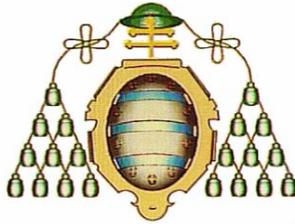


UNIVERSIDAD DE OVIEDO

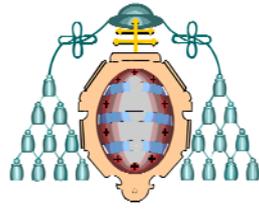
Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MARCADORES TUMORALES EN LA PREDICCIÓN DE METÁSTASIS EN  
EL CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO**

**Daniel Al kassam Martínez**



Reservados todos los derechos  
© El autor  
Edita: Universidad de Oviedo  
Biblioteca Universitaria, 2009  
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 51  
ISBN: 978-84-692-1367-4  
D.L.: AS. 00736-2009

Los Doctores D. César Álvarez-Marcos, Profesor Asociado de Otorrinolaringología del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Universidad de Oviedo y Médico Adjunto del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Valle del Nalón, D. Juan Ramón de los Toyos González Profesor Titular de Inmunología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo y D. José Luis Llorente Pendás, Profesor Titular de Otorrinolaringología del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas de la Universidad de Oviedo y Médico Adjunto del Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Central de Asturias.

**CERTIFICAN:**

que la tesis doctoral realizada por Don. Daniel Al Kassam Martínez, licenciado en Farmacia, titulada “*Marcadores tumorales en la predicción de metástasis en el cáncer escamoso de cabeza y cuello*” ha sido realizada bajo nuestra dirección, y a nuestro juicio reúne los requisitos de calidad científica en su diseño, desarrollo y conclusiones, necesarias para que pueda optar con él al grado de Doctor por la Universidad de Oviedo.

Y a los efectos oportunos lo hacemos constar en Oviedo a 6 de Marzo del 2006

Fdo. Dr. César Álvarez  
Marcos

Fdo. Dr. Juan Ramón  
de los Toyos González

Fdo. Dr. José Luis  
Llorente Pendás

**A mis padres**

Quiero mostrar mi **agradecimiento** a las siguientes personas, sin las cuales este trabajo no hubiera podido ser realizado:

Al Doctor César Álvarez Marcos por la confianza que mostró en mí en los momentos iniciales de este estudio, por darme la oportunidad de hacerlo viable, y por sus inestimables consejos durante la elaboración de esta tesis.

A los Doctores José Luís Llorente Pendás y Juan Ramón de los Toyos González, por su apoyo constante, y por prestarme sus conocimientos y recomendaciones a lo largo de todo el estudio.

Al Doctor Ignacio Blanco, por su ayuda desinteresada y su colaboración para mejorar el conocimiento científico y la investigación desde el Hospital Valle del Nalón.

A la Dra. M<sup>a</sup> Paz Albalad, por su apoyo y ánimos en la realización de esta tesis durante mi periodo de residencia, agradecimiento que quiero hacer extensible a todos mis compañeros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Valle del Nalón.

A la Dra. Pilar Leiva, a Teresa, Carmen y a todo el área de serología del Servicio de Microbiología II del Hospital Central de Asturias, por su colaboración, su ayuda y su confianza.

A mis amigos, en especial a Diego, Luís María, Santiago y Miguel Ángel, por su apoyo y constante ánimo, en especial durante estos últimos meses.

A mi familia, particularmente a mi hermano Miguel.

A Raquel.

