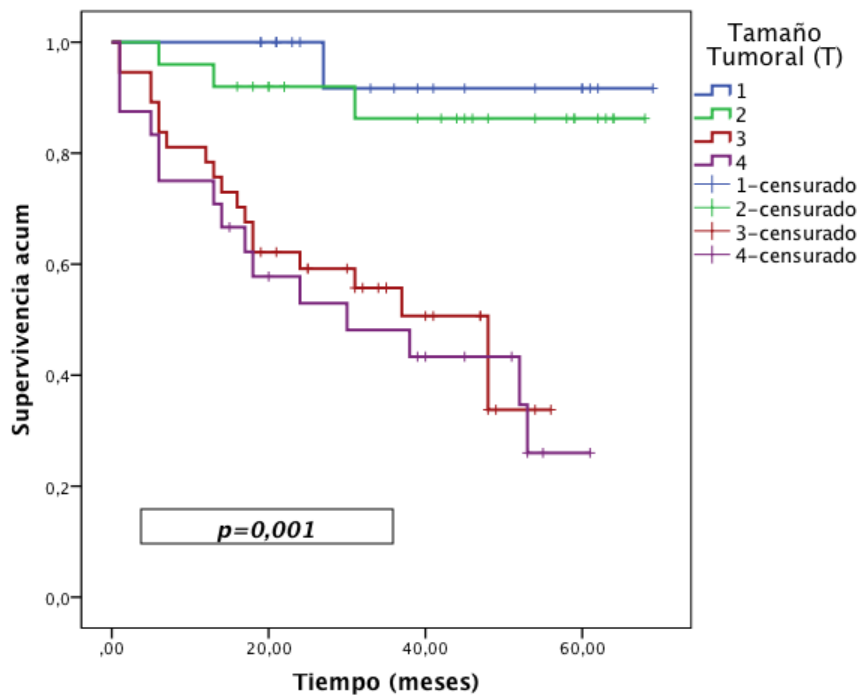
Tamaño tumoral

Análisis de la SG en función del TNM

Tamaño tumoral (T)

Se realizó el análisis de supervivencia de la muestra mediante el método de Kaplan-Meier para los diferentes grupos en función del tamaño del tumor primario (T1; T2; T3; T4), apreciándose diferencias significativas en las probabilidades de SG en los diferentes grupos, tal y como se aprecia en la Figura 104.

Figura 104. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función del tamaño tumoral (T1; T2; T3; T4), ($p=0,001$).

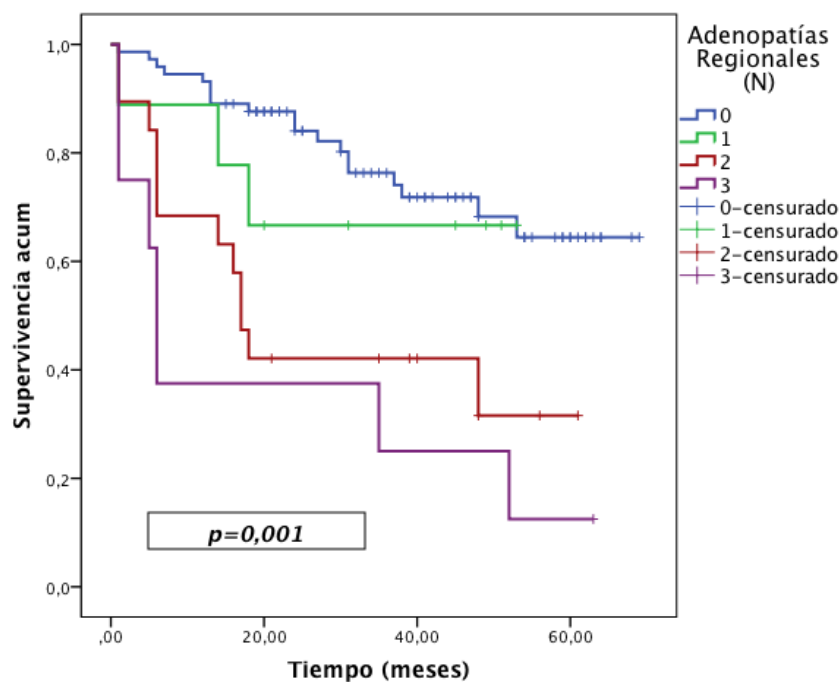


Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos utilizando el método Log Rank (Mantel-Cox), se apreciaron diferencias significativas ($p=0,001$) para la supervivencia de los distintos grupos.

Adenopatías regionales (N)

Se realizó el análisis de supervivencia de la muestra mediante el método de Kaplan Meier para los diferentes grupos en función del número y tamaño de las adenopatías cervicales (N0, N1, N2, N3), apreciándose diferencias significativas en las probabilidades de SG en los diferentes grupos, tal y como se aprecia en la Figura 105.

Figura 105. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a la SG en función de la variable adenopatías regionales (N0; N1; N2; N3), ($p=0,001$).



Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos utilizando el método Log Rank (Mantel-Cox), se apreciaron diferencias significativas ($p=0,001$) para la supervivencia de los distintos grupos.

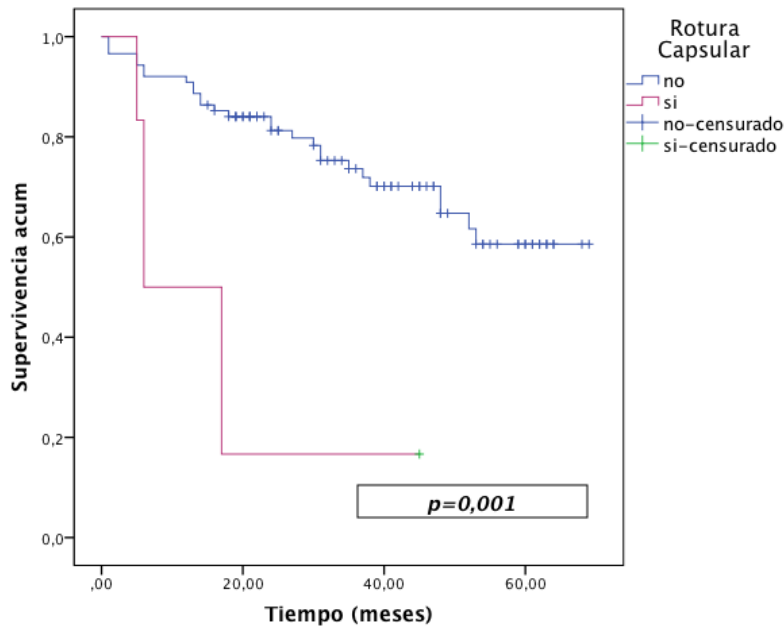
Tabla 94. Relación de proporciones de SG entre las variables T y N.

Tiempo Meses	Tamaño Tumoral (T)				Adenopatías Regionales (N)			
	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3
24	100%	92,0%	55,7%	26,0%	87,6%	66,7%	42,1%	12,5%
36	91,7%	86,3%	33,8%	26,0%	76,3%	66,7%	31,6%	
69	91,7%	86,3%			64,4%	66,7%		

Rotura capsular adenopática

Siguiendo la metodología de Kaplan-Meier, se efectuó el análisis de la SG en función de la presencia o ausencia de rotura capsular ganglionar. Figura 106.

Figura 106. Gráfico de Kaplan Meier, correspondiente a la supervivencia global en función de la presencia o ausencia de rotura capsular. ($p=0,001$).



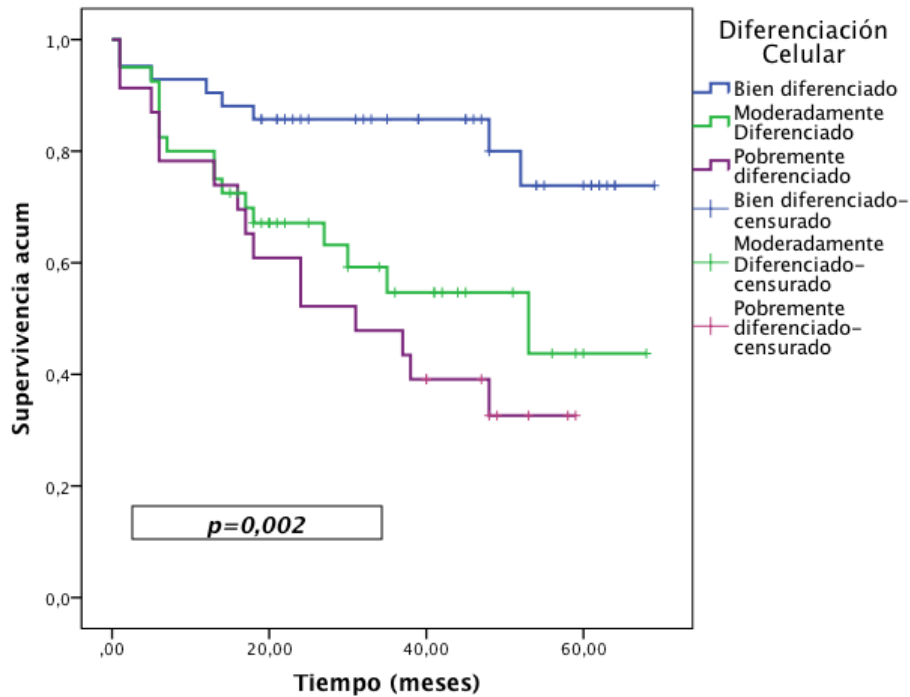
Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos utilizando el método Log Rank (Mantel Cox), se apreciaron diferencias significativas ($p=0,001$) para la SG entre los dos grupos anatomopatológicos.

Análisis de la SG en función de los criterios anatomopatológicos

Diferenciación celular

A través del método de Kaplan-Meier realizamos el análisis de la SG, estableciéndose diferencias significativas en la probabilidad de SG en función de la diferenciación celular anatomopatológica (G1, G2, G3).

Figura 107. Gráfico de Kaplan Meier, correspondiente a la supervivencia global en función de la diferenciación celular anatomopatológica.($p=0,002$).



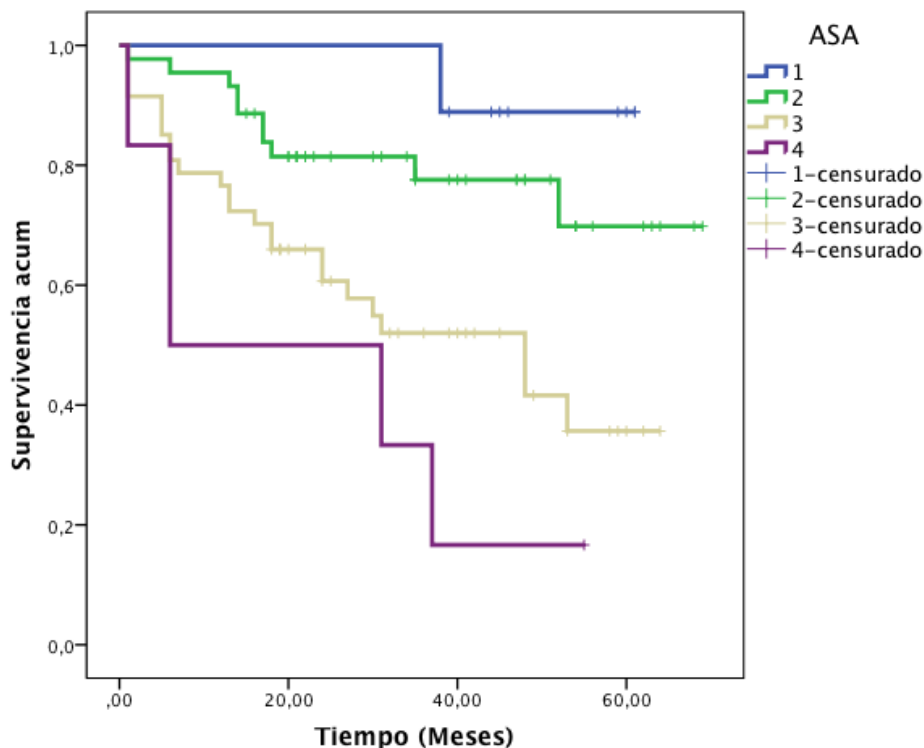
Mediante el estudio no paramétrico de la comparación de los diferentes grupos utilizando el método Log Rank (Mantel-Cox), se apreciaron diferencias significativas ($p=0,002$) para la SG entre los tipos celulares anatomopatológicos.

Clasificación anestésica ASA

Análisis de la supervivencia global según la clasificación ASA

Se realizó el análisis de supervivencia de la muestra mediante el método de Kaplan-Meier para las diferentes categorías ASA (I, II, III, IV), apreciándose diferencias significativas en las probabilidades de supervivencias en los diferentes grupos, tal y como se aprecia en la siguiente Figura:

Figura 108. Gráfico de Kaplan Meier, correspondiente a la supervivencia global en función de la clasificación anestésica ASA. (p=0,001)

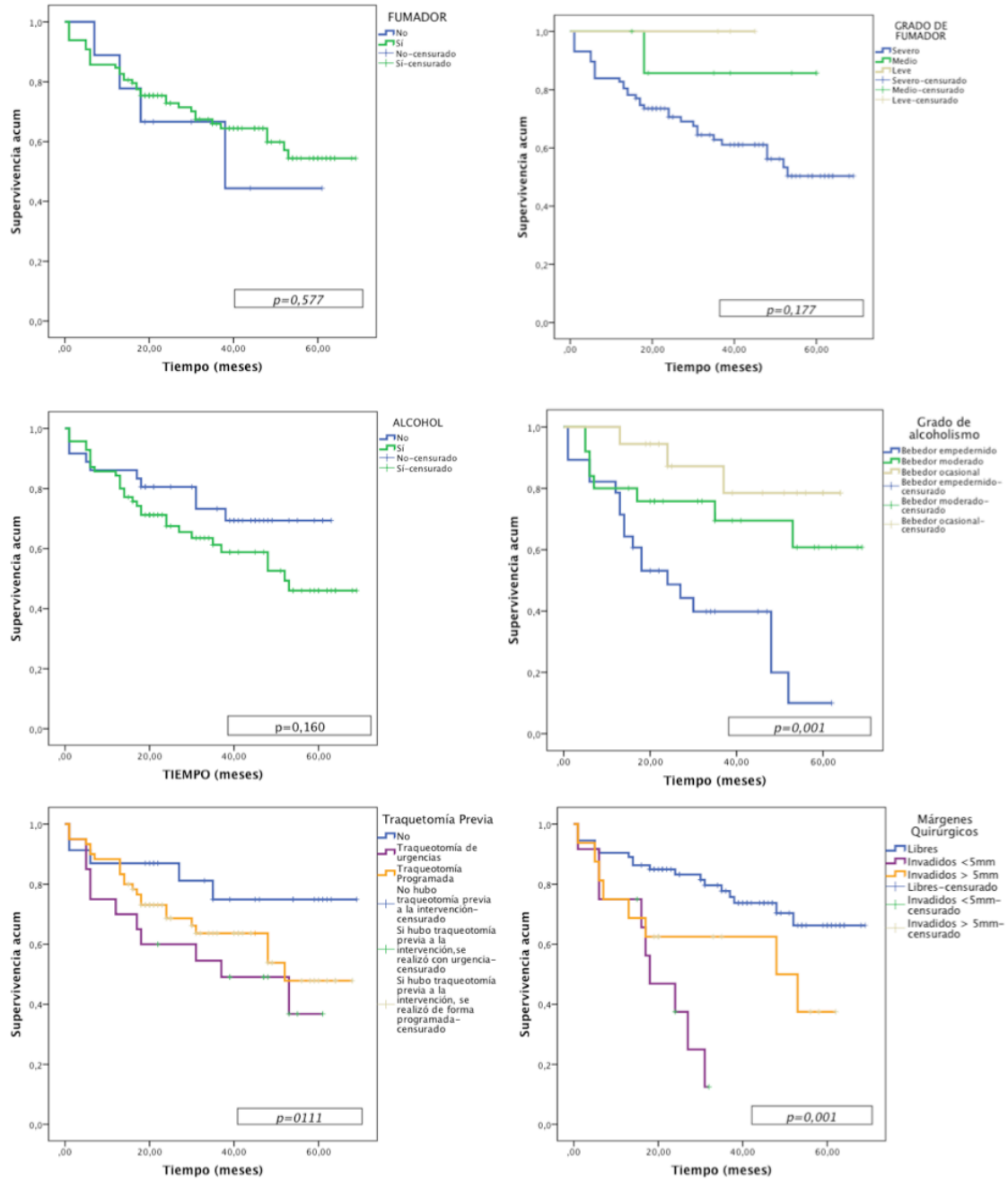


Los pacientes que presentaban mayor riesgo en la clasificación anestésica, es decir, aquellos con más patologías asociadas al tumor primario inicial, mostraron una menor SG (como factor independiente) con una significación estadística (p=0,001) mediante el análisis Log Rank.

Otros análisis de la SG.

En la siguiente Figura se refleja el análisis de la SG mediante el método Kaplan-Meier, así como el nivel de significación estudiado por estratos para cada una de las variables (hábito tabáquico, grado de tabaquismo, hábito enólico, grado de enolismo, traqueotomía prequirúrgica y márgenes quirúrgicos) mediante el método no paramétrico de Mantel-Cox (Log-Rank). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus, con respecto a los sanos (p=0,676).

Figura 109. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a SG en función de las siguientes variables: hábito tabáquico, grado de tabaquismo, hábito enólico, grado de enolismo, traqueotomía prequirúrgica y márgenes quirúrgicos. Nivel de significación en función del modelo de regresión de Cox (Log-Rank).



4.4.2. Análisis univariante de la Supervivencia Libre de Enfermedad

Se realizó el análisis mediante el método de Kaplan-Meier y el nivel de significación por estratos mediante el método no paramétrico de Mantel-Cox (Log-Rank), para las siguientes variables: Tamaño Tumoral (T), adenopatías metastásicas cervicales (N), estadio tumoral, diferenciación celular anatomopatológica, tipo de tratamiento del órgano laríngeo y profundidad de los márgenes quirúrgicos. Figura 110 y 111.

Figura 110. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a SLE en función de las siguientes variables: Tamaño Tumoral (T), adenopatías metastásicas cervicales (N), estadio tumoral, diferenciación celular anatomopatológica y tipo de tratamiento del órgano laríngeo. Nivel de significación en función del modelo de regresión de Cox (Log-Rank).

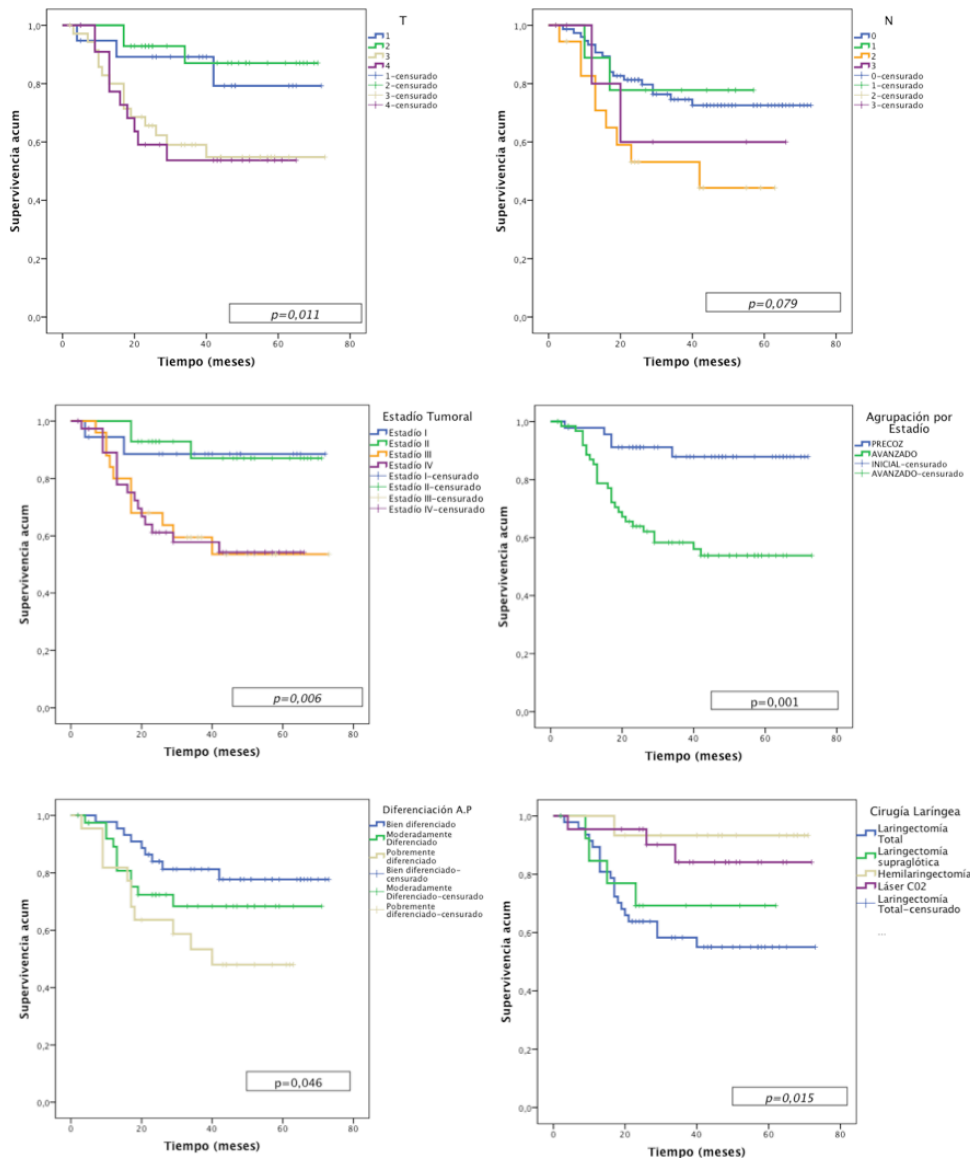
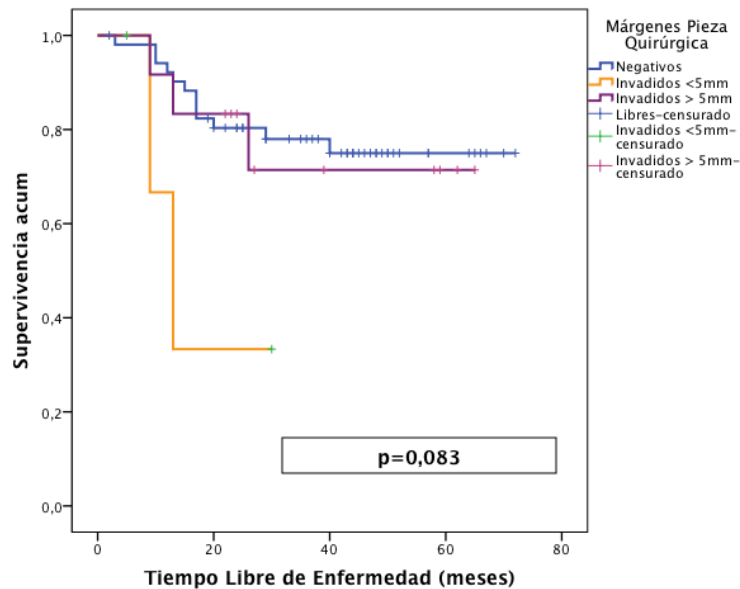


Figura 111. Gráfico de Kaplan-Meier, correspondiente a SLE en función de la profundidad de los márgenes quirúrgicos. ($p=0,083$).



En la Tabla 95 se muestran las relaciones entre las diferentes variables clínicas y la estimación de SLE expresada en meses.

Tabla 95. Relación entre la estimación probabilística de SLE expresada en meses y años, y las diferentes variables estudiadas.

Variables	12 meses (1 año)	24 meses (2 años)	60 meses(5años)
T1	89,2%	89,2%	79,3%
T2	100%	92,9%	87,1%
T3	82,9%	65,6%	54,8%
T4	90,9%	59,1%	53,7%
N0	98,7%	81,3%	72,6%
N1	88,9%	77,8%	77,8%
N2	82,6%	53,1%	44,3%
N3	80,0%	60,0%	
EI	94,4%	88,5%	88,5%
EII	92,9%	87,1%	87,1%
EIII	84,0%	68,0%	53,6%

EIV	89,0%	61,2%	54,2%
G1	95,5%	84,0%	77,7%
G2	97,4%	72,4%	68,4%
G3	81,8%	63,6%	48,1%
Láser CO ₂	92,3%	69,2%	69,2%
LT	89,0%	63,8%	58,3%
Hemilaringectomía	95,5%	90,0%	84,1%
Márgenes negativos	92,2%	80,0%	75,0%
Márgenes <5mm	66,7%	33,3%	
Márgenes >5mm	83,3%	83,3%	71,4%

4.4.3. Análisis Multivariante

Regresión de Cox para la SG

Para valorar el efecto de un número elevado de factores de riesgo sobre la SG, se empleó el análisis multivariado de Cox, introduciendo variables que se consideraron relevantes y que en el análisis univariante tuvieron una significación estadística con valor $p < 0,05$ (Tabla 96). Utilizamos el método “backward” o “hacia detrás” para ir eliminando en cada paso las variables que menos contribuían al ajuste del mismo, tras comprobar su significación mediante el índice de Wald (IW). Aquellas variables con $IW > 1,96$ se conservaron en el modelo por contribuir de forma significativa ($p < 0,05$).

Tabla 96. Resumen de las variables analizadas en el estudio multivariante.

Variable	Valor 0	Valor 1
º Comorbilidad ASA	I o II	III o IV
Diferenciación celular	Buena Diferenciación	Moderada o Pobre Diferenciación
Estadio Tumoral	EI o EII	EIII o EIV
Tamaño Tumoral	T1 o T2	T3 o T4

N	N0	N+
Localización Tumoral Primaria (LTP)	Laringe	Faringe
Localización laríngea primaria (LLP)	Glótica	Supraglótica
Análisis Sondas salivares SH	Agrupación I	Agrupación II

En la Tabla 97, se resume el resultado de las variables de la ecuación logarítmica de Cox, en función de las variables analizadas.

Tabla 97. Variables de la ecuación de Cox. (χ^2 Global; $p=0,001$).

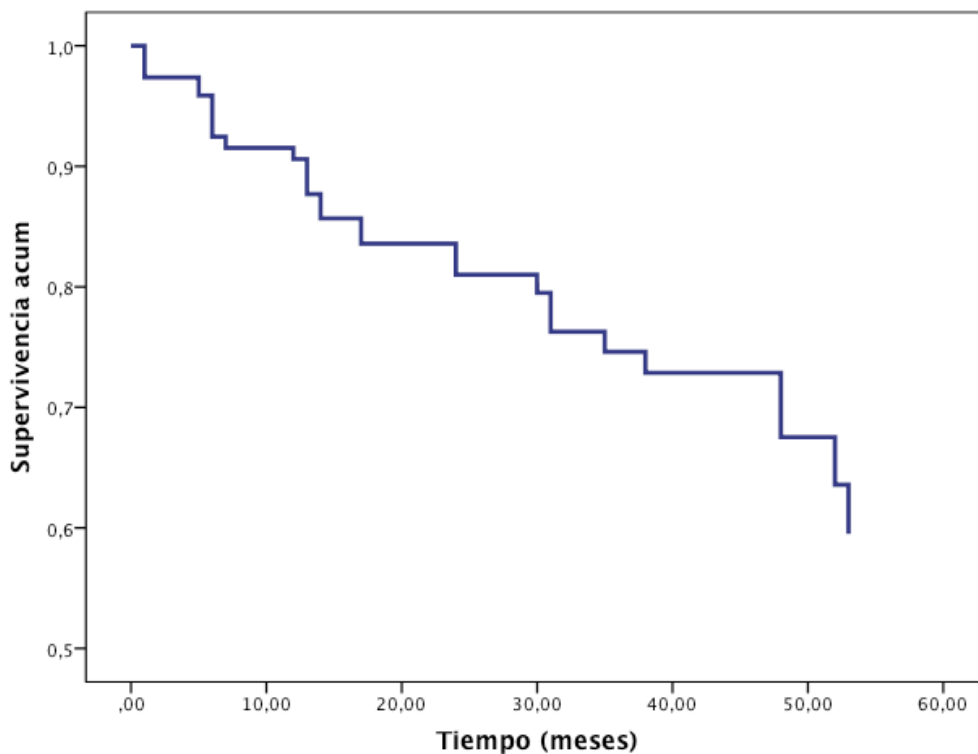
	Media de las covariables	B	ET	Wald	GI	Sig	Exp(B)
ASA	0,226	0,68	,52	3,16	1	0,31	3,05
DC	,613	0,90	,58	2,40	1	,0121	2,45
ET	,613	1,66	,78	4,54	1	0,033	5,30
T	,613						
N	,516	1,11	0,51	4,63	1	0,31	3,05
LTP	,048	0,68	,72	,90	1	0,34	1,90
LLP	,355	-0,23	,49	0,00			
SH	,613	0,72	,46	2,41	1	0,12	,48

Siguiendo el patrón de estudio mediante el método “backward” o “hacia detrás”, para ir eliminando en cada paso las variables que menos contribuían al ajuste del mismo, por tener un IW <1,96, obtuvimos el resultado final que se refleja en la siguiente Tabla y Figura.

Tabla 98. Variables de la ecuación final de Cox. (χ^2 Global; $p=0,001$).

	Media de las covariables	B	ET	Wald	Gl	Sig	Exp(B)
ASA	0,26	0,86	,43	3,93	1	0,047	2,37
ET	,63	1,62	,63	6,53	1	0,011	5,07
N	,50	1,63	,46	12,24	1	0,001	5,14
SH	,56	1,04	,39	6,53	1	0,008	3,33

Figura 112. Función de SG en media de covariables, tras el análisis multivariante.



Los pacientes con adenopatías metastásicas positivas (N+) incrementaron el riesgo de éxitus 12,24 veces sobre los pacientes con ausencia de adenopatías metastásicas (N0), tras la interpretación del Exp(B) que indica el ratio entre las distintas funciones de riesgo. Por lo tanto, se consideró la presencia de adenopatías metastásicas como la variable más influyente en la SG de los pacientes, seguida del estadio clínico, de la agrupación de las sondas salivares ABPP y de las comorbilidades según el estudio ASA.

5. Discusión

El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona

Aristóteles

5.1. Discusión acerca de los aspectos clínicos

Epidemiología del CECC. Sexo y edad

El cáncer epidermoide de cabeza y cuello se diagnostica, en la actualidad, con una frecuencia de más de 550.000 casos anuales en todo el mundo, según estimaciones realizadas por Jemal y cols., (2014). Europa es el continente más afectado, con una incidencia anual de 26 por cada 100.000 hombres y de 2,4 por cada 100.000 mujeres, siendo los tumores de localización faríngea los más frecuentes. El cáncer de laringe es el segundo, en frecuencia, tumor maligno del aparato respiratorio en el mundo, después del cáncer de pulmón y bronquios (American Cancer Society, 2006, en línea), representando el 1-2% de todos los tumores malignos del organismo (Martínez, 1992). Su incidencia varía entre los diferentes países, siendo mayor en Portugal, Francia, Italia y España, lugares donde oscila entre 20-40 casos al año cada 100.000 varones (Martínez y cols., 2002; IARC., 2002, Peng y cols., 2002).

En este trabajo no pretendemos realizar un estudio epidemiológico propiamente dicho, ya que no es la finalidad del mismo; tratamos de reflejar las tendencias clínicas que presentan los pacientes con CECC en nuestra área, con el fin de poder establecer un perfil más real y que nos permita mejorar la capacidad diagnóstica, predictiva y terapéutica.

En los CECC existe, de forma invariable, un claro predominio del sexo masculino sobre el femenino, en una proporción que varía según las citas: Busquets y cols. (2003) presentaron porcentajes del 84,5% de CECC para varones y del 15,5% para mujeres, con una media de edad de 64 años. Herrera-Gómez y cols. (2009) ofrecieron cifras de un 90,4% de afectación en sexo masculino, contra un 9,6% del femenino, para el cáncer de laringe. Estos datos se afianzan en otras citas bibliográficas (Rzewnicki y cols., 2013; Dequanter y cols., 2012; Silvestri y cols., 1992).

En nuestra serie, al igual que en la bibliografía consultada, la amplia mayoría de los pacientes pertenecían al sexo masculino (97,3%), frente a una minoría representada por el 2,7% restante, que correspondieron al género femenino, con una relación de hombre/mujer de 36 a 1. Es cierto que, independientemente de los datos publicados en nuestro trabajo, subjetivamente hemos percibido en los últimos años

una tendencia creciente en la frecuencia de estos tumores en el sexo femenino. Este aumento parece estar relacionado con la incorporación de la mujer al hábito tabáquico en las últimas décadas (Ellis y cols., 2012; Mora-Plana y cols., 2013). De Rienzo y cols. (1991) ya estudiaron este cambio de incidencia con una variación de la relación hombre mujer de 5,6:1 a 4,5:1 en un período de 15 años de estudio.

El CECC es más común en personas mayores y es, relativamente raro, en personas menores de 40 años (Lacy y cols., 2000; Gilroy y cols., 2005). En nuestro estudio, la media de edad de los pacientes es de 62,52 años, con una moda de 59, datos semejantes a los presentados por Busquets y cols. (2003) quienes observaron una media de edad de 64,0 años. El paciente más joven tenía 38 años y el mayor 87. La década que englobó a un mayor número de pacientes fue la comprendida entre los 60 y los 69 años de edad, al igual que reflejan otros autores como Cattaruzza y cols. (1996), Maier y cols. (1997) y, posteriormente, Markou y cols. (2013) para los que, alrededor del 70% de sus pacientes, estaban comprendidos entre la 6ª y 7ª década de la vida. En nuestro trabajo pudimos observar que esta franja de edad disminuyó hasta los 50-59 años en los tumores faríngeos y laríngeos de localización supraglótica.

Nosotros no consideramos esta variable, la edad del paciente, como criterio para la elección del tipo de tratamiento quirúrgico; no obstante, cuando se considera la radioterapia radical como una de las opciones terapéuticas válidas, ésta suele ser nuestra recomendación preferida, cuando el paciente tiene una edad muy elevada, frente a la opción quirúrgica, justificado por el hipotético efecto de inducción tumoral de la radioterapia sobre los tejidos de personas más jóvenes (tumor radioinducido), si bien no existe evidencia científica en la actualidad sobre este hecho.

Sintomatología y tiempo de evolución

Es más que conocida la estrecha relación entre el síntoma disfonía y el cáncer laríngeo de localización glótica. En nuestra serie, el síntoma más frecuente de consulta en nuestros pacientes es la disfonía, que representa el 75,9% de los síntomas de consulta, con un valor estadísticamente significativo entre este síntoma y la localización tumoral glótica ($p=0,001$). En otras citas bibliográficas (Kurtulmaz y cols., 1997; Bernal-Sprekelsen y cols., 2009) la disfonía aparece como un síntoma muy

frecuente de presentación en el cáncer de laringe, de forma global, oscilando entre el 50 y el 70%.

Los pacientes con tumores de hipofaringe suelen permanecer asintomáticos durante largos períodos de tiempo, por lo que la consulta al médico se retrasa y el diagnóstico se suele realizar en estadios más avanzados de la enfermedad. En esta localización, la disfagia y la odinofagia constituyen la sintomatología más frecuente y común de presentación. En nuestro estudio, los pacientes que acudieron a nuestra consulta por motivos diferentes a disfonía, presentaron disfagia (27,7%) y odinofagia (26,8%). Estos síntomas se relacionaron de forma directa con la presencia de tumores en la región supraglótica laríngea e hipofaríngea.

La mayoría de los pacientes reflejados en nuestro trabajo (52,1%) tardaron en acudir a nuestra consulta especializada entre 12 y 35 semanas desde la aparición del primer síntoma (3-9 meses), lo que podría estar relacionado con el alto porcentaje de pacientes que se diagnosticaron en estadios avanzados de la enfermedad. Consideramos elevado el tiempo medio de consulta de nuestros pacientes, sobre todo por la concienciación social que existe con el síntoma disfonía en pacientes de alto riesgo con hábito tabáquico y mayores de 50 años. Nuestro hospital, al ser una referencia para toda la región, recibe pacientes de todas las áreas sanitarias; este hecho puede condicionar este amplio intervalo de tiempo, sobre todo en pacientes que residen en zonas rurales alejadas de centros de atención especializada. Merino (1991) comprobó, respecto al tiempo de retraso en la primera consulta y en nuestra misma comarca, tiempos con intervalos menores a 4 meses en el 46,4% de los pacientes. Otros compañeros, por ejemplo, en Albacete Masegosa (2014) menciona un retraso de más de 2 meses entre la aparición de la sintomatología y la consulta al especialista.

Hábitos tóxicos. Tabaco y alcohol

El tabaco, inhalado de forma activa en pipa o en cigarrillo, se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de CECC, según un estudio publicado por la International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium (IHANCEC, en línea); además, es el factor de riesgo más importante para el cáncer y más de 50

enfermedades (Wish y cols., 2013). Se han identificado en el humo del tabaco más de 5.300 componentes, de los cuales, al menos 70 son cancerígenos. Bien es conocida la estrecha relación que se ha mantenido a lo largo de los años entre cáncer de laringe y pacientes varones con hábitos tabáquicos asociados. Para Moya-Plana (2013) el cáncer de laringe sigue estando vinculado fuertemente al sexo masculino y al hábito tabáquico, si bien su ocurrencia está aumentando en el sexo femenino en paralelo con el incremento del número de mujeres fumadoras. En una revisión reciente de 30 estudios (Vineis y cols., 2006), se estimó el riesgo relativo de cáncer de laringe, con una incidencia 10 veces superior en pacientes consumidores habitualmente de tabaco. Según distintas series, en tumores CECC el uso habitual de hábito tabáquico es descrito en el 88,1%, mientras que el alcohólico en el 79,8%, respectivamente (Busquets y cols., 2003).

En nuestro trabajo, el 91,8% de los pacientes referían un hábito tabáquico, siendo el 85,6% de los mismos consumidores de forma severa. Tan sólo el 8,2% de nuestros pacientes no presentaban hábito tabáquico habitual; en otras series (Baron y cols., 1993), del 5 al 30% de pacientes con CECC nunca habían sido fumadores, lo que nos obliga a buscar su asociación con otros agentes, tales como la inhalación de humos procedentes del diesel y la inhalación pasiva del tabaco, entre otros (Vassileiou y cols., 2012).

Resulta interesante la relación encontrada en nuestra serie entre el consumo de tabaco y el estadio tumoral; pacientes con hábitos leves y moderados se relacionaron con estadios precoces, con una significación estadística ($p=0,004$), mientras que los pacientes con hábito severo lo hicieron con estadios avanzados. Almeida y cols. (2014) encontraron relación estadísticamente significativa entre enfermedad de CECC en estadio avanzado y el número de cigarrillos fumados por día ($p=0,011$).

En nuestra trabajo, no se cuantificó el número de pacientes que continuaron fumando después del tratamiento pero, a día de hoy, sabemos que continuar con este hábito tóxico contribuye a un mayor riesgo de complicaciones durante el tratamiento y al desarrollo de posibles recaídas y de un segundo tumor primario (Toll y cols., 2013; Gritz y cols., 1993).

Con respecto al hábito alcohólico, el 66,4% de nuestro pacientes presentaron hábito alcohólico de forma habitual, considerándose consumidores empedernidos al 39,2% de los mismos. Otros autores refieren cifras semejantes, Quer y cols. (2001) observaron que el 85,5% de sus pacientes eran bebedores; Martínez-Alvarez y cols. (1996) el 87% y otros como Chen y cols. (2001) aportan cifras del 60%.

Se encontró significación estadística en la asociación entre hábito enólico y localización laríngea del tumor primario en la región supraglótica e hipofaríngea ($p=0,010$), en concordancia con otros autores (Hashibe y cols., 2007; Du y cols., 2012). Esta asociación puede estar relacionada con el contacto directo del alcohol, como sustancia irritante, con la mucosa de la hipofaringe y laringe supraglótica.

Antecedentes personales y patologías previas

Los pacientes con CECC son considerados potencialmente como de alto riesgo, debido a las comorbilidades preexistentes relacionadas con patologías cardíacas, pulmonar y hepática asociadas, añadidas al deterioro físico frecuentemente asociado. La comorbilidad y el estado funcional son medidas habitualmente utilizadas para evaluar el estado general de los pacientes con cáncer. En nuestro Servicio de Otorrinolaringología, a diferencia de otros como oncología médica y radioterápica, no se realiza la escala del “Eastern Cooperative Oncology Group” (ECOG), ni el “Índice de comorbilidad de Charlson” (ICC) para evaluar el estado de funcional y la comorbilidad de los pacientes. En detrimento de estas escalas, nos basamos en la clasificación de la “American Society of Anesthesiologist” (ASA), que estima el riesgo que plantea la anestesia para los distintos estados del paciente según su morbilidad asociada.

La mayoría de pacientes de nuestra serie se clasificaron como riesgo anestésico igual o mayor a II (90,8%). Encontramos diferencias significativas (Log Rank, $p=0,001$) en la SG, mediante el método de Kaplan-Meier, entre los pacientes que presentaron diferentes puntuaciones en la clasificación ASA. En CECC, hay escasez de literatura que aclare el valor pronóstico individual de la comorbilidad asociada. La asociación entre comorbilidad y reducción de la supervivencia en CECC ha sido documentada en varios estudios (Piccirillo y cols., 2000; Datema y cols., 2010). Fueron Wang y cols. (2014) los que mostraron diferencias pronósticas en la predicción de la SG en función de las

puntuaciones en las escalas ECOG e ICC. Singh y cols. (1998) presentaron cifras del 30% de pacientes afectados de comorbilidad moderada-severa y recomendaron dado su valor añadido sobre la predicción de la supervivencia, añadir este criterio a los sistemas de clasificación actuales.

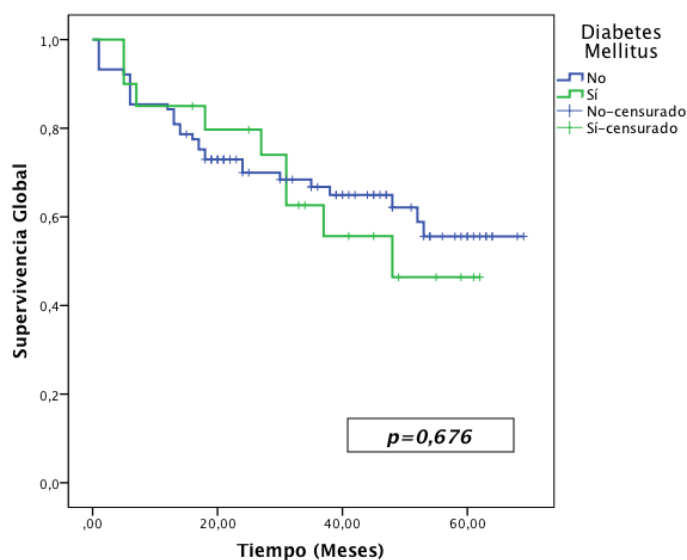
La cuantificación de la “Colinestrasa en suero” es utilizada de forma habitual por los médicos anestesiólogos para el estudio preoperatorio, ya que durante la anestesia se suelen utilizar fármacos con succinilcolina que pueden afectar al sistema nervioso. Morera y cols. (2007) identificaron niveles bajos de esta actividad enzimática y señalaron que este dato podría relacionarse con malignidad tumoral, apuntando un interés en objeto de estudio para futuras líneas de investigación. Según nuestra experiencia y, en función de los datos recogidos, no creemos que los niveles encontrados en suero tengan relación con los niveles en saliva ni en tejidos.

En este trabajo la patología clínica de base asociada más frecuente fue la respiratoria y, de forma más concreta, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), identificada en el 32,7% de los pacientes. Le siguen en frecuencia la patología cardíaca, la hipertensión arterial y la diabetes. Consideramos baja la cifra de pacientes con diagnóstico de EPOC en comparación con la literatura revisada (42,2%, Masegosa, 2014; 73,15%, Martínez Capoccioni, 2010 y 49,8% de patología pulmonar y digestiva según Martínez-Berganza y cols., 1998), probablemente relacionada con el infradiagnóstico por falta de consulta médica, ya que la gran mayoría eran pacientes con hábito tabáquico crónico. Pocos pacientes identificamos en nuestra serie (5,3%) con patología de RGE. Zhang y cols. (2014) realizaron un metaanálisis en el que encontraron asociación significativa entre el RGE y el cáncer de laringe, pero no con el cáncer de faringe. Otras citas clásicas no encuentran dicha asociación (Coca Pelaz y cols., 2013). Actualmente se está estudiando la posible asociación entre la gastritis crónica por *Helicobacter Pylori* y el carcinoma epidermoide de laringe. Burduk (2013), concluye que el *gen cagA de Helicobacter Pylori* está presente en el tejido de la laringe, considerándose un posible carcinógeno en su desarrollo; además, su presencia disminuye significativamente la tasa de SG y aumenta las posibilidades de recidiva de la enfermedad.

El 17,7% de los pacientes estaban diagnosticados de diabetes mellitus tipo I o II. Encontramos una tendencia hacia la menor supervivencia a partir de los 25 meses de

evolución en los pacientes con diagnóstico de diabetes mellitus, con respecto a los que no, sin poder establecer una relación estadísticamente significativa entre ambos ($p=0,676$). A su vez, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia de diabetes mellitus y complicaciones postquirúrgicas ($p=0,844$). Jovanovic y cols. (2006) realizaron un estudio retrospectivo con 69 pacientes, a fin de analizar los factores de riesgo de morbilidad postoperatoria después de la cirugía laríngea, comparando los pacientes con diabetes mellitus y los pacientes no diabéticos. El índice de infecciones secundarias de la herida (88,9%) y de fístulas faringocutáneas (44,5%) tuvo una tasa significativamente mayor en los pacientes diabéticos ($p < 0,001$); con estos resultados confirmaron que la diabetes mellitus era un importante factor clínico general independiente, que aumentaba la morbilidad postoperatoria y el tiempo de hospitalización en la cirugía de la laringe.

Figura 113. Kaplan-Meier, correspondiente a la SG de los pacientes de nuestra serie con diagnóstico de diabetes mellitus, con respecto a los sanos ($p=0,676$).



Agregación familiar

En nuestra serie, en la mayoría de los pacientes (77,6%) no se encontraron antecedentes tumorales familiares de interés. Un 3,5% de los pacientes refirieron antecedentes próximos con algún vínculo de sangre con cáncer laríngeo y un 17,9%

con cáncer no laríngeo. En un estudio reciente, Turati y cols. (2014) evidenciaron asociaciones significativas entre cáncer oral y faríngeo con antecedentes familiares de pacientes con cáncer de laringe (riesgo relativo: 3.3). Para otros autores, como Li y cols.(2009) y Garavello y cols. (2012) la historia familiar de malignidad es un factor de riesgo independiente para la aparición del cáncer de laringe. Negri y cols. (2009), tras un análisis de casos y controles, confirmaron un aumento del riesgo de CECC en parientes de primer grado, especialmente cuando se trataba de hermanos frente a padres. Esta asociación pareció ser más fuerte cuando se trataba de la laringe e hipofaringe sobre la orofaringe.

Localización Tumoral Primaria

Describimos la localización anatómica laríngea como la más frecuentemente afectada por los carcinomas epidermoides en nuestra muestra (87,5%), seguida de la faríngea (9,0%). Estos datos, respecto a las distintas localizaciones, no los podemos considerar con valor de estudio epidemiológico, aunque la incidencia es equiparable a los porcentajes ofrecidos en multitud de referencias bibliográficas. Como decíamos al inicio de la discusión, si bien coinciden realmente los datos epidemiológicos con los referenciados en otros estudios, los pacientes estudiados tienen unas particularidades que describimos a continuación y que nos permiten el estudio descriptivo observacional para darle valor epidemiológico, a saber:

a). La gran mayoría de pacientes incluidos están diagnosticados en estadio avanzado de enfermedad tumoral faríngea; en estos estadios, el tratamiento recomendado, según las guías (NCCI, en línea), es la combinación de QT y RT, en cualquiera de sus modalidades y combinaciones, sin necesidad de realizar cirugía o sólo cuando no haya respuesta al tratamiento inicial (la cirugía es un criterio de inclusión en nuestro estudio), y

b). Los pocos pacientes que requieren tratamiento mediante intervención quirúrgica son tratados de forma indistinta, compartidos por los Servicios de Otorrinolaringología y Cirugía Maxilofacial.

Los tumores de hipofaringe representaron el 6,2% del total de nuestra serie. Como apreciamos en la literatura, los carcinomas escamosos de la hipofaringe son

mucho menos frecuentes que en otras localizaciones de cabeza y cuello, mostrando aproximadamente del 3 al 5% del total (Hall y cols., 2008; Cooper y cols., 2009).

Atendiendo a la localización laríngea propiamente dicha, los tumores de localización glótica fueron los más frecuentes (61,5%), seguidos de los carcinomas de localización supraglótica con el 35,6% y los de localización subglótica con el 2,9%. Volvemos a repetir que nuestro trabajo no pretende ser un estudio estrictamente epidemiológico, ya que la selección de los pacientes se estableció en base a unos criterios de inclusión y exclusión preconcebidos y alejados de los estrictamente demográficos, con el fin de obtener resultados representativos para el conocimiento de los pacientes de nuestra área de salud. Los datos bibliográficos epidemiológicos son dispares y varían en función del continente geográfico estudiado. Clásicamente, la localización glótica se ha visto más afectada que la supraglótica, excepto en determinados países latinoamericanos y mediterráneos, en los que se invierte esta cifra (Lechuga y cols., 2005; Zapater y cols., 2000). Este predominio ha cambiado en los últimos años en nuestro medio. Si bien, inicialmente, los cánceres supraglóticos eran más frecuentes que los glóticos, se observó que a partir de los años ochenta se produjo un cambio significativo a partir del cual y, hasta prácticamente la actualidad, las neoplasias de glotis son más frecuentes que las de supraglotis en España (Tamarit y cols., 2007); datos corroborados por Lechuga y cols. (2005), que reflejan entre el 60-65% de casos de localización glótica, respecto al 30-35% de localización supraglótica y el restante 5% subglóticos en los últimos 10 años. Para Rzewnicki y cols., (2012), en su estudio epidemiológico de cáncer de laringe desde 1988 hasta 2012, el sitio anatómico más frecuente de localización del tumor primario, fue la zona supraglótica de la laringe (48,0%) y su estadio clínico fue T3 (33,5%). Silvestri y cols. (1992) estudiaron 432 casos con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide de laringe. El cáncer supraglótico fue el más frecuente diagnosticado con un 44,4%, seguido muy de cerca del cáncer glótico con un 42,12%. En la serie descrita por Bien y cols. (2008), la localización predominante en las tumoraciones laríngeas, estaba en la región glótica (47,2%), seguida de la región supraglótica (40,3%) y la hipofaríngea (7,8%), tal y como se ilustra en la Figura 114.

Clásicamente se ha relacionado nuestra zona geográfica mediterránea con tumores laríngeos de localización supraglótica, como hemos mencionado

anteriormente. Merino (1991) describió en su Tesis Doctoral la localización laríngea supraglótica como la más frecuente, con un porcentaje del 67,3%, en nuestra misma área de salud (Murcia Oeste). Encontramos datos de la década de los ochenta (González y cols., 1986) que muestran resultados similares a los de Merino con porcentajes de carcinomas supraglóticos que rondan el 65%. En las últimas series revisadas (Tamarit y cols., 2007; Lechuga y cols., 2005), se ponen de manifiesto el predominio de los tumores glóticos sobre los supraglóticos en los países mediterráneos en los últimos años.

No debemos omitir un dato importante que puede condicionar sesgos en cuanto a la determinación del origen primario de los tumores laríngeos. A pesar de los avances en las ópticas y en los métodos diagnósticos en general, en determinados tumores en estadios avanzados gloto-supraglóticos (transglóticos), no es posible determinar, ni clínica ni histopatológicamente, su origen real. Maier y cols. (1997) determinaron que el porcentaje de casos en los que no se puede diferenciar claramente entre cánceres supraglóticos y glóticos fue del 34,1%. Coincidimos con la opinión de Tamarit y cols. (2007) y pensamos que la tendencia a clasificar como supraglóticos tumores cuyo origen no es posible determinar, pudo influir en la tendencia clásica de la preponderancia de los tumores supraglóticos.

Figura 114. Distribución de las localizaciones tumorales faringolaríngeas, en tumores con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma epidermoide. Bien y cols. (2008).

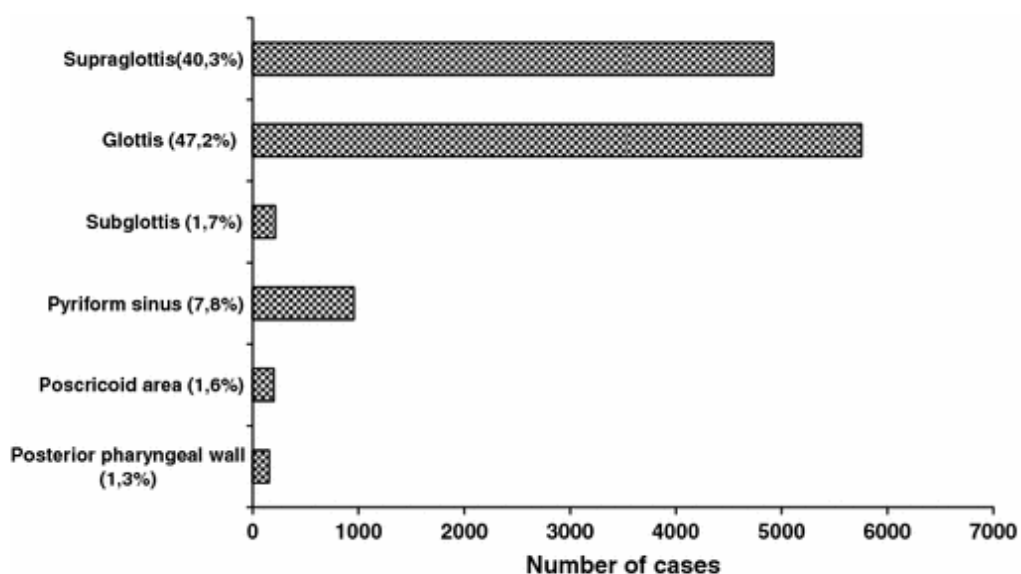


Tabla 99. Tendencia del cáncer epidermoide laríngeo (exclusión de subglóticos), en nuestro país a lo largo de las tres últimas décadas.

Autor	Glottis	Supraglottis	Año
González	32,4%	64,8%	1986
Merino	30,8%	67,3%	1991
Lechuga	60-65%	30-35%	2005
Tamarit	52,29%	44,7%	2007
Pelegrín	61,5%	35,5%	2015

El 3,6% de los tumores seleccionados en nuestra serie, se correspondieron con carcinomas epidermoides en metástasis ganglionares de origen desconocido (MOD); se definen como la presencia de una enfermedad ganglionar maligna confirmada en una biopsia, cuyo origen primario no se ha podido establecer a pesar de los estudios complementarios físicos y radiológicos realizados. Según citas bibliográficas (Johansen y cols., 2009; Fogarty y cols., 2003), representan del 1 al 3% de todos los CECC y entre el 2 y el 10% de todas las metástasis cervicales.