## **ÍNDICE**

## ÍNDICE

**I. INTRODUCCIÓN.....pág 5**

### **II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

#### **II. 1. ANTECEDENTES DEL CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO**

II.1.1. *Epidemiología*

II.1.2. *Etiología*

II.1.3. *Histopatología*

II.1.4. *Clínica y diagnóstico*

II.1.5. *Localización y estadificación*

II.1.6. *Tratamiento y pronóstico*

II.1.7. *Modelos de progresión tumoral. Metástasis.*

#### **II.2. ESTADO ACTUAL DE LOS MARCADORES TUMORALES**

II.2.1. *Marcador tumoral. Concepto y clasificación*

II.2.2. *Utilidad clínica*

II.2.3. *Marcadores de metástasis*

#### **II.3. MODELO TEÓRICO**

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **IV. MATERIAL Y MÉTODO**

#### **IV.1. SELECCIÓN DE PACIENTES Y MUESTRAS. DISEÑO DEL ESTUDIO**

#### **IV. 2. ESTUDIO SEROLÓGICO**

IV.2.1. *Análisis quimioluminiscente (AgSCC)*

IV.2.2. *Análisis inmuno-radiométrico (CYFRA 21.1)*

IV.2.3. *Análisis por ELISA (E-cadherina, MMP 2, 9,13 y Ac anti-p53)*

#### **IV.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES**

#### **IV.4. ESTUDIO ESTADÍSTICO Y BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA**

IV.4.1. *Pruebas empleadas*

IV.4.2. *Terminología aplicada al estudio de marcadores tumorales*

IV.4.3. *Búsqueda bibliográfica*

### **V. RESULTADOS**

#### **V.1. CLÍNICO-PATOLÓGICOS**

#### **V.2. ANALÍTICOS**

V.2.1. *SCC*

V.2.2. *CYFRA 21.1*

V.2.3. *E-cadherina*

V.2.4. *MMP-2*

V.2.5. *MMP-9*

V.2.6. *MMP-13 activada*

V.2.7. *Ac anti-p53*

V.2.8. *Análisis multimarcaador*

### **VI. DISCUSIÓN**

#### **VI.1. ASPECTOS CLINICOS**

#### **VI.2. ASPECTOS ANALÍTICOS**

### **VII. CONCLUSIONES**

### **VIII. PROYECTOS FUTUROS**

### **IX. BIBLIOGRAFÍA**

### **X. ANEXOS**

## **Abreviaturas**

CEA: antígeno carcino-embionario

CECC: cáncer escamoso de cabeza y cuello

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

IC: intervalo de confianza

MMP: metaloproteasa

MT: marcador tumoral

MTS: marcadores tumorales séricos

PAAF: punción aspiración con aguja fina

PD- ECGF: factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas

PET: tomografía por emisión de positrones

PF4: factor plaquetario 4

PSA: antígeno prostático específico

RNM: resonancia nuclear magnética

ROC: características operativas relativas

AgSCC: antígeno de células escamosas

TAC: tomografía axial computerizada

TIMP: inhibidor tisular de metaloproteasas

cTNM: estadificación tumoral clínica (T: tumor, N: metástasis ganglionar, M: metástasis a distancia)

pTNM: estadificación tumoral patológica

VAS: vías aerodigestivas superiores

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

VPN: valor predictivo negativo

VPP: valor predictivo positivo

UICC: Unión Internacional Contra el Cáncer.