Clasificación TNM y Estadio Tumoral

En nuestra serie, de forma global, se apreció que el tamaño o extensión local ("T" en la clasificación clínica TNM) se etiquetó como un T3, en el 34,3% de los casos. Cuando agrupamos todos los tumores estudiados y diagnosticados como T3 y T4, representaban una cifra del 56,4%, y todos estos son considerados tumores avanzados en la clasificación TNM, también llamados "T avanzados". Carrasco y cols. (2007) presentaron cifras parecidas en una serie similar en la que el 83,4% de los tumores fueron diagnosticados como pT3-T4. Nuestros datos concuerdan con otros autores, por ejemplo, Merino y cols. (1994), Dalmau y cols. (1996) quienes evidenciaron el grupo T3 como la forma de presentación clínica más frecuente en el diagnóstico de cáncer faringolaríngeo, en los pacientes estudiados en el área geográfica del mediterráneo y sureste de España.

Atendiendo a la relación entre la localización tumoral primaria y la clasificación T, apreciamos una relación significativa entre tumores de localización laríngea supraglótica e hipofaríngea con el tamaño tumoral avanzado T3 (56,8%) y T4 (57,1%), respectivamente; asimismo, los tumores de localización glótica, en el momento del diagnóstico, se relacionan con tamaños precoces, aunque en nuestra serie se presentan como un T2 clínico (cT2) un 32,8% de los pacientes. Este hecho nos hace reflexionar en el diagnóstico tardío de los tumores de localización supraglótica e hipofaríngea con respecto a los de localización glótica. Es ampliamente conocido que los tumores de localización hipofaríngea son muy agresivos; se diagnostican en estadios más avanzados, su pronóstico es desalentador y su tasa de supervivencia muy baja. En nuestra serie este tipo de tumores son diagnosticados en el 100% de los casos en fase avanzada. Ferrer y cols. (2004) presentaron cifras de estadiaje, en la clasificación TNM patológica (pT), en tumores de hipofaringe similares a las nuestras, etiquetados tras la cirugía como estadios avanzados en el 85% de los pacientes con tumores hipofaríngeos, representando los pT3 un 38% y un 47% los clasificados como pT4.

Nosotros pensamos que los tumores glóticos se diagnostican más frecuentemente en estadios precoces debido a su asociación clínica con el síntoma disfonía, que suele llamar la atención del paciente y familiares, a menudo fumador, y es un signo de alarma que favorece la necesidad de acudir a su médico especialista. Otras series como las publicadas en otros países por Raitiola y cols. (1997), Tuyns y cols. (1988), Brenner y cols. (2001), Teppo y cols. (2001) coinciden en el diagnóstico más precoz de los carcinomas glóticos respecto a los supraglóticos. En España Tamarit y cols. (2007) ofrecen cifras del 83,1% de carcinomas glóticos diagnosticados en estadios precoces (T1-T2), en comparación con el 69,9% de los supraglóticos.

Entre las citas bibliográficas, destacan el estudio de Bien y cols. (2008) que realizan un análisis retrospectivo de 12.888 casos diagnosticados de carcinoma de laringe e hipofaringe, estudiando sus características clínicas. La mayoría de los pacientes con tumoraciones supraglóticas (45,2%) se clasificaron como T3 tumoral y el 42,3% como libre de afectación ganglionar, es decir, N0 en la clasificación TNM. Los tumores de hipofaringe o seno piriforme se presentaron como avanzados en la mayoría de los casos (43,5%, T4), y con afectación ganglionar en el 82,1%, siendo N2

en 36,6% de los casos, según la clasificación TNM. Atendiendo a los tumores de localización glótica, el 33% se clasificaron como T3, seguidos de 30,6% que eran T1 y 23,7% T2; igualmente, la mayoría (68,3%) se clasificaron como N0.

Rzewnicki y cols. (2012) presentaron la zona supraglótica como la región anatómica más frecuente en la localización del tumor primario laríngeo (48,0%), etiquetados como estadio clínico T3 en el 33,5% de los casos. Los cánceres subglóticos representan escasamente el 2,9% de nuestra serie y cerca del 1% en la amplia literatura (Levy y cols, 2014), por lo que su estudio detallado es más complicado y se escapa al interés de este estudio. La mayoría de los tumores subglóticos referenciados son tumores benignos, con más frecuencia de tipo vascular (hemangiomas y linfangiomas) y suelen afectar a la población infantil.

El estado de los ganglios cervicales en el momento diagnóstico y, por lo tanto, la presencia o ausencia de metástasis ganglionares cervicales, se considera, de forma clásica, como el principal factor pronóstico para el CECC (Stell, 1990), empeorando el pronóstico y disminuyendo la supervivencia en un 50% cuando estas adenopatías están presentes (N+). Además, el tamaño tumoral, de forma aislada, también se muestra como un factor pronóstico importante. Aunque no hay una relación directa, son más probables las adenopatías cervicales a mayor tamaño del tumor primario (T), especialmente en los tumores de localización supraglótica que es una región muy linfófila.

En nuestra serie, se detectaron adenopatías metastásicas cervicales en el 32,4% de todos los casos estudiados. Lindberg y cols. (1972) publicaron cifras del 50% de metástasis regionales, bien clínicas o bien subclínicas en pacientes con CECC. Otros estudios aportan una incidencia de las metástasis subclínicas que varían entre el 20 y el 50% (Synderman y cols., 1985, Carvalho, 1998 y Ozturkcan y cols., 2009). Atendiendo a la localización del tumor primario, la región laríngea supraglótica se asoció de forma estadísticamente significativa en nuestra serie con un N+, encontrándose afectación ganglionar cervical en el 56,8% de los tumores de esta localización, en contra de la localización glótica, donde el 87,5% de los casos fueron clasificados como N0; el 57,1% de los tumores de hipofaringe como N+, cifras similares a las encontradas en la bibliografía (Ferrer y cols., 2004; Kotwall y cols., 1987) que consideran a este tipo de tumores con gran capacidad metastásica.

Los tumores subglóticos, aunque anecdóticos como hemos comentado, producen metástasis cervicales frecuentes en las cadenas ganglionares cervicales recurrentes o paratraqueales y, según nuestra experiencia, suelen aparecer de forma tardía tras varios meses de evolución. Estas metástasis en el área VI o compartimento central del cuello son difíciles de objetivar con los medios diagnósticos habituales y suelen manifestarse clínicamente como recidivas periestomales, con un pronóstico muy malo.

Encontramos un incremento estadísticamente significativo ($p=0,001$), en la asociación entre la estadificación de las adenopatías metastásicas, en relación con el incremento del tamaño tumoral T. En los tumores precoces (T1-T2) el porcentaje de N0 fue del 97,9%, detectándose adenopatías metastásicas tan sólo en el 2,1% restante, siendo éstas catalogadas como N2. En los tumores avanzados (T3-T4), se detectaron adenopatías metastásicas en el 50,9% de los casos.

No pudimos establecer una relación significativa entre la diferenciación celular anatomopatológica (Broders, 1926) y la detección de adenopatías metastásicas, pero sí apreciamos una tendencia hacia la disminución de casos N0 en tumores con pobre diferenciación. Otros autores como Solano y cols. (1997) y Esteban y cols. (1998) sí que han observado una asociación positiva entre distintos grados de diferenciación histológica tumoral y diversos parámetros que condicionan el pronóstico, como son las adenopatías metastásicas.

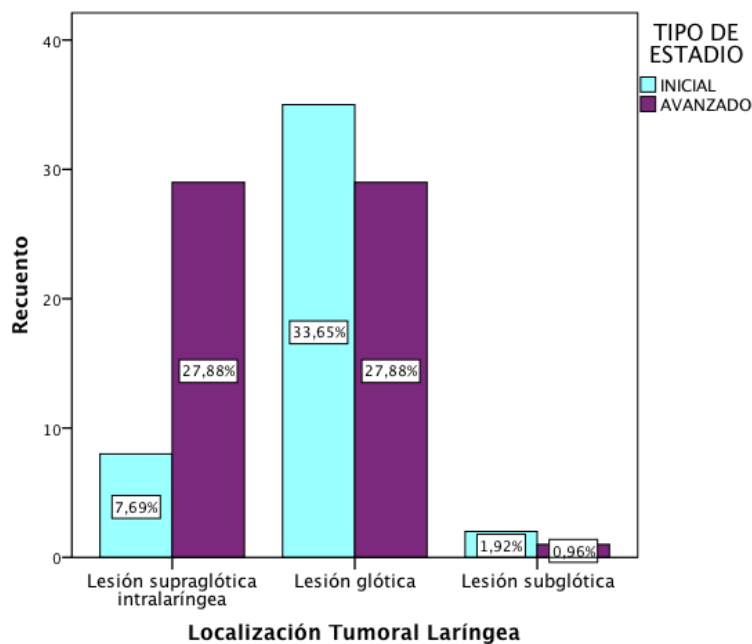
Siguiendo el sistema de clasificación definido por la "AJCC-2010", el estadio tumoral global más frecuente en nuestra serie fue el IV, en un 36,6% de los pacientes. Guiados por un objetivo estrictamente pronóstico y para simplificar los datos estadísticos, se agruparon los estadios I y II como iniciales o precoces, y los estadios III y IV como avanzados. La mayoría de pacientes de nuestro trabajo se encontraban en estadios avanzados (EIII-EIV) de la enfermedad (58,9%) de forma global, tal y como presentan otros autores (Lefebvre y cols., 2005, Lyon y cols., 2003; Gleich y cols., 2003).

En la serie estudiada por Dequanter D. y cols. (2012), la mayoría de los casos de cáncer de laringe de localización supraglótica se diagnosticaron en una etapa localmente avanzada (84,4%), mientras que la mayoría de los pacientes con cáncer glótico fueron diagnosticados en la fase inicial (63,3%). En nuestra serie, los datos son semejantes, ya que el 78,4% de los tumores supraglóticos se diagnosticaron en

estadios avanzados de la enfermedad (estadio III y IV), mientras que la mayoría de los tumores de localización glótica, (54,7%), se detectaron en una fase inicial de la enfermedad (estadios I y II). De Bree y cols. (2011), igual que nosotros hemos comentado, relacionan esta alta tasa de detección temprana en los pacientes con tumores glóticos por la aparición del síntoma disfonía.

Clasificamos el 70% de los tumores de hipofaringe en estadios avanzados, cifras semejantes a las publicadas por Ferrer y cols. (2004), que señalan una tasa del 73,3%. Carrasco y cols. (2007) consideran en su estudio un 87,4% de los pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de hipofaringe, en estadios avanzados III-IV. Otros autores, como Herrera y cols. (2009) etiquetan al 28,4% de sus pacientes estudiados con cáncer de laringe como tumores en fases iniciales de la enfermedad (T1-T2), mientras que el 70,8% se presentan en etapa tardía (T3-T4).

Figura 115. Gráfico de barras correspondiente a la asociación entre el estadio tumoral y la localización laríngea del tumor primario (p=0,022).



Detección de adenopatías metastásicas: Correlación clínicoradiológica

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia de adenopatías cervicales metastásicas, constituye el principal factor pronóstico en los pacientes con CECC (Werner y cols., 2002). A pesar de su importancia clínica, en el momento actual carecemos de pruebas diagnósticas que con certeza identifiquen estas adenopatías y, por lo tanto, nos detecten con una alta fiabilidad, aquellos casos que van a requerir cirugía (vaciamiento cervical terapéutico). Por este motivo realizamos con frecuencia esta cirugía en cuellos clínicamente N0, los mal llamados en otra época vaciamientos cervicales profilácticos. La palpación cervical constituye el método clínico más accesible, sencillo y barato; básico para la identificación de adenopatías durante la exploración física ya en la primera consulta. Puede verse dificultada esta exploración en cuellos obesos y cortos, así como en los pacientes que, previamente, han sido intervenidos en la región cervical (Mancuso y cols., 1981). Esta palpación cervical tiene una dificultad añadida en la identificación de adenopatías profundas y en las localizadas en la región retrofaríngea (Ferlito y cols., 2002). Este método diagnóstico es bastante subjetivo; creemos que la experiencia del médico cirujano o examinador durante esta exploración constituye un factor determinante en su resultado. Otro gran inconveniente es que no podemos documentar ni guardar la exploración para posibles comparaciones después del tratamiento.

No obstante, en nuestra serie, presentamos una Especificidad del 95,5% en la identificación de adenopatías cervicales mediante la palpación digital, y una Sensibilidad del 75,0%. Este hecho, unido al alto VPP de la palpación digital, nos indica que, ante un resultado positivo, tengamos una alta seguridad de la presencia de adenopatías cervicales positivas. Además, cuando comparamos los resultados obtenidos en la correlación palpación/TC, todos los pacientes con exploración ganglionar positiva (N+) fueron identificados radiológicamente también como positivos en el TC. La Tomografía computarizada (TC) o Scanner no parece aportar datos nuevos respecto a la mayor detección de adenopatías positivas (N+), salvo su indiscutible utilidad en la identificación de afectaciones vasculares (Altuna y cols., 2004) y en la relación anatómica con estructuras vecinas, de gran interés en el estudio prequirúrgico. En nuestro trabajo, presentamos cifras de Sensibilidad notablemente

más elevadas con el TC (90,9%), no así de Especificidad (85,0%). La prueba de imagen por TC aumenta la probabilidad de detección de lesiones metastásicas ocultas en ganglios clínicamente N0. En la correlación palpación /TC apreciamos una mejora en la identificación de adenopatías, evidenciando como positivas el 13,9% de las adenopatías clínicamente negativas. Estos datos nos hacen reflexionar sobre la importancia del TC en pacientes N0 con alto riesgo de metástasis cervicales: tumores de hipofaringe y supraglóticos y en todos los tumores con T avanzados. Los datos de Sensibilidad y Especificidad publicados en la literatura, son muy dispares por la alta heterogeneidad de las muestras, pudiéndolos revisar en la siguiente Tabla.

Tabla 100. Revisión bibliográfica Sensibilidad y Especificidad de la palpación cervical y el TC. Modificada de Altuna y cols., (2004).

Autores	N	S de palpación	E de palpación	S de TC	E de TC
Mancuso y cols. (1980)	23	60	62	100	75
Mancuso y cols. (1983)	25	76	88	88	88
Friedman y cols. (1993)	50	81	85	94	78
Stevens y cols. (1985)	40	79	91	96	82
Freinmesser y cols. (1987)	100	62	94	60	85
Close y cols. (1989)	83	77	55	86	71
Lydiat y cols. (1989)	14	60	67	100	89
Moreau y cols. (1993)	63	88	96	79	83
Hilsamen y cols. (1990)	26	74	86	84	71
Friedman y cols. (1984)	150	72	82	87	86
Bergman y cols. (1994)	40	60	80	55	90
Zapater y cols. (1996)	20	64	100	71	100
Merrit y cols. (1997)	53	81	71	81	86
Tirelli y cols. (1998)	53	82	80	86	64
Altuna y cols. (1996)	120	52	97	65	87
Iñarra y cols. (2011)	95			82	85
Altuna y cols. (2004)	120	51	96	65	86
Pelegrín y cols. (2015)	112	75	95	90	85

Tratamiento

A lo largo de las últimas décadas se han ido modificando los protocolos de tratamiento de los CECC, especialmente en los tumores avanzados (León y cols., 2014). La cirugía sigue siendo el tratamiento de elección para la mayoría de los tumores localizados en la cavidad oral, para los tumores de hipofaringe en los que sea factible una exéresis quirúrgica sin un deterioro funcional importante y en los tumores de localización orofaríngea o laríngea en los cuales las posibilidades de control oncológico con tratamientos conservadores no quirúrgicos sean limitadas (Gourin y cols., 2009; León y cols., 2014). La introducción del concepto de preservación de órgano en función a la respuesta de quimioterapia de inducción en los tumores laríngeos, en el tratamiento inicial de tumores que hasta entonces se trataban con LT, (The Department of Veterans, 1991), quimio-radioterapia concomitante (Pignon y cols., 2006) o fármacos con una diana molecular como el cetuximab, uno de los primeros anticuerpos moleculares (Bonner y cols., 2006), ha modificado de forma sustancial los protocolos de pacientes con CECC en estadios avanzados (León y cols., 2014).

Todos los pacientes incluidos en nuestro estudio se sometieron a algún tipo de intervención quirúrgica con fines curativos o paliativos; por lo tanto, no es un fin de este trabajo establecer diferencias entre el tratamiento quirúrgico y el de órgano preservación con QT y/o RT. Como apuntamos anteriormente, la mayoría de nuestros pacientes se incluyeron en estadios avanzados de la enfermedad, concretamente, el 58,9%. Este hecho justifica que el procedimiento quirúrgico más frecuentemente realizado fuera la LT, realizada en el 47,5% de nuestros pacientes. Es importante mencionar que en el 55,7% de los pacientes con estadio avanzado se realizó algún tipo de tratamiento adyuvante, bien con RT o bien con QT, por presentar algunos de los criterios establecidos (Cooper y cols., 2004). Recientemente Rodrigo y cols. (2015) han señalado que en los estadios localmente avanzados (T3-T4), la LT (con radioterapia complementaria, en los casos con factores de riesgo), resulta ser el tratamiento de elección, de forma que ningún estudio ha mostrado mejores resultados que ésta, en términos de control loco-regional y supervivencia (The Department of Veterans, 1991; Pignon y cols., 2000; Lefebvre y cols., 2006; Pfister y cols., 2006).

Durante el período de estudio, solo fueron evaluados por el comité de tumores de cabeza y cuello, previo al inicio terapéutico, el 52,2% de los pacientes de nuestra serie. Consideramos muy importante, junto a la mayoría de autores, la planificación conjunta inicial de los pacientes así como la coordinación con el resto de especialistas de cabeza y cuello que tienen o puedan tener contacto con el paciente a lo largo de todo el proceso de su enfermedad, con el fin de establecer un tratamiento integral y un seguimiento óptimo durante todas las etapas. Con ese propósito, actualmente, estudiamos de forma conjunta y multidisciplinar, cerca del 92-93% de los pacientes con CECC de nuestra área sanitaria.

En estadios precoces el tipo de cirugía realizado reiteradamente a los pacientes de nuestro servicio fue la cirugía endoscópica mediante láser CO₂, realizada en el 44,4% de los casos. La hemilaringectomía, en cualquiera de sus modalidades, fue la técnica quirúrgica más empleada en los pacientes con estadio II (32,6%) y el láser endoscópico CO₂ en el estadio I (64,7%).

La cirugía para las tumoraciones faringolaríngeas ha evolucionado en los últimos años, especialmente desde la década de los noventa, cuando Steiner (1993) introdujo la cirugía endoscópica mediante cirugía láser CO₂, revolucionando el concepto terapéutico hasta la fecha. Actualmente, según las amplias referencias bibliográficas existentes (Mendenhall y cols., 2004; Sigston y cols., 2006; Hartls y cols., 2007) sabemos que la cirugía endoscópica mediante láser ofrece unos resultados comparables con otros métodos quirúrgicos, igual que con el uso de la radioterapia como tratamiento curativo, en términos de control local y de preservación laríngea para el cáncer glótico temprano. En nuestra opinión, las estrategias quirúrgicas de preservación de órgano, en su amplia gama de opciones terapéuticas presentan excelentes resultados de control local de la enfermedad y supervivencia, y esto depende, en gran medida, de la experiencia quirúrgica del cirujano. En la mayoría de tumores de pequeño tamaño (muchos T1 y T2) que pueden ser resecaos completamente y en algunos tumores seleccionados T3, que nos ofrecen garantías de un correcto control oncológico con suficientes márgenes de seguridad, la cirugía mediante láser CO₂ es, para nosotros, la opción terapéutica de elección en los tumores glóticos y supraglóticos, reservando las técnicas quirúrgicas abiertas como una opción más, dentro de los recursos disponibles en casos particulares,

individualizando cada caso en función de las condiciones particulares de cada situación clínica.

En nuestra serie, la LT fue la intervención más realizada en los tumores de localización glótica (48,8%) y supraglótica (45,5%), seguida muy de cerca en esta localización supraglótica por la técnica parcial de laringectomía horizontal supraglótica clásica, tal como la describió el uruguayo Justo Alonso en 1946 y popularizada unos años más tarde por Ogura (Ogura y cols., 1965). Como mencionamos anteriormente, la mayoría de tumores supraglóticos se diagnosticaron en fases avanzadas de la enfermedad (T3:56,8% y T4:21,6%). Consideramos la laringectomía total, como la técnica de elección en los tumores avanzados glóticos y en todos los T4 supraglóticos operables, así como en la mayoría de tumoraciones T3 supraglóticas, por las complicaciones postoperatorias relacionadas con la ingesta, la deglución y la función respiratoria que conlleva en este tipo intervenciones parciales que requieren amplias resecciones para cumplir con los mínimos requisitos oncológicos de seguridad. En los tumores precoces T1 y T2 supraglóticos, al igual que los compañeros de la escuela asturiana (Suarez y cols., 1995; Rodrigo y cols., 2008), utilizamos, ocasionalmente, la LS con láser (4,9% de los pacientes), ya que los resultados oncológicos de esta técnica para los tumores precoces y moderadamente avanzados parecen ser comparables a los de la laringectomía supraglótica clásica ya citada, con las grandes ventajas funcionales en cuanto a la conservación de las funciones laríngeas básicas, esto es, respiración, deglución y fonación por la vía natural, sin necesidad de un traqueostoma.

Realizamos cirugía ganglionar, en cualquiera de sus modalidades, en el 60,7% de los pacientes analizados, asociado a la cirugía del tumor primario. El tipo más frecuente de intervención sobre los ganglios fue el Vaciamiento Cervical Funcional Bilateral (54,2%), seguido del Vaciamiento Cervical Funcional Unilateral y Radical Contralateral (23,5%). Se intervino únicamente en un lado del cuello en el 22,1% de los casos (Vaciamiento Cervical Funcional Unilateral 16,2% y Vaciamiento Radical unilateral en el 5,9%).

Se llevó a cabo algún tipo de intervención ganglionar en 36 pacientes catalogados como N0 en el diagnóstico inicial. Se describen en la literatura porcentajes que varían entre el 10 y el 20% de micrometástasis ocultas en pacientes clínicamente N0 (Ferlito y cols., 2008; Becker y cols., 2004); es decir, aquellas metástasis

ganglionares regionales presentes y encontradas por el patólogo tras estudiar la pieza de vaciamiento y que no han podido ser detectadas mediante los estudios preoperatorios habituales, bien sea con la palpación cervical o bien mediante el estudio radiológico mediante la TC.

Se practicó cirugía ganglionar en el 71,4% de los casos, siendo la técnica más frecuente el vaciamiento cervical funcional bilateral. Putten y cols. (2015) identificaron, en un estudio de 136 pacientes con cáncer de laringe e hipofaringe tratados con intención curativa con quimio-radioterapia, un total de 60 pacientes que habían presentado enfermedad recurrente. Un tercio de estos pacientes fueron tratados con cirugía de rescate, siendo dos tercios no adecuados por presencia de metástasis a distancia. Realizaron cirugía ganglionar en todos los casos, independientemente del TNM tumoral. Cuando los pacientes se han sometido inicialmente a la radiación (con o sin quimioterapia), la cirugía es la modalidad de rescate de elección, siempre y cuando, se considere la resección completa con márgenes suficientes negativos. Cohen y cols. (2012) presentaron la LT, con o sin faringectomía, como el procedimiento de rescate “gold standard”, a favor del cual todas las demás técnicas han de ser comparadas y juzgadas. Nosotros utilizamos esta técnica de rescate en la mayoría de nuestros casos, si bien en algunos casos seleccionados de tumores de pequeño tamaño recurrentes, consideramos la cirugía parcial (de conservación quirúrgica de órgano) mediante técnica quirúrgica abierta o láser transoral, acompañada o no de radioterapia adyuvante, como la técnica quirúrgica; este tipo de tratamiento lo apoyan diferentes autores, tales como Steiner y cols. (2004), con unas tasas de control local en el 74% de los pacientes en recurrencias glóticas sometidos a cirugía láser CO₂. Grant y cols.(2008) registraron una tasa de control loco-regional, mediante cirugía parcial abierta y transoral, en el 88% de los pacientes con enfermedad recurrente de glotis y supraglotis en una cohorte de pacientes con un seguimiento de 2 años; además, estas técnicas quirúrgicas, después de la RT, no se asociaron con tasas más altas de complicaciones postoperatorias; la tasa de fístulas faringocutáneas oscilaba entre el 8% y el 14%.

El tratamiento clásico y el más eficaz y seguro en pacientes con tumoraciones subglóticas es la laringectomía total, aunque ocasionalmente se permite el tratamiento mediante radioterapia o laringectomía parcial en casos seleccionados en estadio

precoz, como es el caso en 2 de nuestros pacientes (Zhang y cols., 2012). Para casos localmente avanzados, se recomienda siempre la asociación con una disección cervical ganglionar incluyendo los niveles II-IV y, especialmente, el área VI o cadena recurrential. Weiss y cols. (1994), en un amplio estudio descriptivo, describen una alta probabilidad estadística en los pacientes clínicamente N0 (en función de la sublocalización laríngea del tumor primario), de que existan ganglios metastásicos a pesar de ser clasificados inicialmente como clínicamente negativos.

Es de mencionar que en nuestro estudio se incluyeron un total de 21 pacientes (18,8%) con diagnóstico de recidiva tumoral local o regional de un tumor primario de cabeza y cuello, junto a otros 3 diagnósticos de segundos tumores (2,7% del total) y 4 pacientes con metástasis ganglionares con tumor primario de origen desconocido (3,6%). En opinión de Godwin y cols. (2000) la cirugía es el tratamiento de elección en la mayoría de ocasiones tras el fracaso loco-regional de un tratamiento inicial, y en la aparición de segundas neoplasias a nivel de las vías aerodigestivas, tal y como reflejan (León y cols., 2012). Como se muestran en nuestros resultados, el 71,4% de estos casos fueron tratados inicialmente con organopreservación mediante quimioterapia y/o radioterapia. Sabemos que la tasa de complicaciones de la cirugía de rescate, después de la quimio-radioterapia, es relativamente alta, en relación con la pobre cicatrización de las heridas y la elevada aparición de fístulas faringocutáneas (11-58%) (Stoekli y cols., 2000). En el 72,2% de los casos recidivados que presentaban enfermedad local, regional o loco-regional se realizó LT acompañada o no de faringectomía como cirugía de rescate; el resto de pacientes fue tratado mediante hemilaringectomías, en cualquiera de sus modalidades (20% laringectomías parciales y 7,8% cirugía endoscópica mediante láser transoral).

Estancia hospitalaria y complicaciones

La estancia hospitalaria postquirúrgica media en nuestra serie fue de 19,15 días, con un mínimo de 1 día y un máximo de 65. El tiempo de ingreso hospitalario se puede ver modificado por diversas variables, que difieren del estricto acto quirúrgico, como son: las comorbilidades asociadas, la aparición de infecciones intrahospitalarias...etc. Encontramos una diferencia estadísticamente significativa

($p=0,031$), entre la estancia hospitalaria y el estadio clínico tumoral. Los pacientes diagnosticados en estadios precoces presentaron una estancia postoperatoria media de 13 días de ingreso, mientras que esta cifra aumentó hasta 23 días en los pacientes tratados con estadios tumorales avanzados. La complicación postoperatoria por fístula faringoesofágica se asoció estadísticamente ($p=0,001$) con el incremento de la estancia hospitalaria. La media de estancia en pacientes sin complicación por faringostoma fue de 14,31, pasando a 32,96 cuando se presentó este tipo de complicación.

La fístula faringocutánea representa la complicación más frecuente que acompaña a la cirugía de LT (White HN y cols., 2012). Esta complicación condiciona con frecuencia, como hemos mencionado, el incremento de la estancia hospitalaria. En nuestra serie encontramos la aparición de fístula faringocutánea en el 26,5% de los pacientes tratados de forma global de su patología tumoral laríngea; esta cifra se reduce al 21,9% con la exclusión de los pacientes previamente irradiados. Las tasas de incidencia varían según la bibliografía revisada en torno al 10-40% (Redaelli de Zinis (1999); Sousa Ade A. y cols. (2013); Varghese y cols. (2009); Saki y cols. (2008); Sarra y cols. (2009); White y cols. (2012); Akduman y cols. (2010); Virtaniemi y cols. (2001); Fradis y cols. (1995); Markou y cols. (2003); Rodrigo y cols. (2015); Masegosa (2014).

Tabla 101. Porcentaje de fístula faringocutánea secundaria a la cirugía laríngea, en distintas series estudiadas.

Autor (año)	% Fístula Faringocutánea
Redaelli de Zinis y cols. (1999)	16%
Sousa Ade A. y cols. (2013)	15,1%
Saki N y cols. (2008)	13%
White HN y cols. (2012)	21%
Virtaniemi JA y cols (2001)	15%
Fradis M. Y cols.(1995)	12,5%
Markou y cols. (2003)	13%
Rodrigo y cols., (2015)	27%
Sarra RD y cols. (2009)	20% -34,5%
Masegosa (2014)	22,96%

Varghese y cols. (2009)	37%
Akduman y cols. (2010)	41,3%

Creemos, según nuestra experiencia y como reflejamos en nuestros resultados, que el riesgo de aparición de fístula faringocutánea se incrementa en aquellos casos en los que se requiere cirugía ganglionar asociada al tratamiento del tumor primario ($p=0,008$), como refieren, así mismo, diferentes autores como Virtaniemi y cols. (2001) y Sarra y cols. (2009), entre otros. Otros autores coinciden en la descripción de distintos factores predisponentes, quirúrgicos o no, para la aparición de este tipo de fístulas, como son la irradiación cervical previa (Virtaniemi y cols., 2001; White y cols., 2012; Saki y cols., 2008), el hipotiroidismo previo (White y cols., 2012), el tipo de cierre quirúrgico mecánico o manual (Goncalves y cols., 2009) y los márgenes quirúrgicos amplios (Saki y cols., 2008). A pesar de estos factores, y muchos otros no comentados, la aparición de la temida fístula es difícil atribuir a una causa única y su frecuencia es difícil de controlar completamente a pesar de los mejores cuidados disponibles en la actualidad. Por su parte, autores como Markou y cols. (2003) revelaron en su estudio que las fístulas faringocutáneas no parecían estar relacionadas con la incidencia de tumores recurrentes.

Reflejamos en nuestra serie otras complicaciones: infección de la herida quirúrgica nosocomial en el 24,1% de los pacientes y hemorragia postoperatoria en el 7,1%. Encontramos cifras en la literatura (Esriti y cols., 2004) que reflejan un 6,1% de hemorragias postoperatorias en pacientes tratados de CECC y del 23,1% de infecciones de la herida quirúrgica (Fusconi y cols., 2006) reflejando correlación entre la infección quirúrgica de la herida cervical con el estadio avanzado de la enfermedad y con la presencia de metástasis de los ganglios linfáticos, pero no así con la extensión de la cirugía.

Para el cierre quirúrgico de las cirugías abiertas, no tenemos protocolizado la utilización de ninguno de los diversos materiales hemostáticos que existen en el mercado. Ujam y cols. (2012) asociaron reducción de la pérdida de sangre y las tasas de hematoma en las cirugías de cabeza y cuello, con la utilización del agente hemostático Floseal[®].

Estudio anatomopatológico

Todos los pacientes incluidos en nuestro trabajo fueron diagnosticados, mediante estudio anatomopatológico, de carcinoma epidermoide o de células escamosas. Adoptamos esta medida con el fin de homogeneizar la muestra, evitando sesgos con otros tumores muy poco frecuentes. El carcinoma epidermoide, como refleja la literatura, en términos histológicos, representa entre el 95 al 98% de los tumores de laringe en particular y, en general, de los CECC (Kumar, 2004).

En nuestra serie, de forma global, los tumores bien diferenciados fueron el subtipo de carcinoma epidermoide más reiteradamente encontrado, en el 41,7% de los casos. Le siguieron los carcinomas con moderada diferenciación (37,0%), y con pobre diferenciación (21,3%). Coincidimos con otros autores, como Licitra y cols. (2003) que señalan los carcinomas bien diferenciados como los más frecuentes en sus series. Otras citas (Martínez-Berganza y cols., 1998; Masegosa, 2014) parecen señalar el subtipo moderadamente diferenciado como el más frecuente, pero todos coinciden en que los tumores pobremente diferenciados son los menos frecuentes. Conceptualmente, nosotros agrupamos como tumores con mala diferenciación los carcinomas con moderada y pobre diferenciación para determinadas asociaciones clínico-salivares, que veremos a continuación, con el fin de obtener datos con valor pronóstico.

Encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el grado de diferenciación celular y la localización tumoral primaria ($p=0,041$), así como entre la distribución por estadios tumorales de la enfermedad ($p=0,010$). En los tumores de localización supraglótica e hipofaríngea, los carcinomas con moderada diferenciación constituyen los subtipos más frecuentes (44,4% y 60% respectivamente), siendo los de buena diferenciación los más frecuentes en orofaringe y glotis (66,7% y 51,6% respectivamente). Markou y cols. (2013) reflejan datos semejantes a los expuestos en nuestra serie, tal y como se aprecia en la Figura 116. Cosetti y cols. (2008) describieron, en un análisis descriptivo, el grado de diferenciación histológico de los carcinomas epidermoides incluidos en su estudio, con su evolución cronológica a lo largo del tiempo y sus variaciones en las localizaciones laríngeas glóticas y supraglóticas, como se aprecia en las siguientes Figuras.

Figura 116. Grado de diferenciación de los carcinoma de laringe en relación con la localización del tumor primario: SCC carcinoma de células escamosas, G1: bien diferenciado, G2: moderadamente diferenciado, G3: mal diferenciado. Markou y cols. (2013).

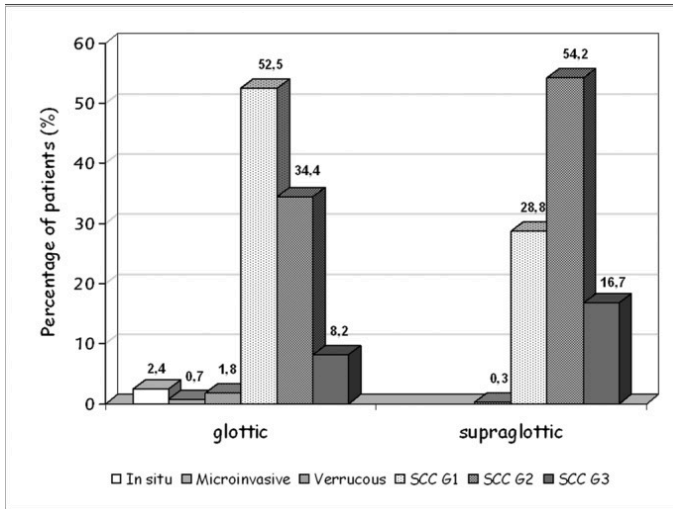


Figura 117. Grado de diferenciación histológica para los tumores laríngeos de localización glótica a lo largo del tiempo. Cosetti y cols. (2008).

Stage of Cancer	Year of Diagnosis				
	1977-1978	1983-1984	1989-1990	1995-1996	2001-2002
Regional					
Well differentiated	33 (28.2)	29 (20.6)	18 (17.3)	27 (18.6)	53 (15.8)
Moderately differentiated	46 (39.3)	55 (39.0)	51 (49.0)	76 (52.4)	192 (57.3)
Poorly differentiated	15 (12.8)	21 (14.9)	18 (17.3)	22 (15.2)	57 (17.0)
Undifferentiated	0	3 (2.1)	1 (1.0)	2 (1.4)	1 (0.3)
Unknown	23 (19.7)	33 (23.4)	16 (15.4)	18 (12.4)	32 (9.6)
Total ^b	117 (100.0)	141 (100.0)	104 (100.0)	145 (100.0)	335 (100.0)
Localized					
Well differentiated	81 (27.6)	94 (29.8)	70 (26.7)	78 (25.9)	125 (26.2)
Moderately differentiated	91 (31.0)	109 (34.6)	93 (35.5)	135 (44.9)	213 (44.6)
Poorly differentiated	19 (6.5)	20 (6.3)	25 (9.5)	27 (9.0)	29 (6.1)
Undifferentiated	0	0	0	2 (0.7)	2 (0.4)
Unknown	103 (35.0)	92 (29.2)	74 (28.2)	59 (19.6)	109 (22.8)
Total ^b	294 (100.0)	315 (100.0)	262 (100.0)	301 (100.0)	478 (100.0)

Figura 118. Grado de diferenciación histológica para los tumores laríngeos de localización supraglótica a lo largo del tiempo. Cosetti y cols. (2008).

Stage of Cancer	Year of Diagnosis				
	1977-1978	1983-1984	1989-1990	1995-1996	2001-2002
Localized					
Well differentiated	22 (18.3)	20 (16.9)	15 (15.0)	10 (11.1)	20 (12.5)
Moderately differentiated	43 (35.8)	54 (45.8)	40 (40.0)	49 (54.4)	83 (51.9)
Poorly differentiated	22 (18.3)	20 (16.9)	26 (26.0)	17 (18.9)	25 (15.6)
Undifferentiated	2 (1.7)	2 (1.7)	4 (4.0)	2 (2.2)	1 (0.6)
Unknown	31 (25.8)	22 (18.6)	15 (15.0)	12 (13.3)	31 (19.4)
Total ^b	120 (100.0)	118 (100.0)	100 (100.0)	90 (100.0)	160 (100.0)
Regional					
Well differentiated	16 (11.3)	23 (13.6)	10 (5.6)	15 (8.6)	28 (5.6)
Moderately differentiated	65 (45.8)	58 (34.3)	89 (50.3)	81 (46.3)	263 (52.6)
Poorly differentiated	26 (18.3)	43 (25.4)	59 (33.3)	62 (35.4)	137 (27.4)
Undifferentiated	4 (2.8)	6 (3.6)	1 (0.6)	4 (2.3)	9 (1.8)
Unknown	31 (21.8)	39 (23.1)	18 (10.2)	13 (7.4)	63 (12.6)
Total ^b	142 (100.0)	169 (100.0)	177 (100.0)	175 (100.0)	500 (100.0)

En la actualidad, Ferlito y cols. (2013) realizan este dato anatomopatológico del grado de diferenciación y le asignan un valor pronóstico preponderante, pues consideran que el subtipo histológico, combinado con el estadio tumoral deberían de

ser el “gold standart” para la elección del tratamiento más adecuado en los pacientes con CECC.

Progresión de la enfermedad: persistencia tumoral, recidiva tumoral y enfermedad metastásica.

Las recidivas tumorales influyen de forma decisiva en la supervivencia de los pacientes con CECC (Álvarez y cols., 2007), ensombreciendo su pronóstico. Aunque su incidencia actual ha disminuido ligeramente respecto a etapas anteriores, su aparición sigue siendo frecuente y constituye la principal causa de mortalidad en los pacientes con CECC avanzado (Spector y cols., 2004).

En nuestro estudio optamos por diferenciar dos conceptos por sus diferentes repercusiones clínicas y pronósticas; por un lado, el término persistencia tumoral, entendido como la presencia de tumor en la localización primaria durante los primeros seis meses siguientes a la cirugía, con una incidencia en nuestra serie del 4,5%, y, por otro lado, el término recidiva tumoral que, conceptualmente, se establece para aquellas recaídas que aparecen a partir del sexto mes. Nuestra tasa de recidiva tumoral ha sido del 18,4%; el tiempo medio de su aparición es de 13,24 meses, con un mínimo de 6 meses y un máximo de 40 meses. Nuestras cifras se encuentran en un punto intermedio con respecto a las presentadas por otros autores para series similares, a pesar de la gran heterogeneidad de las muestras en los diferentes trabajos. Martínez (2010) evidencia, en una serie de 567 pacientes con cáncer de laringe, persistencia tumoral en el 3,2% de los pacientes y recidiva en el 13,2%, con una media de presentación de 18,78 meses. Hoffman y cols. (2006) publican cifras del 30% de recidivas loco-regionales en pacientes con tumores faringolaríngeos. Gumusay y cols. (2015) observan cifras de recidiva local en su serie de CECC del 11,3%. La gran mayoría de las recidivas del CECC se producen dentro de los 2 primeros años y la suelen aparecer en el primer año después del tratamiento. Choby y cols. (2014) señalan un tiempo medio de recurrencia del cáncer de laringe de 7,1 meses. A diferencia de las citas bibliográficas en las que las recidivas locales se encuentran en mayor frecuencia, frente a las regionales (Licitra y cols., 2003; Chen y cols., 2001; Fisher y cols., 2000), nosotros evidenciamos mayor número de recidivas ganglionares (42,8%) que de

locales (33,3%). Es ampliamente conocido y aceptado que la recidiva ganglionar tiene peor pronóstico que la local y, suele ser la causa de éxitus relacionado con la enfermedad (Martin y cols., 2014; Ma y cols., 2014).

Identificamos que la localización del tumor primario con más elevado índice de recidivas es la hipofaringe, con un 28,6%, seguida de la región supraglótica laríngea, con un 9,6% y glótica, con un 7,6%, de acuerdo con otros autores ya citados. El mayor índice de recidivas ganglionares en tumores laríngeos se relacionan con la localización glótica (63%), mientras que las recidivas locales lo hacen con la localización supraglótica (66,7%), datos que no pudimos contrastar con los referidos en la literatura. Spector y cols. (2004) señalaron tasas más altas de recidivas supraglóticas (16%), respecto a las glóticas y subglóticas (4,4 y 11,5%, respectivamente), sin especificar su localización. Pastore y cols. (2015), en su estudio de los tumores supraglóticos, detectaron cifras de recurrencia del 17,5% (locales en el 12,1% y regionales en el 4,7%). En nuestra serie el 85,7% de las recidivas se asocian a estadios tumorales avanzados III y IV, cifras semejantes a las descritas en la literatura (Álvarez y cols., 2007). Rodrigo y cols. (2015) detectaron, durante el seguimiento de pacientes con cáncer de laringe en estadios avanzados, que el 25% de los mismos presentaban recidivas locales o regionales. Nosotros pudimos establecer una relación entre el tamaño del tumor primario (T) y la tasa de recidivas loco-regionales; el 84,7% de las recidivas ganglionares y el 91,6% de las locales se relacionaron con "T avanzados", (T3-T4). Kazmi y cols. (2012) identificaron el volumen medio del tumor primario como un factor independiente en la predicción de recidivas loco-regionales.

La frecuencia de metástasis a distancia varia extensiblemente de acuerdo con la literatura consultada, fluctuando entre el 4 y el 26% en los diferentes estudios clínicos (Lindberg y cols., 1983; Vikram y cols., 1984; Hong y cols. 1985; Bathia y cols. 1987; Gumusay y cols., 2015), y, entre el 37% y el 57% cuando los estudios se realizan mediante autopsias (O'Brien y cols., 1971; Zbaren y cols., 1987; Nishijima y cols., 1993). La frecuencia más elevada de metástasis a distancia en los estudios de autopsia podría explicarse por la mayor sensibilidad en el hallazgo de la enfermedad metastásica en este tipo de estudio, así como en el sesgo relacionado con el uso de los datos (León y cols., 2000). Nosotros constatamos durante el seguimiento clínico, lesiones a distancia del tumor primario en el 22,3% de los pacientes (no se realizaron

estudios postmortem). El tiempo medio de aparición fue de 18,2 meses desde la intervención del tumor primario, siendo la localización anatómica más frecuentemente afectada el pulmón, en el 72% de los casos. En nuestro estudio, la localización tumoral con mayor número de metástasis a distancia fue la hipofaringe (en el 42,9%) y, dentro de la localización laríngea, le sigue la supraglotis en frecuencia, con una tasa de metástasis a distancia del 32,4%. León y cols. (2000) concluyen, tras sus resultados en su estudio multivariante, que la localización tumoral hipofaríngea y la supraglótica constituyen un riesgo independiente de metástasis a distancia. Encontramos una predilección de las metástasis en los T3 (45,8%), sin ser estadísticamente significativa (0,087); según algunos autores existe significación estadística para la presencia de metástasis a distancia en función de la clasificación T (Merino y cols., 1977; Leibel y cols., 1991; Papac y cols., 1984), no así para otros (Alvi y cols., 1997; Leemans y cols., 1993). Nosotros no encontramos relación con el grado de diferenciación tumoral, al contrario que otros autores (Shingaky y cols., 1996 y León y cols., 2000).

Igualmente, hemos constatado segundas neoplasias en el 7,2% de los casos estudiados. Algunos estudios (Schwartz y cols., 1994) presentan cifras elevadas de segundos tumores (19%), relacionados con el CECC, refiriendo una probabilidad de desarrollar un segundo tumor metacrónico a los 5 años después de someterse a un tratamiento de CECC del 22%. Otros autores ofrecen cifras globales del 8,5% de segundas neoplasias para los CECC (Rafferty y cols., 2001), siendo los cánceres orales los que presentan tasas más elevadas.

En nuestra consulta efectuamos el seguimiento de todos los pacientes tratados con revisiones clínicas periódicas, realizadas al menos durante el primer mes, tercero y sexto, durante el primer año; cada 2-3 meses, durante el segundo año; cada 3-6 meses durante el tercero; cada 6 meses, entre 3º y 5º año y cada doce meses a partir del 5º año, tal como tenemos protocolizado en nuestro Comité de Tumores de Cabeza y Cuello local, basado, principalmente, en las recomendaciones establecidas en la Guía Clínica NCCN (2014, en línea). En nuestro Servicio de Otorrinolaringología tenemos institucionalizado que se debe facilitar al paciente su acceso a una consulta, así como la revisión clínica inmediata siempre y cuando se produzca en él alguna incidencia o duda clínica que le pueda repercutir negativamente.

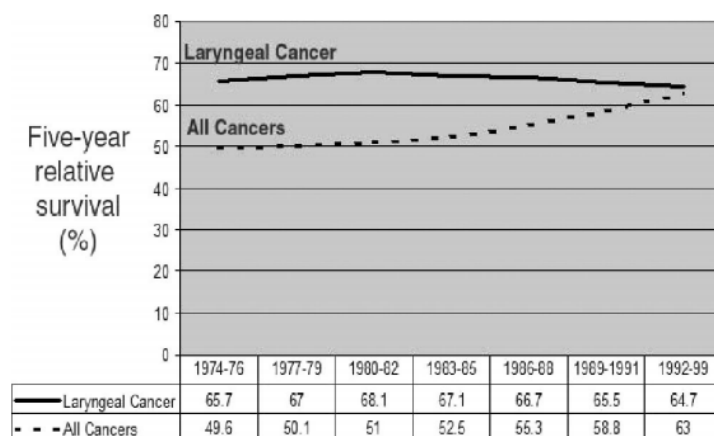
Supervivencia Global en el CECC

El CECC presenta una mortalidad aproximada de 15 casos/100.000/año (Sturgis y cols., 2004). En los últimos años se han realizado importantes avances en su diagnóstico y tratamiento, pero la supervivencia no ha experimentado los cambios sustanciales que se esperaban por el esfuerzo realizado, pues se sigue diagnosticando a muchos pacientes en estadios avanzados (Quer y cols., 2001); la mortalidad sigue siendo elevada, a causa de las recidivas tumorales, los segundos tumores y las metástasis a distancia (Larson y cols., 1990; Yamamoto y cols., 2002).

En nuestra serie se realizó el análisis de la SG mediante el método de estimación probabilística, no paramétrico de función de supervivencia, denominado Kaplan-Meier. Se utilizaron, de forma independiente entre sí, las variables pronósticas relacionadas con el estudio clínico previamente realizado. El tiempo máximo de seguimiento de los pacientes estudiados fue de 73 meses (6 años), estimando la SG de las variables para los 12 meses (1 año), 24 meses (2 años) y 60 meses (5 años). Obtuvimos una estimación de S.G a los 12 meses del 84.4%, a los 3 años del 65.6% y a los 5 del 53,4%. Tras el análisis de SG por localización tumoral primaria, alcanzamos una estimación de supervivencia del 87.4% a los 12 meses, del 72,0% a los 3 años y del 57,0% a los cinco años en pacientes con cáncer de laringe, cifras considerablemente inferiores, en los pacientes con cáncer de localización primaria faríngea (70%/12 meses, 40%/3 años y 30% a los 5 años). Comparando nuestros datos con lo publicado en la bibliografía médica, apreciamos una gran variabilidad de los resultados debido a la heterogeneidad en las series. Sanabria y cols. (2007) en una serie de 310 pacientes con diagnóstico de CECC, presentaron cifras de SG del 42,8%; Chen y cols. (2001) reportaron cifras del 37% en pacientes con cáncer de laringe avanzado. En nuestro país, encontramos la serie de Martínez (2010) que presentó resultados similares a los nuestros con una SG a los doce meses del 78.3%, a los 3 años del 60% y a los 5 del 50% y la serie de Masegosa (2014), con cifras de SG a los 5 años del 66.9%. Nuestras tasas de SG se encontrarían en un punto intermedio entre las publicadas; estas cifras se podrían justificar por el alto índice de pacientes con enfermedad tumoral previa recidivante (18,1%), en estadio tumoral avanzado (58,9%) y con comorbilidades asociadas (ASA III-IV: 48.4%).

En lo que sí parecen coincidir las series es en que los tumores de faringe, especialmente los localizados en la hipofaringe, presentan tasas de SG más bajas que los de localización laríngea (Kuo y cols., 2014), a pesar de su notable mejoría en las últimas décadas, con cifras de SG de hasta un 41,3% (Newman y cols., 2015), relacionadas con el cambio de patrón terapéutico en el que la RT, con o sin laringofaringectomía, parece adquirir una mayor relevancia. En el cáncer de laringe la cifras parecen invertirse y, como Hoffman y cols. (2006) reseñaron en un estudio longitudinal de 158.426 casos, se apreció una disminución de la SG en pacientes con cáncer de laringe, desde la década de 1980 a mediados de 1990, posiblemente en relación con el cambio producido en los patrones de tratamiento por la introducción y aumento del uso de la quimiorradiación y la disminución de la cirugía.

Figura 119. La supervivencia de los pacientes con carcinoma de células escamosas de laringe, según los datos del NCDDB, disminuyó progresivamente desde mediados de 1980 a mediados de 1990.



En cuanto a la relación de la edad con la SG, apreciamos una peor estimación de SG en pacientes con mayor edad, respecto a los más jóvenes; quizás no porque la edad en sí misma sea un factor determinante en la biología tumoral sino por la coexistencia de las comorbilidades, que aumentan de forma lógica con la edad (Lacy y cols., 2000). En nuestra serie los pacientes menores de 50 años presentaron una estimación media de 51,07 meses, en contra de los mayores de 70 y 80 años, que presentaron estimaciones de 32,49 y 22,62, respectivamente. Luna-Ortiz y cols. (2015), por su parte, no pudieron establecer diferencias significativas en cuanto al pronóstico entre los pacientes mayores y menores de 40 años con cáncer de laringe, pero sí

encontraron relación, y en todos los casos, entre la supervivencia y el estadio clínico inicial. Otros estudios (Petrovic y cols., 1996; Carniol y cols., 1982) hacen referencia a un peor pronóstico para los pacientes jóvenes diagnosticados en estadios avanzados, recomendando en ellos un tratamiento más agresivo desde el inicio. No realizamos el análisis de SG en función del sexo, ya que el 97,3% de nuestros pacientes registrados eran varones, lo que impedía establecer diferencias con potencia estadística.

Encontramos que los pacientes con tumoraciones de localización supraglótica laríngea presentaron estimaciones de SG inferiores a los de localización glótica, con un intervalo que osciló en unos 20 meses de diferencia (34,76 meses/supraglóticos vs 55,74 glóticos). Teniendo en cuenta su asociación con el estadio tumoral, esta diferencia de estimación es más marcada en los pacientes en estadio IV de la enfermedad, siendo en los estadios precoces prácticamente inexistente. En diferentes estudios, como los publicados por Stell y cols. (1990) y el National Cancer Institute (2006, en línea) se presentaron los datos de estimación de SG en función de la estratificación por localización tumoral en el cáncer de laringe, estableciendo un mejor pronóstico en los pacientes con cáncer de localización glótica respecto a los de localización supraglótica. Silvestri y cols. (1992) describieron tasas de supervivencia ajustadas a los 3 años del 45,7% en los tumores supraglóticos y del 83,0% en los tumores de localización glótica, relacionadas con la mayor capacidad metastásica ganglionar y recurrencial de las tumoraciones supraglóticas.

En el análisis de SG en función del TNM tumoral y estadio clínico se apreciaron diferencias significativas para cada una de las variables; en la categoría T se calculó una estimación media para los pacientes T1 de 65,5 meses; para los T2 de 61,1; para los T3 de 34,4 y para los T4 de 32,9. La presencia de adenopatías metastásicas redujeron notablemente la estimación de SG; pacientes libres de afectación metastásica presentaron una estimación media de 54,25 meses, disminuyendo esta tasa en pacientes con N+ (39,00 en N1; 29,94 en N2 y 21,12 N3). Nosotros consideramos la rotura capsular como uno de los factores independientes con más influencia sobre la SG; a pesar de contar con pocos pacientes con este tipo de alteración, podemos objetivar que aquellos con presencia de esta evolución ganglionar patológica asocian una estimación de supervivencia, notablemente, inferior a los que no. En función del estadio clínico tumoral para la SG, los pacientes con estadios precoces ofrecieron tasas

estimadas de supervivencia del 97,7% a los 12 meses y del 83,3% a los 5 años, mientras que los pacientes en estadios avanzados del 75,8% a los 12 meses y del 31,3% a los 5 años. En la literatura encontramos cifras similares a las reflejadas en nuestro trabajo. Tabla 102.

Tabla 102. Revisión bibliográfica, para la relación entre los estadios tumorales y el estadio clínico. Modificada de Merino (1991).

	Estadio y SG			
	EI	EII	EIII	EIV.
Kumar y cols., 1989			42,0%	
Ikarashi y cols., 1990	94,6%	73,7%	58,6%	36,4%
Ganzer. 1990			67,0%	
Goabek.1990	86,0%	71,0%	54,0%	42,0%
Merino. 1991	86,5%	86,7%	70,5%	40,9%

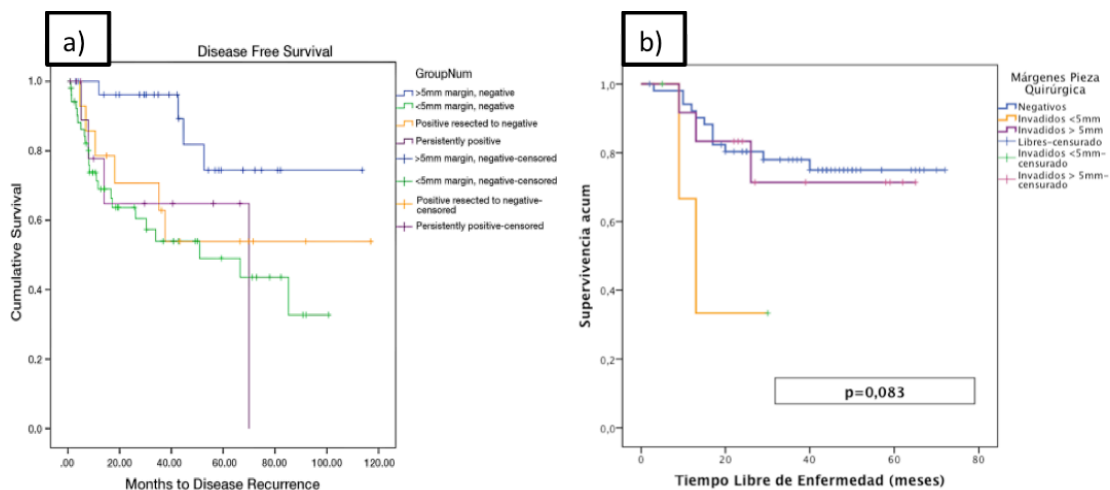
A partir de nuestro análisis univariante de SG pudimos establecer diferencias significativas en otras variables: diferenciación celular histopatológica ($p=0,002$), edad agrupada de los pacientes ($p=0,033$), grado de alcoholismo ($p=0,001$) al igual que Merino (1991), márgenes quirúrgicos positivos ($p=0,001$). Pocos estudios coinciden con nuestros resultados de estimación de SG relacionados con la diferenciación anatomopatológica. Pacientes de nuestra serie con tumores con BD exhibieron mejores tasas de SG que pacientes con histopatología MD o PB, al igual que muestran Cojocariu y cols. (2009) y Martínez y cols. (1998).