## **I. INTRODUCCIÓN**

## I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) representa un problema socio-sanitario de primer orden, no sólo por su alta incidencia en nuestra comunidad, sino también porque su control supone un elevado coste tanto para el enfermo como para la sociedad. En el momento actual podemos considerar que uno de cada dos pacientes conseguirá sobrevivir a su enfermedad, siendo el condicionante principal de su pronóstico la presencia de metástasis linfáticas cervicales. La exploración clínica y las pruebas de imagen (TAC y RMN) son las técnicas realizadas para su detección durante el estudio preoperatorio. Sin embargo, dependiendo de la localización del tumor primario, un número nada desdeñable de estas metástasis (20%) pasan desapercibidas, obligando a un tratamiento quirúrgico o radioterápico profiláctico indiscriminado. Así, la clasificación cTNM se modifica frecuentemente en la pTNM, pasando de estadios clínicos iniciales (I,II) a estadios patológicos avanzados (III-IV). Este planteamiento empírico es poco selectivo y muchos pacientes sin metástasis ganglionares (pN-) deben padecer la morbilidad propia de esta terapéutica, a la que se suma la supresión de la principal barrera frente a la progresión tumoral, sin beneficio alguno. En los últimos años se ha producido un desarrollo muy importante de la cirugía cerrada con láser, que en manos expertas reduce la morbilidad de la cirugía abierta y mantiene los mismos índices de supervivencia. Sin embargo, sólo permite abordar el tumor primario, mientras que las posibles metástasis deben seguir tratándose con cirugía abierta o radioterapia. Este abordaje mixto resta eficacia y coherencia al tratamiento con láser y añade morbilidad y costes, a menudo, innecesarios. Sería por tanto un gran avance poder indicar de forma individual y selectiva el tratamiento de los ganglios cervicales, sólo en el caso de que tuviesen metástasis. Son muchas las evidencias acumuladas que nos llevan a suponer que el CECC es una enfermedad con base genética y metabólica con cambios importantes en el ambiente bioquímico de los pacientes. En lo que se refiere a las metástasis, estos cambios han sido estudiados en el tejido tumoral obteniendo diversos marcadores específicos (CD44, E-cadherina...) capaces de predecirlas de forma individual, pero con el inconveniente de haberse realizado en estudios retrospectivos y sobre la pieza quirúrgica. Una línea de estudio muy prometedora sería la que relacionase los marcadores tumorales séricos (MTS) con las metástasis ganglionares o a distancia. Hay marcadores muy conocidos, pero otros más recientes aún no han sido suficientemente estudiados. El desarrollo de las técnicas de detección en suero ha contribuido mucho a mejorar su sensibilidad y especificidad. Esta determinación sérica podría realizarse de forma rápida en el estudio preoperatorio, antes del planteamiento terapéutico.

## **II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

## II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

### II. 1. ANTECEDENTES DEL CÁNCER ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

#### II.1.1. *Epidemiología.*

Cada año se diagnostican a nivel mundial 500.000 nuevos casos de CECC que vienen a representar entre el 5-10% de todos los tumores malignos<sup>1</sup>. Son los países del sur de Europa y entre ellos España los que tienen mayores tasas de incidencia: 40-42 casos/100.000h/año en varones y 0,6 casos/ 100.000h/ año en mujeres<sup>2</sup>. La mortalidad es de 14-15/100.000h/año (2,2-3,7% de todos los tumores malignos)<sup>3</sup>. El Principado de Asturias es una de las Comunidades Españolas con mayor incidencia, habiéndose diagnosticado 3.517 casos entre 1982-93, ocupando el CECC el 6º lugar en varones tras pulmón, colon, vejiga, próstata y estómago, con una ligera tendencia ascendente<sup>4</sup>.

La mayoría de los CECC se originan en el epitelio de las vías aerodigestivas superiores (VAS), siendo el órgano más afectado la laringe (50%), seguida por la faringe (30%) y cavidad oral (10-15%), mientras que el resto de localizaciones (cavidad nasal y senos paranasales, hueso temporal) tienen mínima incidencia. Dentro de la laringe predomina la región supraglótica (70%) (14-16 casos/100.000h/año), mientras que los tumores glóticos son menos frecuentes (30%)(6-8 casos/100.000h/año), al contrario de los que ocurre en los países anglosajones, donde el predominio es de los glóticos (65-70%). En la faringe destaca la orofaringe (45-50%) y la hipofaringe (50%), con 5-6 casos/100.000h/año cada una, que también tienen alta incidencia con respecto a otros países, mientras que los tumores de rinofaringe son escasos (1-2 casos/ 100.000h/año). El CECC es un tumor de predominio masculino (95%), aunque en los países anglosajones la relación entre sexos disminuye y se sitúa en 5:1. Hay localizaciones donde la incidencia en mujeres es más alta que la señalada como son cavidad oral, senos y rinofaringe, pero sin superar a los varones<sup>5</sup>. Mención aparte es el tiroides donde los tumores malignos afectan más a mujeres, pero con un número muy limitado de carcinomas escamosos. Podemos considerar al CECC una patología propia de los 60-70 años, aunque se ha observado tendencia a disminuir la edad de aparición en laringe y faringe en pacientes inmunodeprimidos, siendo la edad media en el carcinoma de rinofaringe de 40-50 años<sup>1,2</sup>.