Para la realización del análisis multivariante de la SG, se introdujeron las variables que se consideraron relevantes y que, en el análisis univariante, tuvieron una significación estadística con valor $p<0,05$. Utilizamos el método “backward” o “hacia detrás” para ir eliminando las variables con menor contribución, hasta llegar a las cuatro definitivas. La variable que mayor potencia estadística mostró y que, por lo tanto, más relevancia pronóstica tuvo en nuestra serie fue la presencia de adenopatías metastásicas relacionada con un incremento del riesgo de éxitus 12,24 veces superior a los pacientes con ausencia de adenopatías metastásicas (N0), tal y como reflejan

otras citas bibliográficas (Werner y cols., 2002; Layland, 2005; Barroso y cols., 2012). El estado general del paciente, determinado por las comorbilidades reflejadas en el estudio ASA, previo a la cirugía, se mostró como un factor con un alto valor pronóstico en el análisis multivariante, al igual que señalan otros investigadores (Piccirillo y cols., 1994; Kaplan y cols., 1974; Greenfield y cols., 1988) quienes abogan por su inclusión en el sistema de estadificación clásico TNM.

Los factores que se relacionaron estadísticamente en nuestra serie con una disminución en la estimación de la SLE fueron: T avanzados (T3 y T4), adenopatías metastásicas N2 o N3, estadios avanzados de la enfermedad (EIII y EIV) y pobre diferenciación anatomopatológica. No se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en las estimaciones de SLE en función de la profundidad de los márgenes de la pieza quirúrgica ($p=0,083$), aunque sí se evidenciaron cambios visibles en las gráficas de Kaplan-Meier, tal y como se aprecia en la Figura 119. En la literatura médica actual son varios los autores (Varvares y cols., 2015; Slootweg y cols., 2002; Kurita y cols., 2010) que relacionan la evaluación de los márgenes de la muestra de resección con la predicción del control local, detectando una mejoría estadística en el control local y SLE en los pacientes cuyo estudio anatomopatológico de los márgenes no profundiza en más de 5mm. Aunque no existe consenso sobre lo que hemos de entender por un margen claro, parece que márgenes $> 5\text{mm}$ se pueden considerar como distancia razonable para el control local (Varvares y cols., 2015).

Figura 119. Gráficos de Kaplan-Meier, correspondientes a la SLE en función de los márgenes tumorales. A) Varvase y cols., (2015)($p=0,004$); b) nuestra serie ($p=0,083$).



5.2. Discusión sobre la utilidad de las sondas salivares con marcaje FP-TAMRA en el diagnóstico y pronóstico del cáncer faringolaríngeo.

Grupo Control y Patológico

Uno de los problemas que nos encontramos con frecuencia en los pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide faringolaríngeo y que condiciona su evolución y pronóstico, es la detección, en muchos casos, de la enfermedad en etapas avanzadas. Por desgracia, como refleja Li y cols. (2014) el hecho real es que la enfermedad a menudo se diagnostica en estos estadios tardíos, por la ausencia de biomarcadores seguros y fiables, a la vez que precoces. Todo lo anteriormente expuesto, nos lleva a considerar que nuestro trabajo en la identificación de biomarcadores salivares, tenga importancia tanto para el diagnóstico como para el pronóstico de los CECC; lo que a su vez nos podría conducir a tratamientos más eficaces utilizando tecnologías personalizadas y apropiadas.

Bajo la premisa enunciada por Streckfus y cols. (2007): “la saliva se define simplemente como el fluido diagnóstico” y sus aplicaciones en el cáncer orofaríngeo (Cheng y cols., 2014) comenzamos en el año 2008 la recopilación de muestras salivares de tejidos sanos y tumorales y de sangre, de todos los pacientes con diagnóstico de CECC. Durante el período de estudio se analizaron un total de 132 muestras salivares, de las cuales 32 se correspondieron con el grupo control y 100 con el grupo patológico, sin que existieran diferencias significativas en el estudio estadístico de la variable sexo y edad entre ambos grupos. Para definir el grupo control establecimos la variable dicotómica hábito tóxico tabáquico con la finalidad de crear dos grupos excluyentes entre sí: fumadores (n=14) y no fumadores (n=11), y una tercera variable, que a pesar de no ser excluyente, consideramos importante de cara determinar diferencias en el proteoma de la saliva en pacientes con patología faringolaríngea no tumoral, es decir, patología infecciosa, inflamatoria y lesiones premalignas como el edema de Reinke laríngeo. Todas las muestras se emplearon para el análisis de la validez diagnóstica, ya que para establecer el área bajo las curvas ROC (AUC), la Sensibilidad y la Especificidad

de la saliva como prueba diagnóstica, fue necesario contar con casos de pacientes enfermos (CECC) y sanos (patología no tumoral). Se excluyeron 24 casos para el análisis pronóstico, al no cumplir los criterios de inclusión y exclusión previamente establecidos.

La saliva como fluido diagnóstico

La saliva es el único fluido corporal que se encuentra continuamente en contacto con la mucosa de la cavidad oral, la faringe y la laringe; esta compuesta por una mezcla compleja de una gran variedad de electrolitos, proteínas, péptidos, polinucleótidos, células descamadas y sanguíneas; así como trazas de medicamentos o productos químicos, derivados de la secreción de las glándulas salivares y trasudado de la mucosa oral (Humphrey y cols., 2001).

Una de las primeras preguntas que nos formulamos al comenzar nuestro estudio fue la elección del tipo de fluido corporal que reuniera las necesidades suficientes como para ser una herramienta poco invasiva y con capacidad de detección del CECC, en sus fases más precoces. En base a esta premisa, algunos estudios como el publicado por Li y cols., (2002) formularon que se podían demostrar en los fluidos corporales de los pacientes con enfermedad tumoral, mutaciones idénticas a las presentes en el tumor primario. En una primera fase, se descartaron fluidos como la orina, el líquido cefalorraquídeo o el sudor por sus pobres aportaciones como herramientas diagnósticas en el CECC.

La sangre, por su parte es, por naturaleza, un medio muy complejo debido al elevadísimo número de moléculas que alberga. En su uso, la primera decisión a tomar es el empleo entre el suero o el plasma. La principal ventaja que ofrece el suero con respecto al plasma, es que la mayoría de las proteínas asociadas a la coagulación han sido extraídas, simplificando el análisis proteómico general. Sin embargo, determinados investigadores (Teisner y cols., 1983; Koomen y cols., 2005) sugieren que, a pesar de la eliminación de estas proteínas, la actividad enzimática sigue siendo constante y puede escindir proteínas en vías que no son relevantes para el carcinoma, complicando el descubrimiento de biomarcadores.

En el caso de la utilización del plasma, es fundamental la selección de un anticoagulante adecuado, como por ejemplo la heparina; además, para el uso del plasma, las muestras de sangre deben de recogerse con una secuencia específica determinada y el análisis se puede alterar también las proteínas en función de los tubos empleados. Si se recogen las muestras en entornos hospitalarios, puede haber un lapso de tiempo entre la punción venosa y el procesamiento en el laboratorio (Teisner y cols., 1983; Koomen y cols., 2005), disminuyendo la eficacia de la prueba.

El uso de la saliva como un fluido diagnóstico cumple con las exigencias para la metodología de diagnóstico de bajo coste, siendo además una prueba no invasiva y accesible (Sidransky y cols., 1997); sin embargo, es importante realizar una correcta estandarización en la recogida de la saliva, debido a que diferentes factores pueden afectar a su composición y flujo (Chiapin y cols., 2007). Existen publicadas técnicas de recogida activa salivar, mediante la canulación de un conducto salivar único (Jacobs y cols., 2005), la succión con pipeta debajo de la lengua (Nurkka y cols., 2003), e incluso directamente del surco paragingival (Nagler y cols., 2002; Nurkka y cols., 2003). En nuestra opinión, estos procesos son complicados desde un punto de vista práctico y deben de ser llevados a cabo por personal cualificado. La técnica practicada por nuestro equipo consiste en la obtención de saliva mediante lentinas de forma pasiva (sin sustancias estimuladoras), y con una duración de, al menos, 10 minutos. Inmediatamente después de su recolección, introducimos las muestras en hielo para mantener su integridad y así evitar la degradación de algunas de sus moléculas. A continuación procedemos a su congelación en el laboratorio a una temperatura de -80°C , permitiendo esta temperatura la conservación de la muestra durante meses tras su recolección.

Perfiles SH salivares: asociaciones clínicomoleculares, SG y SLE

Los resultados obtenidos demuestran que la saliva humana contiene enzimas de la familia de las SH en niveles que permiten el marcaje con FP-TAMRA. Los perfiles de individuos sanos (fumadores y no fumadores) indican que la composición de SH en saliva humana no varía excesivamente y que, por tanto, es posible establecer un perfil “sano” de hidrolasas salivares. Los resultados con saliva de pacientes afectados con

cáncer indican que la patología produce cambios significativos en la composición de SH salivares.

Tras el análisis de agrupación jerárquica, según el método de WARD de varianza mínima y distancia euclídea al cuadrado, se establecieron seis grupos de trabajo salivares. El grupo 5, fue el que mayor número de pacientes presentó (n=19), lo que se correspondió con el 25% de la muestra; los grupos 1 y 2 (Agrupación I), mostraron patrones similares al grupo control y, como tal, presentaron asociaciones con patrones de mejor pronóstico clínico. Como objetivamos tras el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la localización laríngea del tumor primario, los tumores glóticos presentaron estimaciones mejores de supervivencia que los supraglóticos, probablemente relacionados con la menor capacidad metastásica de los mismos y el diagnóstico más precoz por la aparición del síntoma disfonía.

La agrupación I mostró una asociación con los tumores glóticos, presentando el 54,8% de pacientes con este tumor, este patrón salivar. A su vez, se asoció de forma estadísticamente significativa con otros parámetros clínicos de buen pronóstico: el 63,6% de los pacientes en estadio precoz de la enfermedad (EI-EII), el 54,8% de los pacientes con buena diferenciación anatomopatológica y el 65,6% de los pacientes con tamaño tumoral T1y T2 se asociaron a este grupo. A su vez, la agrupación II se asoció con parámetros clínicos de peor pronóstico como estadios avanzados de la enfermedad (74,4%), tumores de localización supraglótica (61,5%), tumores con mala diferenciación anatomopatológica (67,4%) y tamaños tumorales T3y T4 (70,7%). No se estableció asociación significativa entre los grupos salivares y la presencia de adenopatías metastásicas cervicales y signos de progresión de la enfermedad como la recidiva locoregional.

En la estimación de la SG, mediante el método Kaplan-Meier, se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Los pacientes con un patrón salivar incluido en el grupo 1 presentaron las estimaciones más elevadas de supervivencia con 60,92 meses, en contra de los pacientes del grupo 4 que presentaron estimaciones de 25,20 meses. En la comparación de los grupos por estratos, mediante el método log-Rank, se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 4, 2 y 4, y 4 con el 5, en lo correspondiente a meses estimados de supervivencia. Al prestar atención a las estimaciones de supervivencia

en las agrupaciones salivares, se apreció un decremento en la misma en los pacientes considerados como agrupación II (pacientes con asociaciones clínicas de peor pronóstico), de casi 17 meses con respecto a los incluidos en la agrupación I, con una significación de 0,044 mediante el método log-Rank. En el análisis multivariante mediante el método “backward o hacia atrás”, se determinó la importante influencia de los perfiles salivares proteómicos en la SG, comparándose con otras variables tan importantes como la presencia de adenopatías metastásicas, el estadio tumoral o el grado de comorbilidad mediante el estudio ASA. En función de los resultados obtenidos, los pacientes que presentaron un patrón de agrupación II, tras la detección de proteínas con sondas ABPP, incrementaron el riesgo de éxitus en 3,3 veces sobre los pacientes con agrupación I ($p=0,008$).

Las altas tasas de recurrencias locoregionales en los CECC, plantean un gran desafío tanto para los oncólogos clínicos, como para los cirujanos especialistas. La falta de biomarcadores que puedan predecir la agresividad de la enfermedad y el riesgo de progresión de la misma, hacen el escenario aún más sombrío, limitando las decisiones terapéuticas a los parámetros clinicopatológicos clásicos. Sin embargo, en la consulta diaria, vemos que tumores con características clínicas similares pueden diferir en la evolución de la enfermedad (Batía y cols., 2012). Con los medios empleados actualmente, no hemos podido concluir que las sondas salivares tengan un valor pronóstico para la identificación de pacientes con riesgo de progresión de la enfermedad, puesto que no se apreciaron diferencias significativas entre agrupaciones salivares ($p=0,086$) para la estimación de SLE, sin embargo en la gráfica de Kaplan-Meier pudimos estimar una tendencia de los pacientes con agrupación I a permanecer durante más tiempo sin progresión de enfermedad.

Lo expuesto en este apartado nos puede hacer reflexionar sobre la importancia de las sondas salivares FP-TAMRA (accesibles e inocuas) como método complementario en el complicado proceso de clasificación pronóstica de los pacientes de CECC. Dejando a un lado la faceta diagnóstica o de cribado de esta prueba, que veremos en el próximo apartado, el patrón salivar nos puede aportar información adicional y relevante del comportamiento biológico del tumor y, por lo tanto, de la evolución y la supervivencia en el momento diagnóstico. Pacientes que por su perfil de proteínas basados en la actividad ABPP se agrupan en el patrón I, se podrían asociar a

mejores estimaciones de supervivencia que pacientes agrupados en el patrón II, complementando los parámetros clínicopatológicos actuales.

Validez diagnóstica de las sondas FP-TAMRA: diagnóstico en etapas tumorales precoces

En nuestro estudio, podemos apreciar (Tabla 103), como disminuye la estimación de la SG, a medida que progresa el estadio clínico, lo que justifica nuestra búsqueda de marcadores capaces de realizar un diagnóstico en fase precoz. Con el fin de conseguir una mejora sustancial en estos aspectos, tenemos que investigar en la detección de lesiones malignas de pequeño tamaño, en el proceso que conocemos como prevención secundaria. Según Essener y cols. (2007), mediante la prevención primaria y secundaria, podría prevenirse o curarse una estimación del 50% de los cánceres.

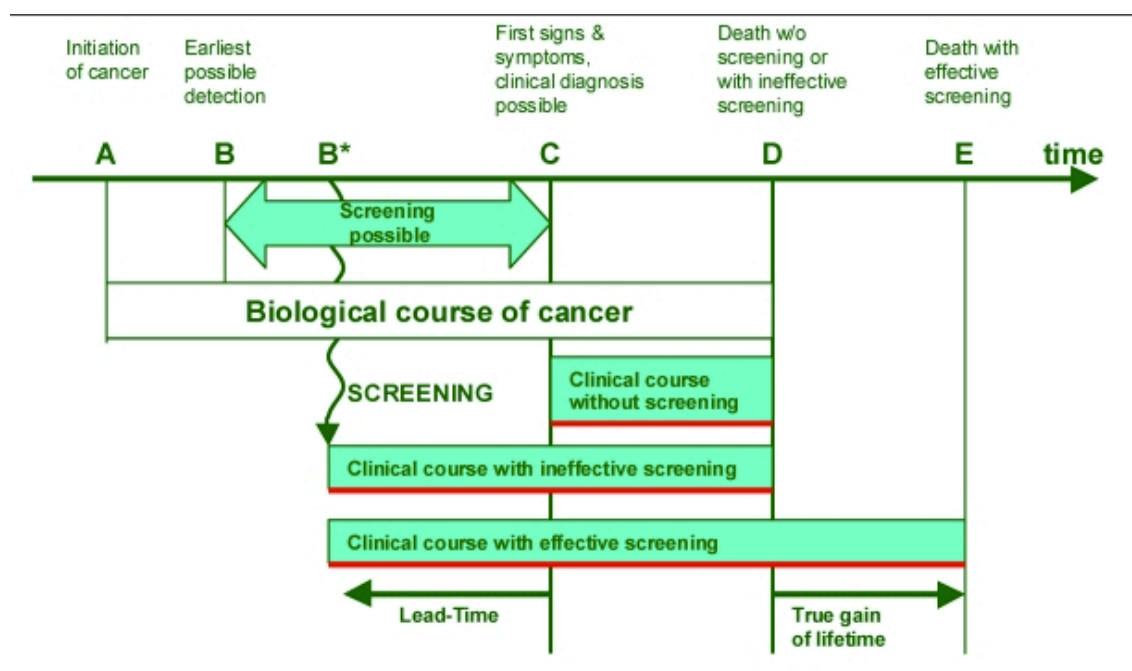
Como es conocido, el objetivo de la prevención es reducir el número de pacientes con cáncer. La Sociedad Española de Oncología Médica (del Barco y cols., en línea) menciona que es imprescindible avanzar hacia el objetivo final que debe ser la prevención de todas las formas de cáncer, puesto que la mayoría de los tumores son debidos a factores exógenos, sin dejar de considerar la carga debida a la predisposición genética. Es lo que se conoce como prevención primaria, trabajar en reducir la incidencia a través de la disminución de la exposición de determinados factores etiológicos. Para ello, la Organización Mundial de la salud (OMS), redacta de forma periódica el Código Europeo Contra el Cáncer (CECC), cuya última versión es la de 2014 (en línea), con el objetivo de reducir la prevalencia de los factores de riesgo y la incidencia del cáncer mediante la adopción de medidas de promoción y protección de la salud y prevención de la enfermedad.

En nuestro estudio, nos hemos centrado en el trabajo sobre la prevención secundaria o, lo que es lo mismo, en la detección incipiente de tumores en personas previamente sanas (grupo control) en las cuales, mediante una intervención, se pueda modificar la historia natural de la enfermedad (distancia B-C, Figura).

Tabla 103. Etapas clínicas y porcentaje de supervivencia global, en el cáncer faringolaríngeo de nuestra serie.

	N0	N1	N1-N3
T1	EI (>90%)	EIII (56%)	
T2	EII (>80%)		
T3			
T4	EIV (36,6%)		

Figura. Efectos de la detección preventiva del cáncer. Giersiepen y cols. (2007).



La aplicación de enfoques de cribado y detección precoz es de suma importancia para reducir la morbilidad y la mortalidad asociada al cáncer faringolaríngeo. Hasta el momento se han publicado resultados satisfactorios de biomarcadores sensibles y específicos para el cáncer oral, con datos alentadores para la detección, el diagnóstico, estadificación y seguimiento de esta enfermedad; sin embargo, no existen referencias publicadas para el cáncer faringolaríngeo (Shah y cols., 2005).

El uso de saliva para la detección del cáncer oral o de diagnóstico está todavía en su infancia. Su uso comenzó después de un informe de un pequeño estudio en

Taiwán por Liao y cols.,(2000) que afirmó que el exón 4 codón 63 del gen p53 está mutado en el ADN de saliva de cinco de ocho (62,5%) pacientes con cáncer bucal. Cinco de 27 sujetos de control (18,5%) tenían mutaciones similares en su gen p53. El-Naggar y cols. (2001) demostraron la heterogeneidad genética en la saliva de los pacientes con CECC y sugirieron el uso de células epiteliales en la saliva de los pacientes con CECC para el análisis genético . Wong (2006) publica cifras de validez diagnóstica predictiva de los biomarcadores salivares combinados ARNm para el cáncer oral de un área bajo la curva ROC del 95%, Sensibilidad y Especificidad del 91%.

Bajo la premisa de que “las aberraciones genéticas de las células cancerosas llevan a alteraciones en los patrones de expresión de genes, que pueden ser identificados mucho antes de que se manifiestan los fenotipos resultantes del cáncer” (Sidransky y cols., 2002), comenzamos a investigar en el campo de los biomarcadores proteicos en las sondas salivares. La transición de una célula normal a una célula tumoral incluye cambios significativos en la expresión de proteínas celulares; esto afecta a la propia célula cancerosa, pero también afecta a las células normales circundantes de los vasos sanguíneos, del tejido conectivo y a la infiltración de células inflamatorias. Estos cambios se manifiestan mediante cambios en las proteínas circulantes en el suero en todo el cuerpo (Gerstner, 2008) .

Mediante la proteómica pretendemos identificar biomarcadores individuales que permitan detectar la presencia o la recurrencia de un cáncer, con el objetivo de ayudar en la detección, estadificación inicial, y el seguimiento de pacientes con CECC. Por lo anteriormente expuesto, con los Biomarcadores proteómicos tratamos de abrir la puerta a la medicina tumoral personalizada en un futuro próximo, de tal forma, que podamos complementar sistemas de clasificación y pronóstico generalizados como el TNM, con otros encaminados al conocimiento de la biología tumoral.

Para el análisis de la validez diagnóstica de las sondas salivares, se calculó inicialmente el área bajo la curva ROC (AUC) de cada una de las bandas estudiadas, para la representación gráfica de la Sensibilidad, frente 1-Especificidad. Tomamos como valores cuantitativos, los resultados del porcentaje relativo de intensidad de cada una de las bandas según la fórmula: PRP/PRC, y como prueba “gold standart”, para establecer el estado enfermo (patología tumoral) o sano (no enfermedad tumoral) los resultados de la anatomía patológica. El punto de corte óptimo se

determinó, para cada banda, mediante el análisis del índice de Yoiden (IY) o punto máximo de Sensibilidad y Especificidad. Como otros autores, aunque el AUC es el índice global más comúnmente utilizados, el IY es también frecuentemente usado en la práctica médica y determina el corte óptimo del marcador (Aoki y cols., 1997, Bao y cols., 2008). Los mejores resultados se obtuvieron del análisis de la banda 33, con un AUC de 0,80, Sensibilidad de 77,2 y Especificidad de 70,0. Con el fin de conseguir mejores resultados de Sensibilidad, o lo que es lo mismo, incrementar la capacidad del test para detectar la enfermedad, se realizaron dos supuestos. El supuesto 1, fue el que mejores resultados obtuvo para la utilización de las bandas salivares como diagnóstico del CECC; usando las bandas 33, 62-65 y 80, dos resultados patológicos en algunas de las mismas fueron necesarios para determinar una prueba como positiva, obteniendo unos valores de Sensibilidad del 83,1% y de Especificidad del 63,5%.

Mediante el análisis estadístico ANOVA, se estableció la importancia de las bandas salivares para el diagnóstico del CECC en etapas precoces. Se establecieron diferencias significativas ($p=0,001$) entre el grupo control y pacientes con estadios iniciales de la enfermedad para las bandas 33 y 80. Este hecho cobra importancia por la capacidad que adquiere este test para la identificación de enfermedad en pacientes con factores de riesgo. Como publicó Gersnest (2008), la supervivencia y la calidad de vida en los pacientes diagnosticados de CECC están directamente relacionados con el tamaño del tumor primario (T) en la primera detección.

Evolución y seguimiento de pacientes con CECC

Desde finales de los años ochenta, los avances en el tratamiento del CECC, principalmente asociados a técnicas quirúrgicas más innovadoras y a tratamientos multimodales dirigidos a la preservación de órganos, han producido una mejora en la calidad de vida de los pacientes (Allegra y cols, 2012). Sin embargo, a pesar de todos estos avances la supervivencia global de los pacientes con estadio avanzado no ha mejorado (Hoffman y cols, 2006).

Actualmente, uno de los problemas que más preocupa al médico Otorrinolaringólogo es el seguimiento de los pacientes con CECC previamente tratados. Una de las aplicaciones con más utilidad para la práctica clínica diaria en los

pacientes con carcinoma epidermoide faringolaringeo y que ocupa a muchos investigadores, es la identificación de biomarcadores con capacidad para controlar la evolución durante el seguimiento y de predecir los pacientes con mayor riesgo de desarrollar recurrencias o metástasis a distancia. En consulta, nos encontramos con dificultades en la exploración física directa de los pacientes que han recibido tratamiento con quimioterapia y/o radioterapia, ya que los tejidos afectados presentan signos inflamatorios secundarios que distorsionan y complican su visualización.

En nuestro estudio, hemos presentado cuatro casos de pacientes con diagnóstico anatomopatológico de CECC tratado mediante cirugía, en los que se refleja las diferentes aplicaciones de las sondas salivares durante su seguimiento. En los dos pacientes en los que se tomaron muestras salivares de forma previa a la cirugía y en el mes ulterior a la misma, se apreció una clara diferencia en el patrón de organización de las bandas salivares, principalmente en la franja comprendida entre la banda 33 y la 70. La representación de las bandas en los geles posteriores a la cirugía mostraron un claro patrón de características similares al grupo control. Estas dos muestras, nos han servido como modelo para el diseño de un nuevo proyecto que tenga como objetivo la evaluación del seguimiento de los pacientes intervenidos de CECC en nuestro servicio, realizando análisis salivares en el primer, tercer y sexto mes tras la cirugía.

En los otros dos pacientes en los que se analizó la saliva previamente a la cirugía y, de forma posterior, como parte de la exploración y reconocimiento durante los meses siguientes, se encontró un patrón de características similares al inicial que sugirió la presencia de enfermedad. Tras el estudio radiológico y anatomopatológico se confirmó el diagnóstico de recidiva locoregional en ambos casos. Creemos que esta aplicación puede presentar un nuevo complemento a los métodos ya utilizados como el PET-TC que en nuestra experiencia parece presentar demasiados falsos positivos, ensombreciendo la validez global de la misma; el TC, la exploración física fibrolaringoscópica y la anatomía patológica invasiva, en el tortuoso y difícil diagnóstico de la progresión de la enfermedad en pacientes previamente tratados mediante cirugía y/o quimioradioterapia. Pocas citas se pueden encontrar en la bibliografía médica relacionada con la identificación de biomarcadores para el seguimiento de los pacientes con cáncer epidermoide faringolaringeo.

Dentro de la búsqueda del conocimiento particular y personalizado del comportamiento del CECC, diseñamos una Tabla en la que las variables que se tuvieron en cuenta fueron los factores pronósticos hasta ahora conocidos como el estadio tumoral y la evolución que tuvieron los pacientes en función de la progresión o no de la enfermedad primaria y la supervivencia o éxitus. El objetivo no era otro que personalizar a cada tipo de cáncer independientemente de los factores pronósticos conocidos, de tal manera que nuestro método a estudio (sondas salivares) fueran capaces de identificar pacientes inicialmente clasificados como con buen pronóstico y que a su vez presentaron una mala evolución. Atendiendo a los resultados obtenidos, resulta significativa la asociación de la agrupación 1 (G1+G2), con el grupo evolutivo MP/BE, o lo que es lo mismo, pacientes que “a priori” presentan factores pronósticos conocidos malos, pero que evolucionan favorablemente. La agrupación 1 se asocia de forma significativa con pacientes con buen pronóstico y buena evolución, mientras que la agrupación 2 con pacientes con mal pronóstico y mala evolución.

Proteómica en el CECC

La proteómica se ha aplicado a los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello distantes a la cavidad oral (Bigler y cols., 2009). Castagnola y cols., (2009), revisaron algunos de las proteínas involucradas en procesos oncológicos (Tabla).

Tabla. Proteínas involucradas en patologías oncológicas (Castagnola y cols., 2009).

Autor, año	Proteínas involucradas	Proteínas implicadas	no	Localización del tumor
Oshiro y cols., 2007	Alfa1-B-glicoproteína Proteínas del factor del complemento B	Cistatina S Factor parotídeo	secretor	Cabeza y Cuello
Dowling y cols., 2008	Beta Fibrina Transferrina Cadena pesada IG			Cabeza y Cuello

	Cofilina -1 S100 proteína unión del Ca	
Mizukawa y cols., 2001	Alfa defensinas Beta defensinas	Cavidad Oral
Pickering y cols., 2007	Endotelinas	Cavidad Oral
Wong, 2006	Interleucquina 8 (IL-8) Tiredoxina	Cavidad Oral

Somos de la opinión, de que la evaluación de los niveles de proteínas, pueden constituir biomarcadores potenciales de lesiones malignas de cabeza y cuello. En nuestro estudio, hemos podido objetivar cambios cualitativos y cuantitativos en los patrones de distribución proteómica de pacientes controles y con enfermedad tumoral faringolaríngea. El análisis salivar en cáncer de orofaringe ha sido ampliamente estudiado por varios autores; sin embargo, el proteoma salival en neoplasias de laringe ha sido poco analizado. Una de las líneas que nos proponemos seguir en la actualidad y que consideramos un punto de partida en la identificación de biomarcadores para el cáncer de laringe, es la identificación de las proteínas albergadas en la banda 33 de nuestras sondas salivares, para cuantificar y estudiar su comportamiento, con el fin de establecer marcadores proteómicos novedosos en este tipo de cáncer que ayuden a la predicción y comportamiento de la enfermedad, al mismo tiempo que nos sirvan de ayuda para su detección en fases precoces.

6. Conclusiones

*Cuando una persona desea realmente algo,
el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño...*

Paulo Coelho, El Alquimista.

1. Existen diferencias en los perfiles proteómicos salivares asociados al tamaño tumoral (T), al estadio clínico y al grado de diferenciación anatomopatológico.
2. Los análisis de las sondas salivares, aportan datos predictores de la evolución y seguimiento en los pacientes con CECC y, pueden ofrecer información complementaria a los factores pronósticos clásicos ya conocidos.
3. De los resultados obtenidos se puede concluir que el marcaje de saliva con sondas ABPP tiene potencial para el desarrollo de programas de cribado que ayuden al diagnóstico en fases precoces de la enfermedad en pacientes con alto riesgo.
4. La estimación de supervivencia global de los pacientes con cáncer faringolaríngeo de nuestra serie es de 47,40 meses, con una supervivencia del 53,4% a los 5 años.
5. La estimación de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con cáncer faringolaríngeo de nuestra serie es de 55,43 meses, con una supervivencia sin enfermedad del 67,8% a los 5 años.
6. La presencia de adenopatías metastásicas se ha mostrado como el factor más determinante en la supervivencia global, en el análisis multivariante, seguida del estadio clínico, la determinación del perfil proteómico salivar y, de la presencia de comorbilidades asociadas.

7. Proyectos de Futuro

Siempre hacia delante...

Eulalia Hernández

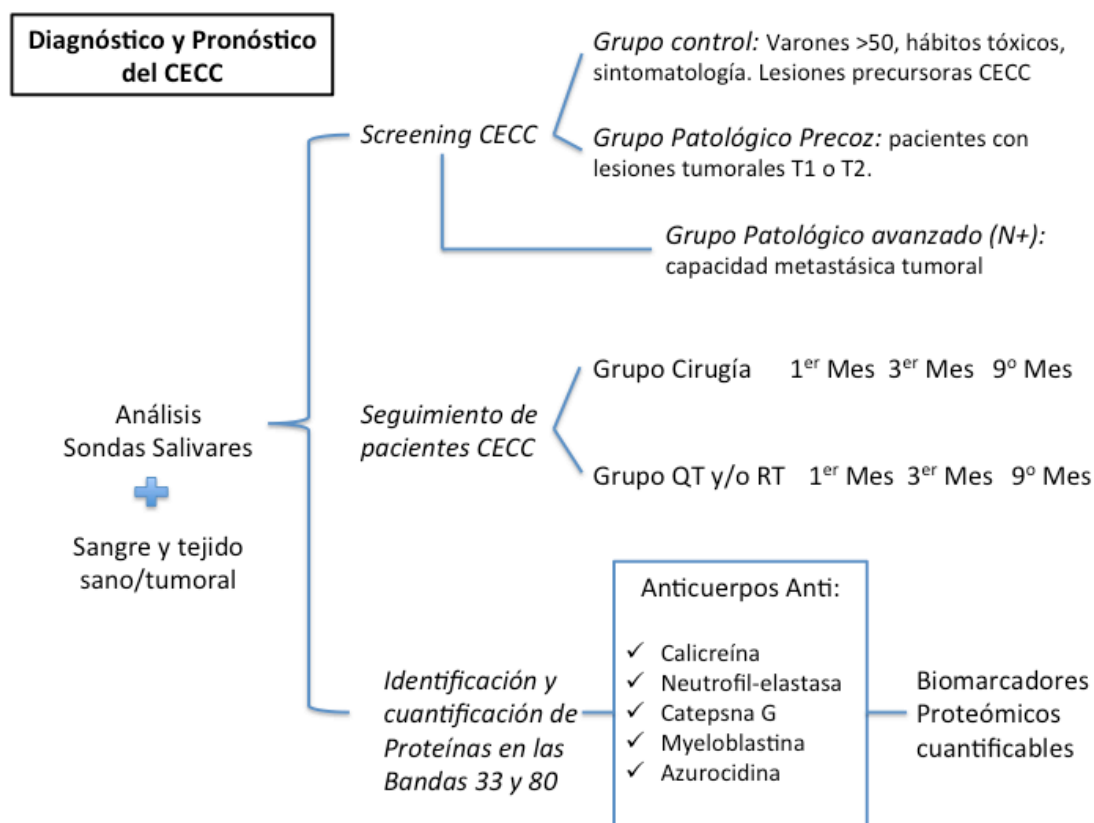
Nuestro trabajo forma parte de la investigación conjunta llevada a cabo por los Servicios de Otorrinolaringología y Análisis Clínicos (Laboratorio de Terapia Molecular y Biomarcadores de Cáncer) desde 2.008; no pretende ser un texto aislado, sino una línea creciente diseñada para el conocimiento de la biología tumoral. Actualmente, mantenemos dos proyectos en vigor: el primero, relacionado con el análisis de la actividad Acetilcolinesterasa (AChE) y Butirilcolinesterasa (BChE) en tejido sano y tumoral de pacientes con CECC, nos ha permitido elaborar dos artículos publicados en revistas con Factor de Impacto (JCR): BMC Cancer (“Dysregulated cholinergic network as a novel biomarker of poor prognostic in patients with head and neck squamous cell carcinoma”, 2015) e Internacional Immunopharmacology (“Unbalanced acetylcholinesterase activity in larynx squamous cell carcinoma”, 2015); y el segundo, relacionado con la capacidad diagnóstica y pronóstica de las sondas salivares que nos atañe.

A raíz de los buenos resultados obtenidos en los análisis de las sondas salivares con actividad ABPP, para el diagnóstico de pacientes con CECC en estadios precoces de la enfermedad y, para el seguimiento y evolución de los mismos, nos proponemos continuar en la misma línea de trabajo enfocada en los siguientes puntos:

- **Screening de CECC:** diseñar líneas de trabajo paralelas entre diferentes grupos previamente establecidos; un primer grupo constituido por pacientes sanos con alto riesgo de desarrollar CECC (varones mayores de 50 años de edad, con hábito moderado severo tabáquico y alcohólico y con presencia de disfonía). Un segundo grupo con pacientes que presenten lesiones pretumorales de cabeza y cuello (leucoplasia, eritroplasia, hiperplasia y displasia) y, un último grupo, constituido por pacientes que presenten lesiones tumorales de cabeza y cuello en fases precoces o iniciales (T1).
- **Capacidad metastásica del CECC:** la presencia de adenopatías metastásicas constituye el principal factor pronóstico en los pacientes con CECC. Nos proponemos seleccionar cohortes de pacientes con N+ vs N0, con el fin de identificar cambios en la expresión de proteínas que nos ayuden en su predicción.

- **Seguimiento en CECC:** evaluar periódicamente a los pacientes tratados de CECC, mediante las diferentes alternativas terapéuticas (cirugías, organopreservación mediante RT y/o QT), con el fin de detectar cambios que nos alerten de la posibilidad de progresión de enfermedad en forma de persistencia, recidiva o metástasis tumoral.
- **Identificación del Proteoma de las sondas salivares:** los avances en las técnicas relacionadas con la proteómica en los últimos años, han permitido la cuantificación de las proteínas para establecer Biomarcadores tumorales en el CECC. Otro de los objetivos que nos proponemos es la identificación de las proteínas de las bandas que mejores resultados han presentado en las pruebas de validación (Banda 33, 62-65 y 80). Estudios preliminares parecen relacionar estas bandas con las siguientes proteínas: Calicreína, Neutrofil-elastasa, Myeloblastina, Catepsina G y Azurocidina, por lo que análisis más específicos con anticuerpos contra dichas proteínas podrían ser útiles en su detección y posterior cuantificación.

Figura 120. Representación de las líneas de trabajo futuras, en investigación con sondas salivares, muestras de sangre y tejidos.



8. Bibliografía

Cuando bebas agua, recuerda la fuente...

Proverbio chino

Acetaldehyde. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 1985;36:101-32.

Adam DJ, Milne AA, Evans SM, Roulston JE, Lee AJ, Ruckley CV et al. Serum amylase isoenzymes in patients undergoing operation for ruptured and non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 1999;30:229-35.

Adrien J, Bertolus C, Gambotti L, Mallet A, Baujat B. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. *Oral Oncol.* 2014;50(2):90-7.

Agrawal N, Ha PK. Management of early-stage laryngeal cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 2008;41(4):757-69.

Akduman D, Karaman M, Uslu C, Bilaç O, Türk O, Deniz M, Durmuş R. Larynx cancer treatment results: survive and quality of life assessment. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg.* 2010;20(1):25-32.

Akoğlu E, Dutipek M, Bekiş R, Değirmenci B, Ada E, Güneri A. Assessment of cervical lymph node metastasis with different imaging methods in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol.* 2005;34(6):384-94.

Alexander JP, Cravatt BF. Mechanism of carbamate inactivation of FAAH: implications for the design of covalent inhibitors and in vivo functional probes for enzymes. *Chem Biol* 2005;12:1179-87.

Alexander JP, Cravatt BF: The putative endocannabinoid transport blocker LY2183240 is a potent inhibitor of FAAH and several other brain serine hydrolases. *J Am Chem Soc* 2006;128:9699-704.

Almeida AÁ, Bandeira CM, Gonçalves AJ, Araújo AJ. Nicotine dependence and smoking habits in patients with head and neck cancer. *J Bras Pneumol.* 2014;40(3):286-93.

Altman D.G., Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 1994;(308)552

Altman D.G., Bland J.M. Statistics Notes: Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ* 1994;(309)102

Altuna X, Hneriquez M, Zulueta A, Veja JC, Algaba J. Palpacion y TC para evaluar las adenopatías cervicales en los tumores de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004;55:182-9.

Alvi A, Johnson JT. Development of distant metastasis after treatment of advanced-stage head and neck cancer. *Head Neck* 1997;19:500–5.

American Cancer Society: Cancer facts & figures 2013. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2013.

Andrea C, Elizabeth K, Roa B, Tagle J. Cáncer de Laringe: Revisión. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* 192.2009.

Aoki K, Misumi J, Kimura T, Zhao W, Xie T. Evaluation of cutoff levels for screening of gastric cancer using serum pepsinogens and distributions of levels of serum pepsinogen I, II and of PG I/PG II ratios in a gastric cancer case-control study. *Journal of Epidemiology*. 1997;7(3),143-51.

Arias F, Villafranca E, Dueñas M.T, Vera R. Factores pronósticos en el carcinoma de cabeza y cuello. *Anales Sis San Navarra* 2000;24:73-81.

Arsheed HH, Imtiyaz HH, Sultan AP .Premalignant lesions of the larynx and their management. *Otorhinolaryngology Clinics. An International Journal*. 2010;2:161-5.

Atula TS, Grénman R, Varpula MJ, Kurki TJ, Klemi PJ. Paplaption, ultrasound ultrasound-guided fine-ne- edle aspiration cytology in the assess- ment of cervical lymph node status in head and neck cancer patients. *Head Neck* 1996;18:545-51.

Bao Y, Lu J, Wang C, Yang M, Li H, Zhang X, Zhu J, Lu H, Jia, W, Xiang K. Optimal

waist circumference cutoffs for abdominal obesity in Chinese. *Atherosclerosis*. 2008;201,378-84.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *Pathology & Genetics. Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours*. Lyon: IARC-press; 2005.

Baron AE, Franceschi S, Barra S, Talamini R, La Vecchia C. A comparison of the joint effects of alcohol and smoking on the risk of cancer across sites in the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1993;2:519-23.

Barroso R, Ribeiro E, Fernandes E. Significado pronóstico de las metástasis cervicales en tumores avanzados de laringe e hiofaringe. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2012;63:292-8.

Bathia R, Bahadur S. Distant metastasis in malignancies of the head and neck. *J Laryngol Otol* 1987;101:925–8.

Bhatia S, Frangioni JV, Hoffman RM, Iafrate AJ, Polyak K. The challenges posed by cancer heterogeneity. *Nat Biotechnol*. 2012;10,30(7):604-10.

Baughan LW, Robertello FJ, Sarrett DC, Denny PA, Denny PC: Salivary mucin as related to oral *Streptococcus mutans* in elderly people. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:10-14.

Becker MT, Shores CG, Yu KK, et al. Molecular assay to detect metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Oto-laryngol Head Neck Surg*. 2004;130(1):21–7.

Bergman SA, Ord RA, Rothman M. Accuracy of clinical examination vs computed tomography in detecting occult lymph node involvement in patients with oral epidermoid carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52:1236-9.

Bernal-Sprekelsen M, Dazert S, Sudhoff H, Blanch JL, Vilaseca I. Complications of transoral laser surgery for malignant tumors of the larynx and hypopharynx. *Laryngolrhinootologie*, 2009;88(1):28-34.

Bień S, Kamiński B, Zyłka S, Mezyk R, Piasta Z. Evolution of the epidemiology and clinical characteristics of larynx and hypopharynx carcinoma in Poland from 1991 to 2001. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008;2658(1):39-46.

Bigler LR, Streckfus CF, Dubinsky WP. Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity. *Clin Lab Med.* 2009;29:71–85.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, PrestonMartin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48:3282-7.

Boeing H, Dietrich T, Hoffmann K, Pischon T, Ferrari P, Lahmann PH, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Allen N, Key T, Skeie G, Lund E, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Jensen MK, Rohrmann S, Linseisen J, Trichopoulou A, Bamia C, Psaltopoulou T, Weinehall L, Johansson I, Sánchez MJ, Jakszyn P, Ardanaz E, Amiano P, Chirlaque MD, Quirós JR, Wirfalt E, Berglund G, Peeters PH, van Gils CH, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Berrino F, Palli D, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Norat T, Jenab M, Riboli E. Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: the prospective EPIC-study. *Cancer Causes Control.* 2006;17:957-69.

Boing AF, Antunes JL, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr; Head and Neck Genome Project/GENCAPO, Eluf-Neto J, Boffetta P, Wünsch-Filho V. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health.* 2011;65:709-14.

Bondi S, Giordano L, Limardo P, Bussi M. Role of Montgomery salivary stent placement during pharyngolaryngectomy, to prevent pharyngocutaneous fistula in high-risk patients. *J Laryngol Otol.* 2013;127(1):54-7.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck.

N Engl J Med. 2006;354:567-78.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2006;354:567-78.

Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR et al.: Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. Am J Surg 1994;168:429-32.

Bradley PJ, Rinaldo A, Suárez C, Shaha AR, Leemans CR, Langendijk JA, Patel SG, Ferlito A. Primary treatment of the anterior vocal commissure squamous carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2006;263(10):879-88.

Bravi F, Bosetti C, Filomeno M, Levi F, Garavello W, Galimberti S, Negri E, La Vecchia C. Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. Br J Cancer. 2013;26;109(11):2904-10.

Brennan PA, Dennis S, Poller D, Quintero M, Puxeddu R, Thomas GJ. Inducible nitric oxide synthase: correlation with extracapsular spread and enhancement of tumor cell invasion in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2008;30:208-14.

Brenner B, Marshak G, Rakowsky E, Severo J, Sulkes A, Gutman H. Laryngeal carcinoma. Epidemiological and clinical features. Experience of the Rabin Medical Center in Israel. Oncol Rep. 2001;8:141-4.

Broders AC. Carcinoma. Grading and practical application. Arch Pathol 1926;2: 376-81.

Bruguere J, Guenel P, Leclerc A, Rodríguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cáncer of larynx, pharynx and mouth. Cancer 1986;57:391-5.

Burduk PK. Association between infection of virulence cagA gene Helicobacter pylori and laryngeal squamous cell carcinoma. Med Sci Monit. 2013 17;19:584-91.

Busquets JM, García HA, Trinidad-Pinedo J, Baez A. Clinicopathologic characteristics of head and neck squamous cell carcinoma in Puerto Ricans. *P R Health Sci J.* 2003;22(3):259-64.

Campisi G, Giovannelli L, Arico P. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:705-11.

Cancer facts and figures 2006. Atlanta,: American Cancer Society; 2006.

Carvalho M. Quantitative analysis of the extent of extracapsular invasion and its prognostic significance: a prospective study of 170 cases of carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Head Neck.* 1998;20:16-21.

Castagnola M, Picciotti PM, Messana I, Fanali C, Fiorita A, Cabras T, Calò L, Pisano E, Passali GC, Iavarone F, Paludetti G, Scarano E. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2011;31(6):347-57.

Cattaruzza MS, Maisonneuve P, Boyle P. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32(5):293-305.

Cavenee WK, White RL. The genetic basis of cancer. *Sci AM.* 1995;272:72-9.

Chaita TM, Graham SM, Maxwell SM, Sirivasin W, Sabchareon A, Beeching NJ: Salivary sampling for hepatitis B surface antigen carriage: a sensitive technique suitable for epidemiological studies. *Ann Trop Paediatr.* 1995;15:135-9.

Chauhan SS, Kaur J, Kumar M, Matta A, Srivastava G, Alyass A, Assi J, Leong I, MacMillan C, Witterick I, Colgan TJ, Shukla NK, Thakar A, Sharma MC, Siu KW, Walfish PG, Ralhan R. Prediction of recurrence-free survival using a protein expression-based risk classifier for head and neck cancer. *Oncogenesis.* 2015;20;4:147.

Chen AY, Fedewa S, Zhu J. Temporal trends in the treatment of early- and advanced-stage laryngeal cancer in the United States, 1985-2007. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2011;137(10):1017-24.

Chen AY, Matson LK, Roberts D, Goepfert H. The significance of comorbidity in advanced laryngeal cancer. *Head Neck*. 2001;23(7):566-72.

Cheng YS, Rees T, Wright J. A review of research on salivary biomarkers for oral cancer detection. *Clin Transl Med*. 2014 Feb 24;3(1):3.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta*. 2007;383(1-2):30-40.

Choby GW, Albergotti WG, Byrd JK, Egloff AM, Johnson JT. Factors contributing to recurrence of oral cavity and laryngeal tumors and estimation of tumor age. *Laryngoscope*. 2014;124(10):2297-304.

Chu MM, Kositwattanarerk A, Lee DJ, Makkar JS, Genden EM, Kao J, Packer SH, Som PM, Kostakoglu L. FDG PET with contrast-enhanced CT: a critical imaging tool for laryngeal carcinoma. *Radiographics*. 2010;30(5):1353-72.

Claudia Andrea Paré, Karina Elizabeth Paré, Beatriz Vanesa Roa Sanabria, Juan Francisco Tagle Dr. Armando Pedro Chamorro. Cancer de laringe: Revision. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*.192–Abril 2009.

Close LG, Merkel M, Vuitch MF, Reisch J, Schaefer SD. Computed tomographic evaluation of regional lymph node involvement in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Head Neck* 1989;11:309-17.

Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Takes RP, Silver CE, Paccagnella D, Rinaldo A, Hinni ML, Ferlito A. Relationship between reflux and laryngeal cancer. *Head Neck*. 2013 ;35(12):1814-8.

Cohen M.A., Nassif R., Goldstein DP, et al. Recurrent Laryngeal Cancer. In: Hishman M., Mehonna K., Kian A, editors. *Head and neck cancer recurrence: evidence-based, multidisciplinary management*. Ed.Thieme;2012.

Cojocariu OM, Huguet F, Lefevre M, Périé S. Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers. *Bull Cancer*. 2009;96(4):369-78.

Colville-Nash PR, Willoughby DA. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today* 1997;3:14-23.

Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2008;15;122(12):2811-9.

Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*. 2009;31(6):748-58.

Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, Kim HE, Cmelak AJ, Rotman M, Machtay M, Ensley JF, Chao KS, Schultz CJ, Lee N, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 9501/Intergroup. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2004;6;350(19):1937-44.

Cosetti M, Yu GP, Schantz SP. Five-year survival rates and time trends of laryngeal cancer in the US population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;134(4):370-9.

Cravatt BF, Wright AT, Kozarich JW: Activity-based protein profiling: from enzyme chemistry to proteomic chemistry. *Annu Rev Biochem* 2008, 77:383-414. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.101304.124125:383-414.

Dalmau Galofre J, Murcia Puchades V, Faubel Serra M, Artazkoz Del Toro JJ. Cervical dissection in laryngeal cancer: our experience of 15 years. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1996;47(1):43-9.

Datema FR, Ferrier MB, van der Schroeff MP, Baatenburg de Jong RJ. Impact of comorbidity on short-term mortality and overall survival of head and neck cancer patients. *Head Neck*. 2010;32(6):728-36.

Davies L, Welch HG Epidemiology of head and neck cancer in the United

States. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;135:451–7.

De Bree R. Early detection of laryngeal carcinoma: limited improvement possible. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2011;155:3045.

De Juan J, García J, López M, Orús C, Esteller E, Quer M, León X. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;139(5):483-8.

De Juan J, García J, López M, Orús C, Esteller E, Quer M, León X. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;139(5):483-8.

De Menezes RF, Bergmann A, Thuler LC. Alcohol consumption and risk of cancer: a systematic literature review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14:4965-72.

Dequanter D, Lothaire P, Zouaoui K, Brohée D. Epidemiology and clinical characteristics of larynx and hypopharynx carcinoma: a comparative study in the Hainaut and review of the literature. *Acta Chir Belg.* 2012;112(6):423-5.

Dowling P, Wormald R, Meleady P, et al. Analysis of the saliva proteome from patients with head and neck squamous cell carcinoma reveals differences in abundance levels of proteins associated with tumour progression and metastasis. *J Proteomics.* 2008;71:168–75.

Drobitch RK, Svensson CK: Therapeutic drug monitoring in saliva. An update. *Clin Pharmacokinet* 1992,23:365-79.

Du LB, Mao WM, Chen WQ, et al. Incidence and mortality of larynx cancer in China during 2003-2007. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2012;33:395-8.

El-Medany OM, El-Din Abdel Wahab KS, bu Shady EA, Gad El-Hak N: Chronic liver disease and hepatitis C virus in Egyptian patients. *Hepatogastroenterology* 1999,46:1895-1903.

Ellis L, Rachet B, Birchall M, Coleman MP. Trends and inequalities in laryngeal cancer survival in men and women: England and Wales 1991-2006. *Oral Oncol.* 2012;48(3):284-9.

Emmons W: Accuracy of oral specimen testing for human immunodeficiency virus. *Am J Med.* 1997;102:15-20.

Ereño C. La nueva clasificación de la O.M.S. 2005. Lesiones precursoras y los tumores de la laringe, hipofaringe y tráquea. *Rev Esp Patol* 2007; 40:3-10.

Ervin TJ, Clark JR, Weichselbaum RR, Fallon BG, Miller D, Fabian RL, Posner MR, Norris CM Jr, Tuttle SA, Schoenfeld DA, et al. An analysis of induction and adjuvant chemotherapy in the multidisciplinary treatment of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 1987;5(1):10-20.

Esriti A, Maurer J, Mann W. [Postoperative bleeding after laser surgery in head and neck tumors]. *Laryngorhinootologie.* 2004;83(2):102-7.

Esteban F, González MA, Ruiz I. Malignidad histopatológica y pronóstico del carcinoma de cabeza y cuello. *Medicina Oral* 1998;3(3):148-162.

Eversole LR. Dysplasia of the upper aerodigestive tract squamous epithelium. *Head Neck Pathol.* 2009;3(1):63-8.

Feller L, Chandran R, Khammissa RA, Meyerov R, Lemmer J. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ.* 2013;68(4):176-80.

Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.

Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A. Retropharyngeal lymph node metastasis from cancer of the head and neck. *Acta Otolaryngol* 2002;122:554-8.

Ferlito A, Rinaldo A, Devaney KO, et al. Detection of lymph node micrometastases in patients with squamous carcinoma of the head and neck. *Eur*

Arch Otorhinolaryngol. 2008;265(10):1147–53.

Ferlito A, Silver C, Rinaldo A, Smith R. Surgical treatment of the neck in cancer of the larynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2000;62:217-25

Ferlito A, Thompson LD, Cardesa A, Gnepp DR, Devaney KO, Rodrigo JP, Hunt JL, Rinaldo A, Takes RP. The importance of histological types for treatment and prognosis in laryngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(2):401-3.

Ferre M.J, Guallart F, Brotons S, Carrasco M, Estellés E, López R. Cáncer de hipofaringe. Análisis de la evolución y resultados del tratamiento quirúrgico. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2004;55:67-72.

Fisher SG, Gao X, Mohideen N, et al. Impact of radiotherapy on second primary cancer risk in patients treated for laryngeal cancer: A population based study (Abstr.). *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000;48:266.

Fogarty GB, Peters LJ, Stewart J, Scott C, Rischin D, Hicks RJ. The usefulness of fluorine 18-labelled deoxyglucose positron emission tomography in the investigation of patients with cervical lymphadenopathy from an unknown primary tumor. *Head Neck* 2003;25(2);138-45.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, et al. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med.* 2003;349:2091-8.

Fradis M, Podoshin L, Ben David J. Post-laryngectomy pharyngocutaneous fistula a still unresolved problem. *J Laryngol Otol.* 1995;109(3):221-4.

Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, Abnet CC. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2008;122(10):2330-6.

Freinmesser R, Freeman JL, Noyek AM, Birt BD. Metastatic neck disease. A clinical/radiographic/pathologic correlative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987;113:1307-10.

Friedman M, Roberts N, Kirshenbaum GL, Colombo J. Nodal size of metastatic squamous cell carcinoma of the neck. *Laryngoscope*. 1993;103(8):854-6

Friedman M, Shelton VK, Mafee MF, Bellity P, Grybauskas V, Skolnik E. Metastatic neck disease. *Arch Otolaryngol*. 1984;110:443-7.

Fusconi M, Gallo A, Vitiello C, Pagliuca G, Pulice G, de Vincentiis M. Clean-contaminated neck surgery: risk of infection by intrinsic and extrinsic factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132:953-7.

Ganzer U. Prognosis of laryngeal cancer since 1960. Results of a literature review and a survey. *Laryngorhinootologie*. 1990;69(1):1-5.

Gallegos JF, Paredes E, Flores R, Minauro G, Apresa T, Hernández DM. Virus del papiloma humano asociado con cáncer de cabeza y cuello. *Cir Ciruj* 2007;75:151-5.

Gallegos-Hernández J.F. Factores que impactan en el pronóstico de los pacientes con carcinoma epidermoide de la cavidad oral. *Gamo*. 2010;9:110-6.

Garavello W, Lucenteforte E, Bosetti C, La Vecchia C. The role of foods and nutrients on oral and pharyngeal cancer risk. *Minerva Stomatol*. 2009;58:25-34.

Garavello W, Turati F, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Lucenteforte E, Chiesa F, Franceschi S, La Vecchia C, Negri E. Family history of cancer and the risk of laryngeal cancer: a case-control study from Italy and Switzerland. *Int J Cancer*. 2012;130(3):665-70.

Gil Z, Fliss DM. Contemporary management of head and neck cancers. *Isr Med Assoc J*. 2009;11(5):296-300.

Gilison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol*. 2004;31:744-54.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal

association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 200;92(9):709-20

Gleich LL, Collins CM, Gartside PS, Gluckman JL, Barrett WL, Wilson KM, Biddinger PW, Redmond KP. Therapeutic decision making in stages III and IV head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003;129(1):26-35.