### II.1.2. Etiología.

Aunque la etiología del CECC sigue siendo desconocida, existen diversos factores ambientales y genéticos relacionados con su aparición, algunos de forma clara y otros más controvertidos<sup>6</sup>. Es muy evidente el consumo del alcohol y tabaco (90%), sobre todo en el sexo masculino y en cavidad oral, laringe y faringe. Hay excepciones a esta regla como son la cavidad oral en mujeres y los tumores de fosas nasales y rinofaringe.

Respecto al tabaco se ha visto relación dosis-efecto, con riesgo 6-15 veces superior de padecer un CECC entre los fumadores<sup>7</sup>. El humo del tabaco contiene miles de sustancias carcinogénicas con capacidad para actuar como iniciadoras y promotoras del cáncer. El consumo de alcohol también se asocia a este tipo de tumor<sup>8</sup>, sobre todo en cavidad oral, laringe supraglótica y faringe, donde potencia el efecto del tabaco. Un buen número de estos pacientes presentan antecedentes de alcoholismo crónico.

Al igual que ocurre con la enfermedad por reflujo gastro-esofágico (ERGE), en la cual el contacto prolongado de la mucosa con la secreción ácida gástrica induce la aparición de metaplasia de Barret y el posible desarrollo de adenocarcinomas, en la mucosa de las VAS provoca la aparición de metaplasia escamosa y el desarrollo de displasias epiteliales y carcinomas escamosos. Los estudios que sustentan esa teoría han detectado casos de cáncer laríngeo en pacientes sin exposición a los carcinógenos habituales (tabaco y alcohol) pero con reflujo como único factor de riesgo<sup>9</sup>. Un hecho similar acontece en la cavidad oral, pero en relación con la irritación crónica y la boca séptica, en la fosa nasal con la sinusitis crónica y en el hueso temporal con la otitis crónica.

El virus del papiloma humano (VPH) 16 y 6b se ha relacionado con el desarrollo de tumores malignos faringolaríngeos y en la papilomatosis<sup>10</sup>. La integración de ADN viral en el genoma de las células epiteliales produce la sobreexpresión de las proteínas E6 y E7 que inactivan genes supresores de tumores (*P53* y *Rb*), y por tanto favorecen la transformación de la célula huésped en célula tumoral. El virus de Epstein-Barr tiene un papel primordial en el desarrollo del cáncer de rinofaringe.

La exposición laboral al asbesto, níquel, alquitrán (laringe), nitrosaminas (rinofaringe), polvo de madera (fosa nasal), radiaciones ionizantes (tiroides) y rayos ultravioleta (labio) se han documentando extensamente como agentes etiológicos en todas las localizaciones, pero con el predominio señalado<sup>11</sup>.

El CECC no es considerado un tumor hereditario, aunque sí se han observado antecedentes familiares en el 50% de los casos, sobre todo de neoplasias pulmonares (77%). Esta predisposición fue observada en CECC, colón y pulmón, con mayor susceptibilidad a carcinógenos ambientales al tener reducida su capacidad genética para reparar el ADN. Se

explicaría así el hecho de que pacientes jóvenes no fumadores desarrollen CECC (mutágeno sensibles), mientras que grandes fumadores no lo desarrollen (mutágeno resistentes)<sup>12</sup>.

### II.1.3. *Histopatología.*

Los CECC se originan en el epitelio superficial de la VAS, ya sea inicialmente escamoso o respiratorio con metaplasia, y por eso se denominan carcinomas escamosos o epidermoides (90-95%). Otros tipos histopatológicos similares menos frecuentes son el carcinoma verrucoso, indiferenciado, epidermoide basaloide etc.