Gołabek W, Semczuk B, Sekuła J, Szmeja Z, Janczewski G, Kruk-Zagajewska A, Olszewski E. Results of laryngeal cancer surgery in four ENT centers in Poland. Arch Otorhinolaryngol. 1989;246(5):382-3.

Gonçalves AJ, de Souza JA Jr, Menezes MB, Kavabata NK, Suehara AB, Lehn CN. Pharyngocutaneous fistulae following total laryngectomy: comparison between manual and mechanical sutures. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2009;266(11):1793-8.

Goodwin Jr WJ. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: When do the ends justify the means? Laryngoscope. 2000;110,93:1-18.

Gourin CG, Johnson JT. A contemporary review of indications for primary surgical care of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Laryngoscope. 2009;119:2124-34.

Granados M, Luna K, Campos E, Lavin A. Cáncer de laringe: nuevas tendencias. Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello, Instituto Nacional de Cancerología de México. 2007:55-66.

Grant DG, Salassa JR, Hinni ML, et al. Transoral laser microsurgery for recurrent laryngeal and pharyngeal cancer. Otolaryngol Head Neck Surg. 2008;138:606-13.

Gras JR. Estudio comparativo de los sistemas de estadiaje en el carcinoma de cabeza y cuello. Universidad Autónoma de Barcelona, 2008.

Greenbaum D, Baruch A, Hayrapetian L, Darula Z, Burlingame A, Medzihradszky KF et al.: Chemical approaches for functionally probing the proteome. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:60-8.

Greenfield S, Aronow HU, Elashoff RM, Watanabe D. Flaws in mortality data. The hazards of ignoring comorbid disease. *JAMA*. 1988;21,260(15):2253-5.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*. 2001;51(1):15-36.

Gritz ER, Carr CR, Rapkin D, Abemayor E, Chang LJ, Wong WK, Belin TR, Calcaterra T, Robbins KT, Chonkich G, et al. Predictors of long-term smoking cessation in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2(3):261-70.

Gumusay O, Ozet A, Buyukberber S, Baykara M, Coskun U, Cetin B, Uner A, Aydil U, Benekli M. Factors predicting the development of distant metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma: A retrospective study from a single centre. *J BUON*. 2015;20(2):521-6.

Gupta J, Pilotti S, Rilke F, Shah K. Association of human papilloma- virus type 16 with neoplastic lesions of the vulva and other genital sites by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1987;127:206-215.

Hall SF, Groome PA, Irish J, O'Sullivan B. The natural history of patients with squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Laryngoscope*. 2008;118(8):1362-71.

Hartl DM, de Monès E, Hans S, Janot F, Brasnu D. Treatment of early-stage glottic cancer by transoral laser resection. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007; 116(11):832-6.

Hartl DM, Ferlito A, Brasnu DF, Langendijk JA, Rinaldo A, Silver CE, Wolf GT. Evidence-based review of treatment options for patients with glottic cancer. *Head Neck*. 2011;33(11):1638-48.

Hartl DM, Landry G, Bidault F, Hans S, Julieron M, Mamelle G, Janot F, Brasnu DF. CT-scan prediction of thyroid cartilage invasion for early laryngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013;270(1):287-91.

Hartl DM, Landry G, Hans S, Marandas P, Casiraghi O, Janot F, Brasnu DF. Thyroid cartilage invasion in early-stage squamous cell carcinoma involving the anterior commissure. *Head Neck.* 2012;34:1476-9.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;16:99:777-89.

Hernández E. Estudio de los factores pronósticos epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos y molculares en el cáncer epidermoide faringolaríngeo localmente avanzado dentro de un protocolo de tratamiento multidisciplinar con quimioterapia, radioterapia y cirugía. Tesis Doctoral; Universidad de Zaragoza, 2005.

Herranz J, Gavilán J, Vazquez-Barros JC. Carcinoma de comisura anterior. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2007;58:367-70.

Herrera-Gómez A, Villavicencio-Valencia V, Rascón-Ortiz M, Luna-Ortiz K. Demographic data of laryngeal cancer at the Instituto Nacional de Cancerología in Mexico City. *Cir Cir.* 2009;77(5):353-7.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1772-83.

Hillsamer PJ, Schuller DE, McGhee RB Jr, Chakere SD, Young DC. Improving diagnostic accuracy of cervical lymph metastasis with computed tomography and magnetic resonance imaging. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116:1297-1301.

Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinson RA. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope.* 2006 Sep;116:1-13.

Hoffman M, Gorogh T, Gottschlich S, et al. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 2005;218:199-206.

Hong WK, Bromer RH, Amato DA, et al. Patterns of relapse in locally advanced head and neck patients who achieved complete remission after combined modality therapy. *Cancer* 1985;56:1242-5.

Hu S, Arellano M, Boontheung P, Wang J, Zhou H, Jiang J et al.: Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clin Cancer Res.* 2008;14:6246-52.

Hu S, Wang J, Meijer J, leong S, Xie Y, Yu T et al.: Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2007;56:3588-600.

Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 2001;85:162-9

Ikarashi F, Nonomura N, Nakano Y. Clinical study on laryngeal cancer. *Nihon Jibiinkoka Gakkai Kaiho.* 1990;93(5):772-8.

Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324(24):1685-90.

Iñarra E, Gorriño M, Vidales L, Aguirre U, Iriando JR. Capacidad predictiva de la TC para evaluar las adenopatías cervicales en los tumores de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaring Esp.* 2001;62(6):443-7.

Iro H, Waldfahrer F, Altendorf-Hofmann A, Weidenbecher M, Sauer R, Steiner W. Transoral laser surgery of supraglottic cancer: follow-up of 141 patients. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1998;124:1245-50.

Jacobs N, Nicolson NA, Deron C, Derespaul P, van-Os J, Myin-Germeys I. Electronic monitoring of salivary cortisol sampling compliance in daily life. Life Sci. 2005;76(21):2431-43.

Jardim JF, Francisco AL, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. Int J Oral Maxillofac Surg. 2015;44(1):23-8.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90

Jeong HS, Baek CH, Son YI, Ki Chung M, Kyung Lee D, Young Choi J, Kim BT, Kim HJ. Use of integrated 18F-FDG PET/CT to improve the accuracy of initial cervical nodal evaluation in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2007;29(3):203-10.

Jessani N, Humphrey M, McDonald WH, Niessen S, Masuda K, Gangadharan B et al.: Carcinoma and stromal enzyme activity profiles associated with breast tumor growth in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004,101:13756-161.

Jessani N, Liu Y, Humphrey M, Cravatt BF: Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002,99:10335-40.

Jessani N, Niessen S, Mueller BM, Cravatt BF: Breast cancer cell lines grown in vivo: what goes in isn't always the same as what comes out. Cell Cycle 2005;4:253-5.

Jessani N, Niessen S, Wei BQ, Nicolau M, Humphrey M, Ji Y et al.: A streamlined platform for high-content functional proteomics of primary human specimens. Nat Methods 2005;2:691-97.

Jiang R, Ekshyyan O, Moore-Medlin T, Rong X, Nathan S, Gu X, Abreo F, Rosenthal EL, Shi M, Guidry JT, Scott RS, Hutt-Fletcher LM, Nathan CA. Association between human papilloma virus/Epstein-Barr virus coinfection and oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2014;18.

Johansen J, Eigtved A, Buchwald C, Theilgaard SA, Hansen HS. Implication of 18F-fluoro-2-deoxy-D-Glucose positron emission tomography on management of carcinoma of unknown primary in the head and neck: a Danish cohort study. *Laryngoscope* 20002;112(11):2009-14.

Joshi VM, Wadhwa V, Mukherji SK. Imaging in laryngeal cancers. *Indian J Radiol Imaging.* 2012;22(3):209-26.

Jovanović M, Perović J, Grubor A. The impact of diabetes mellitus on postoperative morbidity in laryngeal surgery. *Acta Chir Lugosl.* 2006;53(1):51-5.

Kaplan MH, Feinstein AR. The importance of classifying initial co-morbidity in evaluating the outcome of diabetes mellitus. *J Chronic Dis.* 1974;27(7-8):387-404.

Kato I, Nomura AM. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30(2):75-81.

Kidd D, Liu Y, Cravatt BF. Profiling serine hydrolase activities in complex proteomes. *Biochemistry* 2001;40:4005-15.

King AD, Tse GM, Yuen EH, To EW, Vlantis AC, Zee B, Chan AB, van Hasselt AC, Ahuja AT. Comparison of CT and MR imaging for the detection of extranodal neoplastic spread in metastatic neck nodes. *Eur J Radiol.* 2004;52(3):264-70.

Kleinsaser. Die Klassifikation und Differential diagnose der Epithyperplasien der Kehlkopfschleimhaut auf grund histomorphologischer Merkmale. *Z Laryng* 1963;42:339-62.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW et al.: The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24:72-7.

Kos M, Engelke W. Advantages of a new technique of neck dissection using an ultrasonic scalpel. *J Craniomaxillofac Surg.* 2007;35(1):10-4.

Kotwall C, Sako K, Razack MS, Rao U, Bakamjian V, Shedd DP. Metastatic patterns in squamous cell cancer of the head and neck. *Am J Surg.* 1987;154(4):439-42.

Kountouras J: Detecting *Helicobacter pylori*. Diagnostic tests for *Helicobacter pylori*. *Gut.* 1998;42:900-1.

Kumar PP, Good RR, Epstein BE, Yonkers AJ, Ogren FP, Moore GF. Outcome of locally advanced stage III and IV head and neck cancer treated by surgery and postoperative external beam radiotherapy. *Laryngoscope.* 1987 May;97(5):615-20.

Kumar V, Abas AK, Fausto N. Robins and Cotran's pathologic basis of disease. India: Saunders; 2004.786–7.

Kuo P, Chen MM, Decker RH, Yarbrough WG, Judson BL. Hypopharyngeal cancer incidence, treatment, and survival: temporal trends in the United States. *Laryngoscope.* 2014; 124(9):2064-9.

Kurita H, Nakanishi Y, Nishizawa R, Xiao T, Kamata T, Koike T, Kobayashi H. Impact of different surgical margin conditions on local recurrence of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010;46(11):814-7.

Kurtulmaz S., Erkal H., Serin M., Elhan A., Cakmak A. Squamous cell carcinomas of the head and neck: descriptive analysis of 1293 cases. *J Laryngol Otol.*1997;111:531-5.

La Vecchia C, Zhang ZF, Altieri A. Alcohol and laryngeal cancer: an update. *Eur J Cancer Prev.* 2008;17(2):116-24.

Lagarde SM, Franssen SJ, van Werven JR, Smets EM, Tran TC, Tilanus HW, Plukker JT, de Haes JC, van Lanschot JJ. Patient preferences for the disclosure of prognosis after esophagectomy for cancer with curative intent. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(11):3289-98.

Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope*. 2005;115(4):629-639.

Lee L, Cheng A, Fang T. High incidence of malignant transformation of laryngeal papiloma in Taiwan. *Laryngoscope*. 2008;118(1):50-5.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJP, van der Waal I, Snow GB. Regional lymph node involvement and its significance in the development of distant metastases in head and neck carcinoma. *Cancer* 1993;71:452–6.

Lefebvre F, Chevalier D. *Cancers du larynx*. EMC.Oto-rhino-laryngologie. 2005; 20-710.

Lefebvre JL, Chevalier D et Demaille A. Epidémiologie des cancers des voies aerodigestives supérieures. *Encycl Méd Chir, Oto-rhino-laryngologie*. 1996;20-949-10.

Lefebvre JL. Laryngeal preservation in head and neck cancer: Multidisciplinary approach. *Lancet Oncol*. 2006;7:747-55.

Leibel SA, Scott CB, Mohiuddin M, et al. The effect of local-regional control on distant metastatic dissemination in carcinoma of the head and neck. Results of an analysis from the RTOG Head and Neck Database. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1991;21:549–56.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG: Saliva and dental pellicle--a review. *Adv Dent Res* 2000,14:22-8.

León X, Martínez V, López M, García J, Venegas Mdel P, Esteller E, et al. Second, third, and fourth head and neck tumors. A progressive decrease in survival. *Head Neck*. 2012;34:1716-9.

León X, Quer M, Orús C, del Prado Venegas M, López M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck*. 2000;22(7):680-6.

León X, Sánchez M, Maños M, Herranz JJ, Esteban F, Nogués J. Tratamiento quirúrgico del los carcinomas escamosos de cabeza y cuello en España durante el periodo 2006-2011. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2015;66(2):98-105.

León X, Quer M, Orús C, del Prado M, López M. Las metástasis a distancia en cáncer de cabeza y cuello que lograron el control locorregional. *Head Neck,* 2000;22: 680-6.

Levy A, Blanchard P, Temam S, Maison MM, Janot F, Mirghani H, Bidault F, Guigay J, Lusinchi A, Bourhis J, Daly-Schveitzer N, Tao Y. Squamous cell carcinoma of the larynx with subglottic extension: is larynx preservation possible? *Strahlenther Onkol.* 2014;190(7):654-60.

Li XM, Di B, Shang YD, Zhou YQ, Ma HM, Cheng JM. [Analysis of risk factors in the prediction of distant metastases of head and neck squamous cell carcinomas]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 2004;39(3):171-5.

Li XY, Guo X, Feng S, Li XT, Wei HQ, Yang HA, Ren Z, Jiang XJ. Relationship between a family history of malignancy and the incidence of laryngeal carcinoma in the Liaoning province of China. *Clin Otolaryngol.* 2009;34(2):127-31.

Li Y, St John MA, Zhou X, Kim Y, Sinha U, Jordan RC et al. Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clin Cancer Re.s* 2004;10: 8442-50.

Licitra L, Bernier J, Grandi C, Locati L, Merlano M, Gatta G, Lefebvre JL. Cancer of the larynx. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003;47(1):65-80.

Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer.* 1972;29(6):1446-9.

Lindberg RD. Sites of first failure in head and neck cancer. *Cancer Treat Symp* 1983;2:21-31.

Liu Y, Patricelli MP, Cravatt BF: Activity-based protein profiling: the serine hydrolases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:14694-9.

LiVolsi VA. Can we agree to disagree? *Hum Pathol.* 2003;34(11):1081-2.

Lortet-Tieulent J, Renteria E, Sharp L, Weiderpass E, Comber H, Baas P, Bray F, Coebergh JW, Soerjomataram I. Convergence of decreasing male and increasing female incidence rates in major tobacco-related cancers in Europe in 1988-2010. *Eur J Cancer.* 2013;20.

Lydiatt DD, Markin RS, Williams SM, Davis LF, Jonkers AJ. Computed tomography and magnetic resonance imaging of cervical metastasis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989;101:422.

Lyon Gleich LL, Collins CM, Gartside PS, Gluckman JL, Barrett WL, Wilson KM, Biddinger PW, Redmond KP. Therapeutic decision making in stages III and IV head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;129(1):26-35.

Ma H, Lian M, Feng L, Li P, Hou L, Chen X, Huang Z, Fang J. Factors contributing to lymph node occult metastasis in supraglottic laryngeal carcinoma cT2-T4 N0M0 and metastasis predictive equation. *Chin J Cancer Res.* 2014;26(6):685-91.

Madsen MA, Deryugina EI, Niessen S, Cravatt BF, Quigley JP: Activity-based protein profiling implicates urokinase activation as a key step in human fibrosarcoma intravasation. *J Biol Chem.* 2006;281:15997-16005.

Mahrus S, Craik CS: Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells. *Chem Biol* 2005;12:567-77.

Maier H, Tiisch M. Epidemiology of laryngeal cancer. Results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol (Stockh).* 1997;527:160-4.

Maier H., Tiisch M. Epidemiology of laryngeal cancer. Results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol Stockh.* 1997;527:160-4.

Malamud D. Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come. *Am J Med.* 1997;102:9-14.

Mancuso AA, Harnsberger HR, Muraki AS, Stevens MH. Computed tomography of cervical and retropharyngeal lymph nodes: normal anatomy, variants of normal and applications in staging head and neck cancer. *Radiology* 1983;148:715-23.

Mancuso AA, Maceri D, Rice D, Hanafee W. CT of cervical lymph node cancer. *AJR Am J Roentgenol* 1981;136:381-5.

Mandel ID: A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:599-604.

Manni JJ, Terhaard Ch, de Boer MF, Croll GA, Hilgers FJ, Annyas AA, et al. Prognostic factors for survival in patients with T3 Laryngeal carcinoma. *Am J Surg*. 1992;164:682-7.

Markou KD, Vlachtsis KC, Nikolaou AC, Petridis DG, Kouloulas AI, Daniilidis IC. Incidence and predisposing factors of pharyngocutaneous fistula formation after total laryngectomy. Is there a relationship with tumor recurrence? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2004;261(2):61-7.

Martin de Civetta MC. Carcinogénesis. *Salud pública de México* 2011;53:405-14.

Martin L, Zoubir M, Le Tourneau C. Recurrence of upper aerodigestive tract tumors. *Bull Cancer*. 2011;101(5):511-20.

Martínez Alvarez A, Rodríguez Francos MI, Jiménez Antolín J, Menéndez Loras LM, Sánchez Carrión S, Galán Morales J, Galdeano Granda E. Epidemiología y manifestaciones clínicas de los tumores de laringe tratados en el Hospital Virgen de la Salud de Toledo, España. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1996;47(2):139-43.

Martínez-Berganza R, De Miguel. F, Fraile Rodrigo JJ, Gil Paraíso P, Naya MJ. Mortalidad en la cirugía del cáncer de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1998;49(3):206-10.

Martínez G. Estudio epidemiológico del cáncer de laringe en el servicio de otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela durante el período 1995-2008. Tesis Doctoral; Universidad de Santiago. 2010.

Masegosa P. Estudio epidemiológico del cáncer de laringe en el complejo hospitalario universitario de Albacete (período 2003-2012). Tesis Doctoral; Universidad de Castilla la Mancha 2014.

Mendenhall WM, Werning JW, Hinerman RW, Amdur RJ, Villaret DB. Management of T1-T2 glottic carcinomas. *Cancer*. 2004;1;100(9):1786-92.

Menvielle G, Luce D, Goldberg P, Leclerc A. Smoking, alcohol drinking, occupational exposures and social inequalities in hypopharyngeal and laryngeal cancer. *Int J Epidemiol*. 2004;33(4):799-806

Merino E, Hellín D, Girona JC, Arregui M, Jiménez-Cervantes J. Laryngeal cancer in Murcia]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1994;45(1):37-40.

Merino E. Cáncer de laringe: factores pronósticos y supervivencia. Tesis Doctoral; Universidad de Murcia. 1991.

Merino OR, Lindberg RD, Fletcher GH. An analysis of distant metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1977;40:145-151.

Merritt RM, Williams MF, James TH, Porubsky ES. Detection of cervical Metastasis. A meta-analysis comparing computed tomography and physical examination. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:149-152.

Milner JM, Kevorkian L, Young DA, Jones D, Wait R, Donell ST et al.: Fibroblast activation protein alpha is expressed by chondrocytes following a pro-inflammatory stimulus and is elevated in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006;8: 23.

Mizukawa N, Sawaki K, Nagatsuka H, et al. Human alpha and beta-defensin immunoreactivity in oral mucoepidermoid carcinomas. *Anticancer Res.* 2001;21:2171–2174.

Moreau P, Goffart Y, Collignon J. Computed tomography of metastatic cervical lymph nodes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;116:1190-3.

Morera Ocón FJ, Ripoll Orts F, García-Granero Ximénez M, Pastor MJ, Bernal Sprekelsen JC. Decrease of serum cholinesterase in colorectal cancer. *Med Clin.* 2007;24,129(19):729-30.

Motta G, Espósito E, Motta S, Tartaro G, Testa D. CO(2) laser surgery in the treatment of glottic cancer. *Head Neck.* 2005;27: 566-73.

Moya-Plana A, Temam S. Larynx cancer. *Rev Infirm.* 2013;193:16-8.

Muderris T, Rota S, Muderris T, Inal E, Fidan I. Does Epstein-Barr virus infection have an influence on the development of laryngeal carcinoma? Detection of EBV by Real-Time Polymerase Chain Reaction in tumour tissues of patients with laryngeal carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79(4):418-23.

Nagler RM, Hershkovich O, Lischinsky S, Diamond E, Reznick AZ. Saliva analysis in the clinical setting: revisiting an underused diagnostic tool. *J Investig Med.* 2002;50(3):214–25.

National Cancer Institute, US National Institutes of Health, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, SEER*Stat Database: Incidence–SEER 17 Regions Limited-Use, Nov 2005 Submission (1973-2003 varying): Linked to County Attributes: Total U.S., 1969-2003. Accessed April 2006

Negri E, Boffetta P, Berthiller J, Castellsague X, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, Lazarus P, Lence JJ, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Shangina O, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N,

Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Lissowska J, Zhang ZF, Ferro G, Brennan P, La Vecchia C, Hashibe M. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Int J Cancer*. 2009;15;124(2):394-401.

Nelson DE, DW Jarman, Rehm J, Greenfield conocimientos tradicionales, Rey G, Kerr WC, Miller P, Shield KD: Vosotros Y, Naimi TS. Muertes y años potenciales de cáncer atribuibles al alcohol perdió la vida en los Estados Unidos. *Am J Public Health*. 2013;103:641-8.

Newman JO, Connolly TM, Illing EA, Kilgore ML, Locher JL, Carroll WR. Survival trends in hypopharyngeal cáncer: a population based review. *Laryngoscope*. 2015;125(3):624-9.

Ni S, Xu ZG, Wang XL, Liu SY, Qi YF, Tang PZ. Fatal hemorrhage following surgery for head and neck carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. 2010;32(1):60-3.

Nishijima W, Takooda S, Tokita N, Takayama S, Sakura M. Analyses of distant metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck and lesions above the clavicle at autopsy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1993;119:65–8.

Nomura DK, Leung D, Chiang KP, Quistad GB, Cravatt BF, Casida JE: A brain detoxifying enzyme for organophosphorus nerve poisons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102: 6195-6200.

Nurkka A, Obiero J, Kaythy H, Sscott AG. Effects of sample collection and storage methods on antipneumococcal immunoglobulin A in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(3):357–61.

O'Brien PH, Carlson R, Steubner EA, Stanley CT. Distant metastases in epidermoid cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1971;27:304–7.

Ochnio JJ, Scheifele DW, Ho M, Mitchell LA. New ultrasensitive enzyme immunoassay for detecting vaccine- and disease-induced hepatitis A virus-specific immunoglobulin G in saliva. *J Clin Microbiol*. 1997;35:98-101.

Ogura JH, Maller RH, Partial laryngo pharyngectomy for supraglottic and pharyngeal carcinoma. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 1965;69:832-5.

Ohshiro K, Rosenthal DI, Koomen JM, et al. Pre-analytic saliva processing affects proteomic results and biomarker screening of head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol.* 2007;30:743–749.

Okerberg ES, Wu J, Zhang B, Samii B, Blackford K, Winn DT et al.: High-resolution functional proteomics by active-site peptide profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 4996-5001.

Organización Mundial de la Salud. Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) CIIC Monografías sobre la evaluación de los riesgos carcinogénicos para los humanos. Lyon: IARC; 2012. [2014 26 de febrero].

Orte C, De Miguea F, Guallar M, Herrero A, Rodríguez J, Ortíz A. Manejo de las metástasis cervicales de origen desconocido. *O.R.L Aragón* 2013;16(1)9-12.

Ozrturkcan S, Katilmis H, Ozdemir I, Tuna B, Guvenç I, Dundar R. Occult contralateral nodal metastases in supraglottic laryngeal cancer crossing the midline. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009;266:117-20.

Pan Z, Jeffery DA, Chehade K, Beltman J, Clark JM, Grothaus P et al. Development of activity-based probes for trypsin-family serine proteases. *Bioorg Med Chem Lett* 2006;16: 2882-5.

Papac RJ. Distant metastases from head and neck cancer. *Cancer* 1984;53:342-5.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.

Pastore A, Stomeo F, Bianchini C, Ciorba A, Savini S, Merlo R, Chiarello G, Malagutti N, Pelucchi S. Supracricoid partial laryngectomy: oncological and functional results. *J BUON.* 2015;20(3):879-85.

Patricelli MP, Giang DK, Stamp LM, Burbaum JJ: Direct visualization of serine hydrolase activities in complex proteomes using fluorescent active site-directed probes. *Proteomics* 2001;1:1067-71.

Pera E, Moreno A, Galindo L. Prognostic factors in laryngeal carcinoma: a multifactorial study of 416 cases. *Cancer* 1986;58:928-34.

Pezier TF, Nixon IJ, Joshi A, Guerrero-Urbano T, Oakley R, Jeannon JP, Simo R. Factors predictive of outcome following primary total laryngectomy for advanced squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2014;271(9):2503-9.

Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, Mendenhall WM, Adelstein DJ, Ang KK, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24:3693-704.

Piccirillo JF. Importance of comorbidity in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2000;110(4):593-602.

Piccirillo JF, Wells CK, Sasaki CT, Feinstein AR. New clinical severity staging system for cancer of the larynx. Five-year survival rates. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1994;103(2):83-92.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma: Three meta-analyses of updated individual data. *Lancet.* 2000;355:949-55.

Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J; MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol.* 2009;92:4-14.

Pita Fernandez S, P´ertegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria* 2003;10:120-124.

Pozo F, Tenorio A: Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1999;79:9-19.

Puri SK, Fan CY, Hanna E. Significance of extracapsular lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003;11:119-23.

Putten L, Bree R, Doornaert PA, Buter J, Eerenstein SE, Rietveld DH, Kuik DJ, Leemans CR. Salvage surgery in post-chemoradiation laryngeal and hypopharyngeal carcinoma: outcome and review. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2015;35(3):162-72.

Quer M, León X, Orús C, Recher K, Gras JR. Análisis de 2.500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2001;52(3):201-5.

Quer M, Leon X. Filosofía general del tratamiento preservador de órgano. Diferentes aproximaciones terapéuticas. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009;60:2-7.

Rafferty MA, O'Dwyer TP. Secondary primary malignancies in head and neck squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol.* 2001;115:988-91.

Raitiola HS, Pukander JS. Changing trends in the incidence of laryngeal cancer. *Acta Oncol.* 1997;36(1):33-6.

Redaelli de Zinis LO, Ferrari L, Tomenzoli D, Premoli G, Parrinello G, Nicolai P. Postlaryngectomy pharyngocutaneous fistula: incidence, predisposing factors, and therapy. *Head Neck.* 1999 Mar;21(2):131-8.

Rehak NN, Cecco SA, Csako G: Biochemical composition and electrolyte balance of "unstimulated" whole human saliva. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38: 335-343.

Rodrigo JP, Coca-Pelaz A, Suárez C. El papel de la cirugía parcial como estrategia de la preservación funcional en el carcinoma de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2011;62:231-238.

Rodrigo JP, López F, Llorente JL, Álvarez-Marcos C, Suárez C. Results of total laryngectomy as treatment for locally advanced laryngeal cancer in the organ-preservation era. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2015;66(3):132-138.

Rodrigo JP, Suárez C, Silver CE, Rinaldo A, Ambrosch P, Fagan JJ, et al. Transoral laser surgery for supraglottic cancer. *Head Neck*. 2008;30:658-66.

Rucci L, Ferlito A, Bradley PJ, Romagnoli P, Rinaldo A, Anniko M. Can embryology influence clinicians concerning the "best therapy" for glottic cancer? *Acta Otolaryngol*. 2002;122(7):796-8.

Rucci L, Gammarota L, Borghi Cirri MB. Carcinoma of the anterior commissure of the larynx: I. Embryological and anatomic considerations. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996;105:303-8.

Rzewnicki I, Biszewska J. [Epidemiology of laryngeal and hypopharyngeal cancer in the period 1988-2012 in the material of the Otolaryngology Clinic of the Bialystok Medical University]. *Otolaryngol Pol*. 2013;67(6):265-73.

Sanabria A, Carvalho AL, Vartanian JG, Magrin J, Ikeda MK, Kowalski LP. Comorbidity is a prognostic factor in elderly patients with head and neck cancer. *Ann Surg Oncol*. 2007;14(4):1449-57.

Saki N, Nikakhlagh S, Kazemi M. Pharyngocutaneous fistula after laryngectomy: incidence, predisposing factors, and outcome. *Arch Iran Med*. 2008;11(3):314-7.

Salami A, Dellepiane M, Bavazzano M, Crippa B, Mora F, Mora R. New trends in head and neck surgery: a prospective evaluation of the Harmonic Scalpel. *Med Sci Monit*. 2008;14(5).

Sancllemente G. What clinicians should know about human papilloma virus vaccines. *Gac Med Mex* 2003;139:173-183.

Santi I, Kroll LE, Dietz A, Becher H, Ramroth H. Occupation and educational inequalities in laryngeal cancer: the use of a job index. *BMC Public Health*. 2013;19;13:1080.

Sarra LD, Rodríguez JC, García Valea M, Bitar J, Da Silva A. Fistula following total laryngectomy. Retrospective study and bibliographical review. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2009;60(3):186-9.

Schantz SP, Goepfert H. Multimodality therapy and distant metastases. The impact of natural killer cell activity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987;113:1207-13.

Schantz SP, Skolnik EM, O'Neill JV. Improved survival associated with postoperative wound infection in laryngeal cancer: an analysis of its therapeutic implications. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1980;88(4):412-7.

Schuckit MA. New findings in the genetics of alcoholism. *JAMA.* 1999;26;281:1875-6.

Schwartz LH, Ozsahin M, Zhang GN, Touboul E, De Vataire F, Andolenko P, Lacau-Saint-Guily J, Laugier A, Schlienger M. Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. *Cancer.* 1994;1;74(7):1933-8.

Sengiz S, Pabuççuoğlu U, Sarioğlu S. Immunohistological comparison of the World Health Organization (WHO) and Ljubljana classifications on the grading of preneoplastic lesions of the larynx. *Pathol Res Pract.* 2004;200(3):181-8.

Shah FD, Begum R, Vajaria BN, et al. A Review on Salivary Genomics and Proteomics Biomarkers in Oral Cancer. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 2011;26(4):326-334.

Shingaki S, Suzuki I, Kobayashi T, Nakajima T. Predicting factors for distant metastases in head and neck carcinoma: An analysis of 103 patients with locoregional control. *J Oral Maxillofacial Surg.* 1996;54:853-857.

Sigston E, de Mones E, Babin E, Hans S, Hartl DM, Clement P, Brasnu DF. Early-stage glottic cancer: oncological results and margins in laser cordectomy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006;132(2):147-52.

Silvestri F, Bussani R, Stanta G, Cosatti C, Ferlito A. Supraglottic versus glottic laryngeal cancer: epidemiological and pathological aspects. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 1992;54(1):43-8.

Singh B, Bhaya M, Zimble M, Stern J, Roland JT, Rosenfeld RM, Har-El G, Lucente FE. Impact of comorbidity on outcome of young patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 1998;20(1):1-7.

Slavkin HC: Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. *J Am Dent Assoc.* 1998;129:1138-43.

Slootweg PJ, Hordijk GJ, Schade Y, van Es RJ, Koole R. Treatment failure and margin status in head and neck cancer. A critical view on the potential value of molecular pathology. *Oral Oncol.* 2002;38(5):500-3.

Smith EM, Ritchie EM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108:766-772.

Snyderman N, Johnson J, Schramm V, Myers E, Bedetti C, Thearle P. Extracapsular spread of carcinoma in cervical lymph nodes impact upon survival in patients with carcinoma of the supraglottic larynx. *Cancer.* 1985;56:1597-9.

Sociedad Española de Oncología Médica. Las cifras del cáncer en España 2014.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Duff GW: Microbiological parameters associated with IL-1 gene polymorphisms in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2000;27:810-8.

Solano J, Esteban F, Delgado M, González M, Zaragoza L. Malignidad histopatológica y pronóstico del cáncer de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 1997;48:375-82.

Sousa Ade A, Porcaro-Salles JM, Soares JM, de Moraes GM, Carvalho JR, Silva GS, Savassi-Rocha PR. Predictors of salivary fistula after total laryngectomy. *Rev Col Bras Cir.* 2013;40(2):98-103.

Spector GJ, Sessions DG, Lenox J, Newland D, Simpson J, Haughey BH. Management of stage IV glottic carcinoma: therapeutic outcomes. *Laryngoscope*. 2004;114(8):1438-46.

Steiner W, Vogt P, Ambrosch P, et al. Transoral carbon dioxide laser microsurgery for recurrent glottic carcinoma after radiotherapy. *Head Neck*. 2004;26:477-84.

Steiner W. Results of curative laser microsurgery of laryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*. 1993;14(2):116-21.

Stell PM. Prognosis in laryngeal carcinoma: tumour factors. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1990;15(1):69-81.

Stevens MH, Harnsberger HR, Mancuso AA, Davis RK, Johnson LP, Parkin JL. Computed tomography of cervical lymph nodes. *Arch Otolaryngol* 1985;111:735-9.

Stoeckli SJ, Pawlik AB, Lipp M, et al. Salvage surgery after failure of nonsurgical therapy for carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2000;126:1473-7.

Streckfus C, Bigler L, Navazesh M, Al-Hashimi I: Cytokine concentrations in stimulated whole saliva among patients with primary Sjogren's syndrome, secondary Sjogren's syndrome, and patients with primary Sjogren's syndrome receiving varying doses of interferon for symptomatic treatment of the condition: a preliminary study. *Clin Oral Investig*. 2001;5: 133-5.

Suárez C, Rodrigo JP, Herranz J, Llorente JL, Martínez JA. Supraglottic laryngectomy with or without postoperative radiotherapy in supraglottic carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:358-63.

Takes RP, Strojan P, Silver CE, Bradley PJ, Haigentz M Jr, Wolf GT, Shaha AR, Hartl DM, Olofsson J, Langendijk JA, Rinaldo A, Ferlito A; International Head and

Neck Scientific Group. Current trends in initial management of hypopharyngeal cancer: the declining use of open surgery. *Head Neck*. 2012;34(2):270-81.

Tamarit JM, Carrasco M, Estellés E, Fernández S, Baviera N, Dalmau J. Carcinomas supraglóticos y glóticos. Estudio de la incidencia en los últimos 31 años. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007;58(10):449-53.

Tan EH, Adelstein DJ, Droughton ML, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol*. 1997;20:146-50.

Teppo, H, Koivuneen P, Sipilä S, Jokinen K, Hyrynkangas K, Lara E, et al. Decreasing incidence and improved survival of laryngeal cancer in finland. *Acta Oncologica*. 2001;40:791-5

The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med*. 1991;324:1685-90.

Tirelli G, Palmieri A, Giacomarra V, Russolo M. Pre-Operative evaluation of cervical adenopathies in tumors of the upper aerodigestive tract. *Anticancer Research* 1998;18:2805-2810.

Toll BA, Brandon TH, Gritz ER, Warren GW, Herbst RS; AACR Subcommittee on Tobacco and Cancer. Assessing tobacco use by cancer patients and facilitating cessation: an American Association for Cancer Research policy statement. *Clin Cancer Res*. 2013;15;19(8):1941-8.

Troell RJ, Terris DJ. Detection of metastases from head and neck cancers. *Laryngoscope* 1995;105:247–250.

Turati F, Negri E, La Vecchia C. Family history and the risk of cancer: genetic factors influencing multiple cancer sites. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2014;14:1-4.

Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese

(Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 1988;15;41(4):483-91.

Ujam A, Awad Z, Wong G, Tatla T, Farrell R. Safety trial of Floseal(®) haemostatic agent in head and neck surgery. *Ann R Coll Surg Engl*. 2012;94(5):336-9.

Van Bockel LW, Monninkhof EM, Pameijer FA, Terhaard CH. Importance of tumor volume in supraglottic and glottic laryngeal carcinoma. *Strahlenther Onkol*. 2013;189:1009-14.

Van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, Kummer JA, Meijer CJ, van Leeuwen B, Denkers F, Smeele LE, Snow GB, Brakenhoff RH. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*. 2001;15;93(2):232-5.

Varghese BT, Sebastian P, Mathew A. Treatment outcome in patients undergoing surgery for carcinoma larynx and hypopharynx: a follow-up study. *Acta Otolaryngol*. 2009;129(12):1480-5.

Varvares MA, Poti S, Kenyon B, Christopher K, Walker RJ. Surgical margins and primary site resection in achieving local control in oral cancer resections. *Laryngoscope*. 2015;26.

Vassileiou A, Vlastarakos PV, Kandiloros D, Delicha E, Ferekidis E, Tzagaroulakis A, Nikolopoulos TP. Laryngeal cancer: smoking is not the only risk factor. *B-ENT*. 2012;8(4):273-8.

Venegas MP, León X, Quer M, Matino E, Montoro V, Burgués J. [Las complicaciones de la laringectomía total en relación con la radioterapia previa]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 1997;48(8):639-46.

Vikram B, Strong EW, Shah JP, Spiro R. Failure at distant sites following multimodality treatment for advanced head and neck cancer. *Head Neck Surg* 1984;6:730-3.

Virtaniemi JA, Kumpulainen EJ, Hirvikoski PP, Johansson RT, Kosma VM. The incidence and etiology of postlaryngectomy pharyngocutaneous fistulae. *Head Neck*. 2001;23(1):29-33.

Waddell WJ, Levy PS. La interacción entre el tabaco y el consumo de alcohol y el riesgo de cáncer del tracto aero-digestivo superior en Brasil. *Am J Epidemiol*. 2000;152:193-4.

Wang JR, Habbous S, Espin-Garcia O, Chen D, Huang SH, Simpson C, Xu W, Liu FF, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Goldstein DP, Liu G. Comorbidity and performance status as independent prognostic factors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2014;18.

Warner L, Chudasama J, Kelly CG, Loughran S, McKenzie K, Wight R, Dey P. Radiotherapy versus open surgery versus endolaryngeal surgery (with or without laser) for early laryngeal squamous cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014.

Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1994;120(7):699-702.

Werner JA, Dünne AA, Ramaswamy A, Folz BJ, Lippert BM, Moll R, Behr T. Sentinel node detection in N0 cancer of the pharynx and larynx. *Br J Cancer*. 2002;23;87:711-5.

White HN, Golden B, Sweeny L, Carroll WR, Magnuson JS, Rosenthal EL. Assessment and incidence of salivary leak following laryngectomy. *Laryngoscope*. 2012;122(8):1796-9.

Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst*. 1999;21;91(8):675-90.

Wolf GT, Makuch RW, Baker SR. Predictive factors for tumor response to preoperative chemotherapy in patients with head and neck squamous carcinoma. The Head and Neck Contracts Program. *Cancer*. 1984;15;54(12):2869-77.

Wong DT. Toward a simple, saliva-based test for the detection of oral cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2006;6:267-272.

Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Schantz S, Rudnai P, Purdue MP, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Michaluart P Jr, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, de Carvalho MB, Cadoni G, Boccia S, Brennan P, Boffetta P, Olshan AF. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol*. 2013;1;178:679-90.

Yilmaz T, Hosal AS, Gedikoğlu G, Onerci M, Gürsel B. Prognostic significance of vascular and perineural invasion in cancer of the larynx. *Am J Otolaryngol*. 1998;19:83-8.

Yilmaz T, Hoşal S, Gedikoglu G, Turan E, Ayas K. Prognostic significance of depth of invasion in cancer of the larynx. *Laryngoscope*. 1998;108:764-8.

Zapater E, Barona R, Campos A, Martínez Sanjuán, V, Montalt J. TC para la detección de metástasis linfáticas cervicales. *Acta Otorrino- laringol Esp*. 1996;47: 383-6.

Zätterström UK, Wennerberg J, Ewers SB, Willén R, Attewell R. Prognostic factors in head and neck cancer: histologic grading, DNA ploidy, and nodal status. *Head Neck*. 1991 Nov-Dec;13:477-87.

Zbaren P, Lehmann W. Frequency and sites of distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. An analysis of 101 cases at autopsy. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1987;113:762-4.

Zelles T, Purushotham KR, Macauley SP, Oxford GE, Humphreys-Beher MG: Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. J Dent Res. 1995; 74:1826-32.

Zhang D, Zhou J, Chen B, Zhou L, Tao L. Gastroesophageal reflux and carcinoma of larynx or pharynx: a meta-analysis. Acta Otolaryngol. 2014;134(10):982-9.

Zhang GF, Liu WS, Xu ZG. [Clinical analysis of squamous cell carcinoma of the subglottis]. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2012;47(1):44-7.

Zhu X, Zhang M, Zhang W, El J, Zhao Y, Chen X. papel pronóstico de la epidermis receptor del factor de crecimiento de cáncer de cabeza y cuello: un meta-análisis. J Surg Oncol. 2013;108:387-97.

8.1. Recursos digitales

American Cancer Society (ACS):

<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2006pwsecured.pdf.pdf>

<http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecured.pdf>

Asociación Española contra el Cáncer (AECC):

<https://www.aecc.es/SobreElCancer/elcancer/Paginas/Origendelaenfermedad.aspx>

Internacional Head and Neck Epidemiology Consortium (IHANEC)

<http://www.inhance.utah.edu/>

Instituto Nacional del Cáncer (INC):

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>

<http://www.seer.cancer.gov>

National Comprehensive Cancer Network (NCCN):

http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp

Organización Mundial de la Salud (OMS):

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/cancer-report-20140203/es/>

Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM):

<http://www.seom.org/>

<http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/prevencion-cancer>

ANEXO I

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DEL PACIENTE EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DENOMINADO: **EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SEÑALIZACIÓN COLINÉRGICA Y TOXICIDAD DEL TABACO MEDIADA POR RECEPTORES: RIESGO AL CÁNCER, VALOR PRONÓSTICO Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES OPERADOS DE CÁNCER**

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

De conformidad a lo previsto en el artículo 59 de la citada Ley, se le informa de los siguientes extremos:

- a) La finalidad de la investigación es la siguiente: Obtener información de interés con fines científicos, diagnósticos, pronósticos y terapéuticos de tumores en relación con el consumo de tabaco.
- b) Los beneficios esperados son los siguientes: mejorar la asistencia de los pacientes con cáncer.
- c) Los posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra (solo si existe alguno, incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad con el fin de recabar nuevos datos u obtener otras muestras) son los que siguen : No hay.
- d) Los responsables de la investigación son los Dres: D. Juan Pablo Pelegrín Hernández, Juan Cabezas Herrera y D. Diego Hellín Meseguer
- e) El lugar de realización del análisis y destino de la muestra al término de la investigación será La Unidad de Investigación del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario “Virgen de la Arrixaca
- f) Se garantiza la total confidencialidad de la información obtenida, únicamente accediendo a la información obtenida los Dres. Responsables de la Investigación.
- g) No existe la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica.
- h) El presente proyecto de investigación ha obtenido informe favorable del Comité Ético de Investigación Clínica del “Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca” para la obtención y utilización de muestras biológicas para investigación biomédica.

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

D./D^a.....

DNI

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

Fdo:
(paciente)

ANEXO II

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO. ANÁLISIS DE SERINA HIDROLASAS EN TEJIDOS PATOLÓGICOS, CONTROL Y SALIVA. APLICACIONES DIAGNÓSTICAS Y PRONÓSTICAS

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS MOLECULARES

1. DATOS

Médico responsable: _____		
Hospital: _____		
Fecha de inclusión: ____ / ____ / _____		Nº de inclusión: ____
Criterios de inclusión	SI	NO
Aceptación del estudio por parte del paciente	__	__
Edad ____	__	__
Tratamiento previo o en recaída	__	__
Antecedentes de otra neoplasia	__	__

Características del paciente

Año de nacimiento: ____	Sexo: __ 1.- Varón 2.- Mujer
Peso: _____ Kg	Altura: _____ cm

Características de la patología y del tratamiento previo

Fecha del diagnóstico inicial: ___ / ___ / ___

Histología _____

Tipos de quimioterapia previa (especificar) _____

Repuesta Clínica conseguida previamente _____

Características actuales de la enfermedad

Estado general del paciente

Datos de exploración física

Afectación extraganglionar: _____ 1. Sí 2.- No

Localización extraganglionar: _____

2. MUESTRAS RECOGIDAS

1. TEJIDO SANO ADYACENTE	SI	NO		
2. TEJIDO PATOLÓGICO	SI	NO		
3. SALIVA		SI	NO	VOLUMEN:
ASPECTO:				
4. SANGRE		SI	NO	
5. SUERO		SI	NO	
6. ADN DE SANGRE TOTAL	SI	NO		CONCENTRACIÓN:
				PUREZA:

ANEXO III

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICO

1. NOMBRE Y APELLIDOS.
2. Nº DE HISTORIA CLÍNICA.
3. SEXO.
4. EDAD AL DIAGNÓSTICO
5. FECHA DIAGNÓSTICO (intervención qx).
6. EVOLUCIÓN. Tiempo transcurrido entre la aparición de la primera sintomatología y la primera consulta. Expresado en meses.

7. LOCALIDAD (distribuir por zonas).

- ⌘ Gerencia del Área de Salud I (Murcia/Oeste)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud II (Cartagena)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud III (Lorca)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud IV (Noroeste)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud V (Altiplano)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud VI (Vega Media del Segura)
- ⌘ Gerencia del Área d Salud VII (Murcia/Este)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud VIII (Mar Menor)
- ⌘ Gerencia del Área de Salud IX (Vega Alta del Segura)
- ⌘ Buscar centros y profesionales médicos

8. 1º SÍNTOMA DE CONSULTA:

A. CLINICO: (1)1. DISFONÍA SI (1), NO (0)

2. ODINOFAGIA

3.DISFAGIA

4.NÓDULO CERVICAL

5. OTALGIA

6. HEMOPTISIS

7. DISNEA

8. PARESTESIAS FARINGEAS

9. TOS

10. SINTOMAS GENERALES.

11.HALLAZGO CASUAL.

B. RADIOLÓGICO. (2)

C. HISTOLÓGICO. (3)

ADENOPATÍAS PALPABLE E.F: SI/NO.

9. ANTECEDENTES PERSONALES:

TABACO:

1. SEVERO: fumador de más de 20 cig/ día.
2. MEDIO: fumador de entre 10 y 20 cigarrillos/ día.
3. LEVE: fumador de entre 0 y 10 cigarrillos día.

ALCOHOL:

1. BEBEDOR EMPEDERNIDO: bebedor en las comidas y fuera de ellas de forma habitual, y/o, con síntomas clínicos de etilismo, y/o, >100g.
2. BEBEDOR MODERADO: bebedor en las comidas de forma habitual,y/o 50-100g.
3. BEBEDOR OCASIONAL: bebedor de forma esporádica, y/o, <50g

ENFERMEDADES:

1. DM.
2. HTA
3. VIH+
4. TRANSPLANTADO.
5. RESPIRATORIAS
6. DIGESTIVAS
7. CARDÍACAS
8. hepáticas
9. OTRAS..

TUMORALES:

1. PULMÓN
2. FARÍNGECAVIDAD ORAL
3. ESÓFAGO
4. COLON
5. PRÓSTATA
6. MAMA.
7. OTROS...

10. ANTECEDENTES FAMILIARES:

1. SIN INTERÉS.
2. CÁNCER DE LARINGE EN ALGÚN FAMILIAR PRÓXIMO CON VÍNCULOS DE SANGRE.
3. CÁNCER NO LARÍNGEO EN ALGÚN FAMILIAR PRÓXIMO, CON VÍNCULOS DE SANGRE.

11. DATOS ANESTESIA:

1. Hg:
2. ASA: I II III IV
3. COLINESTERASA

12. LOCALIZACIÓN DEL TUMOR PRIMARIO

1.LARINGE.

1. LESIÓN SUPRAGLÓTICA INTRALARÍNGEA: epiglotis, aritenoides, repliegue ariepiglótico, bandas ventriculares y ventrículos laríngeos.
2. LESIÓN GLÓTICA: pliegues vocales, comisura anterior y posterior.
3. LESIÓN SUBGLÓTICA: lesiones por debajo de los pliegues vocales.

2. HIPOFARINGE.Senos piriformes y base de lengua.

3. CAVIDAD ORAL./OROFARINGE.

4. Adenopatía metastásica

13. ESTADÍO T CLINICO. TNM.

1. Tis	T0	T1	T2	T3	T4
2.	N0	N1	N2a n2b	N3	
3.	M0	M1	Mx		

14. ESTADIO GLOBAL TNM CLINICO:

1. ESTADIO I: Pacientes con T1 N0 M0
2. ESTADIO II: Pacientes con T2 N0 M0
3. ESTADIO III: Pacientes con T3 N0 M0 , T1 T2 o T3 y N1.
4. ESTADIO IV: Pacientes con T4 cualquiera que sea su N, o pacientes con N2 o N3 con cualquier T, o pacientes con M1 con cualquier T o N.

15. IMAGEN RADIOLOGICA. (TAC).

1. FECHA DE REALIZACIÓN: (mejor poner meses previos qx).
2. TAMAÑO TUMORAL:
3. LOCALIZACIÓN/EXTENSIÓN:
 1. SUPRAGLOTIS. 2. GLOTIS. 3. SUBGLOTIS. 4. Adenopatía metastasica
4. ADENOPATÍAS:

IZQUIERDA	TAMAÑO	Nº
DERECHA	TAMAÑO	Nº
BILATERALES		
5. AFECTACIÓN DE CARTÍLAGO SI NO
6. OTROS...

16. COMITÉ DE TUMORES: SÍ NO

17. ANTECEDENTES PERSONALES TUMORALES Y DE TRATAMIENTO:

- a. TUMOR PRIMARIO (1), REDIDIVA (2), 2º TUMOR(3),

- b. METASTASIS 1 SI, O NO.
- c. ORIGEN: 1.pulmón, 2. Mandibula,3. Oral, 4.laringe, 5. Facial, 6. desconocido
- d. RT PREVIA, QT PREVIA O QX PREVIA.
- e. AÑOS DE DIFERENCIA: (AÑOS)

TRATAMIENTO APLICADO

18. TIPO DE TRATAMIENTO APLICADO:

- 1. CIRUGÍA.
- 2. RT.
- 3. QT.
- 4. Paliativo

19. TRAQUEOTOMÍA PREVIA.

- 1. NO HUBO TRAQUEOTOMÍA PREVIA A LA INTERVENCIÓN.
- 2. SI HUBO TRAQUEOTOMÍA PREVIA A LA INTERVENCIÓN, Y ESTA SE REALIZÓ COMO UNA URGENCIA.
- 3. SI HUBO TRAQUEOTOMÍA PREVIA A LA INTERVENCION, Y ESTA SE REALIZÓ DE FORMA PROGRAMADA/DIFERIDA, SIN SER URGENTE.
- 4.

20. Qx. TIPOS DE LARINGUECTOMÍA:

- 1. LARINGUECTOMÍA TOTAL
- 2. LARINGUECTOMIA SUPRAGLÓTICA
- 3. EPIGLOTECTOMÍA SIMPLE.
- 4. HEMILARINGUECTOMIA EN CUALQUIERA DE SUS MODALIDADES.
- 5. CORDECTOMÍA.
- 6. LÁSER-ENDOSCÓPICO
 - 6.1 SUPRAGLÓTICO (6)

6.2 CORDECTOMÍA

6.2.1.Unilateral (7)

6.2.2.Bilateral. (8)

6.3 subglotico (9)

7. EXÉRESIS TRAQUEAL

21. Qx. TIPOS DE VACIAMIENTO GANGLIONAR:

1. VACIAMIENTO CERVICAL FUNCIONAL UNILATERAL: IZQ. DERECHO.
2. VACIAMIENTO CERVICAL FUNCIONAL BILATERAL.
3. VACIAMIENTO CERVICAL FUNCIONAL EN UN LADO Y RADICAL EN EL OTRO.
4. VACIAMIENTO CERVICAL RADICAL UNILATERAL.
5. VACIAMIENTO CERVICAL RADICAL BILATERAL / DIFERIDO EN>1 MES.
6. VISITA GANGLIONAR/ EXTRACCIÓN UN SOLO GANGLIO.
7. NO SE HACE VACIAMIENTO.

22. RT. : TIPO→1. PREADYUVANTE- 2.ADYUVANTE- 3.POSTAYUVANTE

23. QT.TIPO→PREADYUVANTE-ADYUVANTE-POSTAYUVANTE

EVOLUCIÓN DEL PACIENTE

24. ESTANCIA HOSPITALARIA (Días).

25. COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS: SI NO

1. FARINGOSTOMA.
2. HEMORRAGIA.
3. EXITUS
4. PEG.
5. Montgomery

6. Infeccion
7. Ulcera de decubito

26. PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD

- a. RECIDIVA: SI/NO.
- b. RECIDIVA LOCAL: SI /NO. TIEMPO EN MESES DE RECIDIVA LOCAL:
- c. RECIDIVA GANGLIONAR: SI /NO. TIEMPO EN MESES TRAS RECIDIVA GANGLIONAR
- d. METÁSTASIS A DISTANCIAS SI/NO. Tiempo

27. TRATAMIENTO TRAS LA RECIDIVA:

1. CIRUGÍA DE RESCATE (CURATIVA).
2. RT.
 - 2.1 RT CURATIVA.
 - 2.2 RT PALIATIVA.
3. QT.
 - 3.1 QT CURATIVA.
 - 3.2. QT PALIATIVA.
4. PALIATIVO.

28. SEGUNDA NEOPLASIA: SI NO TIPO:

(se reseña la aparición de una segunda neoplasia en el plazo del seguimiento del enfermo).

29. TIEMPO DE APARICIÓN DE LA SEGUNDA NEOPLASIA/ SEMANAS.

1. SINCRÓNICA (<6MESES)
2. METACRÓNICA (>6MESES).

30. TRATAMIENTO TRAS LA 2ª NEOPLASIA::

1. CIRUGÍA DE RESCATE (CURATIVA).
2. RT.
 - 2.1 RT CURATIVA.

2.2 RT PALIATIVA.

3. QT.

3.1 QT CURATIVA.

3.2. QT PALIATIVA.

4. qx+rt

5. qx+rt+qt

6. rt+qt

31. AÑOS DE SUPERVIVENCIA DESDE LA PRIMERA ENFERMEDAD

a. 0.vive, 1 fallecido, 2 perdida.

b. 1. RELACIONADA CANCER, 2. NO RELACIONADA

ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

32. ANATOMIA PATOLOGICA.

a. TIPO DE CARCINOMA 1.epidermoide 2. C. Celulasacinares parotida 3. Células acinares de fosas nasale 4. Adenoma pleomorfo 5. Sarcomatoide de laringe, 6. Melanoma, 7.lipoma 8 linfoepitelioma de cavum

33. GRADO DE DIFERENCIACION

a. 1 BIEN; 2 MOD; 3 POBREMENTE 0. DESCONOC. 4. infiltrante

34. MÁRGENES:

a. LIBRES.

b. INVADIDOS >5mm o <5mm

35. 2.- Infiltracion vascular: Si No

36. 3.-Infiltracion linfática: Si No

37. 4.-Infiltracion nerviosa: Si No

38. Nº ganglios afectados.

39. Rotura capsula ganglionar Si No

ANEXO IV

Los investigadores se comprometen a asegurar la intimidad y confidencialidad de los datos de carácter personal de los sujetos incluidos en el estudio, de conformidad a la **Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal; el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de desarrollo de la misma, así como la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica** y documentos contenidos en el archivo.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usará para ningún otro propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario y a la entrevista serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto, serán anónimas.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas a cualquiera de los investigadores responsables y en cualquier momento durante su participación en él.

Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma. Si alguna de las preguntas durante la entrevista le parecen incómodas, tiene usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Yo . (Nombre y apellidos)

1. He leído la hoja de información que se me ha entregado.
2. He podido hacer preguntas sobre el estudio.
3. He recibido suficiente información sobre el estudio.
4. He hablado con el Dr. Pelegrín

En consecuencia:

- Comprendo que mi participación es voluntaria.
- Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - Cuando quiera
 - Sin tener que dar explicaciones
 - Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del participante