Según el grado de diferenciación, pleomorfismo y actividad mitótica, los CECC se clasifican en bien, moderada y pobremente diferenciados. Los dos primeros se dan más en glotis y cavidad oral, mientras que en faringe y supraglotis lo hacen los poco diferenciados, con predominio de indiferenciados en rinofaringe. Se atribuye mayor agresividad a los tumores menos diferenciados, aunque este hecho no siempre va parejo con la supervivencia. Hay sistemas de clasificación histopatológicos más complejos que incluyen diferenciación, pleomorfismo, mitosis, infiltración, profundidad, invasión vascular y respuesta linfoplasmocitaria, pero no es extraño observar que tumores similares tienen distinta evolución clínica<sup>13</sup>.

### II.1.4. *Clínica y diagnóstico.*

La clínica del CECC es muy variada y depende de la localización del tumor primario. Podemos considerar signos de alarma: disfonía, odinofagia, otalgia, obstrucción nasal, sangrado, bultos cervicales indoloros (cN+); todo ello en un paciente con perfil de riesgo. La localización del tumor primario condiciona esta sintomatología así como las metástasis ganglionares, que son el factor pronóstico más importante<sup>14</sup>.

Los tumores glóticos se manifiestan de forma precoz por disfonía y así su detección se hace en fases iniciales con escaso número de metástasis, que se incrementaría si el tumor tuviese mayor tamaño (T), como ocurre en los transglóticos (30-40%). Esto contrasta con el alto número de metástasis de los tumores faríngeos y supraglóticos (50-70%), que presentan clínica inespecífica y poco llamativa. En el resto de las localizaciones (fosa nasal, hueso temporal) son escasas (<10%), pero si aparecen el pronóstico es ominoso.

El diagnóstico se realiza, la mayoría de las veces en estadios avanzados (III-IV), por medio de la inspección por visión directa o a través del endoscopio y la palpación cervical. Así, determinamos la extensión tumoral, la función vocal y la presencia de ganglios (cN+). Podemos también realizar autofluorescencia e identificar tejido mucoso sospechoso próximo al tumor o más alejado en las VAS. Las técnicas de imagen (TAC, RNM, PET)

son útiles para valorar la afectación de órganos, cavidades, hueso y partes blandas, así como para identificar la presencia de ganglios sospechosos de > 0,5 cm (Figura 1).



Figura 1. TAC donde se observa un tumor supraglótico (1) y una metástasis ganglionar (flecha).

Un hecho clínico frecuente es la observación de adenopatías en las pruebas de imagen no demostradas en la exploración, que también serían cN+, aunque con estas técnicas se observa un porcentaje nada desdeñable de falsos positivos y negativos <sup>4,5</sup>.

Por último, el estudio histopatológico es imprescindible en el tumor primario para establecer su estirpe y planificar el tratamiento. La biopsia se obtiene habitualmente de forma ambulatoria por medio de visión directa o endoscopia, aunque no es infrecuente tener que realizarla en quirófano. En las metástasis ganglionares no se debe hacer nunca la biopsia del ganglio por el riesgo de diseminar el tumor, pero la PAAF, a veces eco o TAC dirigida, puede ser de gran utilidad evitando ese riesgo. Los estudios inmunohistoquímicos completan el arsenal diagnóstico en los casos histopatológicamente complicados.

#### II.1.5. Localización y estadificación.

El término cabeza y cuello es muy amplio y abarca una extensa zona de las VAS y de las partes blandas del cuello donde puede desarrollarse la neoplasia. Por frecuencia, la laringe (supraglótica y glótica), faringe (oro e hipo), cavidad oral, rinofaringe, fosa nasal, hueso temporal y tiroides son las localizaciones donde se desarrollan más carcinomas escamosos. La frecuencia de metástasis ganglionares también es variable según la localización. Se han descrito un número importante de metástasis ocultas clínicamente (cN-), pero observadas en el estudio histopatológico del ganglio (pN+), que corresponderían a las denominadas micrometástasis. Serían por tanto la diferencia entre el porcentaje real y las demostradas por la clínica (Tabla I).

Tabla I. Metástasis ganglionares en las distintas localizaciones de cabeza y cuello. Se especifican también las metástasis ocultas en la clínica pero demostradas en la histopatología.

Localización tumoral	Metástasis ganglionar pN+	Metástasis ocultas cN-
Rinofaringe	86-90%	
Base de lengua	50-75%	35-50%
Hipofaringe	52-78%	38-56%
Paladar	60%	30-40%
Supraglotis	31-64%	16-26%
Suelo de boca	30-59%	21-50%
Lengua móvil	34-65%	25-45%
Mucosa oral	9-31%	0-10%
Glottis	5%	

El sistema TNM se emplea para clasificar de forma uniforme y consensuada los CECC (estadificación) y así valorar con los mismos criterios el tamaño y la extensión tumoral. Es muy útil para estandarizar los resultados terapéuticos y comparar estudios. No obstante, está muy limitado para establecer el pronóstico individual, al no contemplar aspectos como el volumen tumoral, rotura de la cápsula ganglionar, respuesta inmunitaria y agresividad intrínseca del tumor, decisivos para la evolución posterior<sup>15</sup>.

Dentro de la estadificación TNM, un hecho fundamental para el pronóstico son las metástasis ganglionares, que condicionan la pN+, y el paso desde estadios precoces (I, II) a avanzados (III, IV)<sup>1, 3-5</sup>. A medida que aumenta el estadio, va disminuyendo la supervivencia de los pacientes, llegando a verse reducida en el 40% en pN+ con respecto a pN-. En los ganglios cervicales es frecuente la forma de micrometástasis que obliga a realizar múltiples cortes seriados para su diagnóstico correcto (Figura 2), influyendo en el pronóstico negativamente el número de ganglios afectados. La presencia de extensión extracapsular en las metástasis ganglionares cervicales reduce la supervivencia del 78% al 22%, al aumentar el riesgo de recidiva tumoral. Sería muy complejo y reiterativo citar el TNM de todas las localizaciones del CECC, así que a modo de ejemplo exponemos en la tabla II el de la laringe supraglótica, que difiere de otras localizaciones en la categoría T, siendo M y N similar en todas ellas, excepto esta última en el tiroides.

Se puede consultar la clasificación TNM completa de los tumores ORL en el enlace web: [http://www.seorl.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=142&Itemid=213poner](http://www.seorl.org/index.php?option=com_content&task=view&id=142&Itemid=213poner).

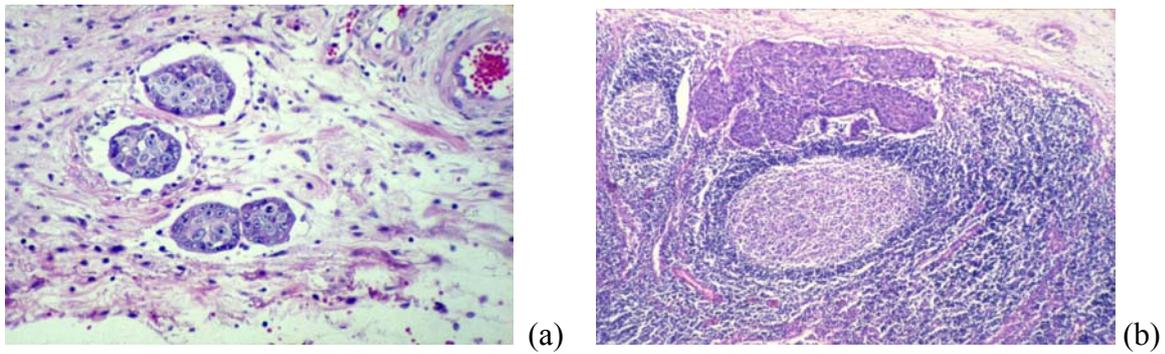


Figura 2. Émbolos tumorales en vasos linfáticos (a). Micrometástasis en un ganglio linfático rodeada por folículos linfoides (b).

### II.1. 6. *Tratamiento y pronóstico.*

La cirugía es el método de elección en la mayoría de las localizaciones, tanto del tumor primario como de las metástasis ganglionares, muchas ocultas clínicamente (cN-), pero presentes en el estudio histopatológico (pN+). Por ese motivo el vaciamiento cervicoganglionar debe hacerse siempre de forma profiláctica, cuando la posibilidad de metástasis ganglionares ocultas supere el 15-20%. Hay detractores del vaciamiento ganglionar indiscriminado en cuellos cN-, argumentando que supone la eliminación, en muchos casos innecesaria, de un mecanismo de defensa frente a la neoplasia. La resección del tumor primario se realizará con márgenes amplios, si no hay barreras anatómicas, como es el caso de la faringe, donde son frecuentes las recidivas locales. En los últimos años se ha impuesto el láser de CO<sub>2</sub>, muy útil en lesiones de pequeño tamaño (T1 y T2) de la glotis, pero que va ampliando sus indicaciones a cavidad oral, orofaringe, supraglotis e hipofaringe. El tratamiento de las posibles metástasis ganglionares es un aspecto controvertido desde la introducción del láser en tumores distintos a los glóticos, con mayor probabilidad de metástasis ocultas, tratando de buscar un marcador tisular que las demuestre, con el fin de indicar el vaciamiento ganglionar sólo en casos seleccionados. Una alternativa a los cuellos cN- es la radioterapia externa, sobre todo en el caso de indicar radioterapia en el tumor primario, para no agotar las posibilidades de los dos tratamientos en caso de recidiva. También tiene detractores sobre todo por la fibrosis tisular y los posibles tumores radioinducidos. En nuestro medio la cirugía externa sigue manteniéndose en las distintas variantes de vaciamiento ganglionar, siendo preferible el de tipo selectivo en caso de cN-.

Una forma de indicar el vaciamiento de forma individual a cada paciente sería con el estudio del ganglio centinela. Sin embargo, la mayoría de los CECC no son susceptibles de su realización técnica, y sólo zonas accesibles como la cavidad oral pueden beneficiarse de su empleo. Los tumores primarios avanzados (III-IV) de cavidad oral, laringe y faringe, o

de fosa nasal y hueso temporal, siguen teniendo la mayoría de las veces indicación de cirugía externa. En muchos casos, sobre todo en tumores avanzados (estadios III-IV) la cirugía debe extirpar zonas de órganos que intervienen en la fonación y en la deglución, ocasionando graves secuelas funcionales para el paciente. La radioterapia se plantea de forma radical en la rinofaringe o en tumores incipientes (T1) de laringe, faringe o cavidad oral. También sirve de complemento a la cirugía cuando los bordes de resección son dudosos o afectados y se constatan metástasis ganglionares o rotura capsular. La quimioterapia sólo tiene interés asociada a radioterapia como alternativa a la cirugía en grandes tumores que precisen técnicas muy agresivas, dentro de un protocolo de preservación de órgano.

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento conseguidos en las últimas décadas, la supervivencia no ha experimentado mejoras sustanciales, desde el 60-70% en la laringe hasta el 20-30% en algunas zonas de la faringe, siempre en relación con la presencia de pN+. Las metástasis a distancia no son infrecuentes y cuando aparecen lo hacen a nivel óseo o pulmonar (3-20%), estando relacionadas con las metástasis ganglionares previas. Se han demostrado células neoplásicas en sangre periférica en tumores con estadios precoces sin que se manifiesten metástasis clínicas en los ganglios<sup>6</sup>. En relación a la supervivencia, la mayoría de los decesos (85%) se deben a las recidivas locales o regionales en los dos primeros años. También es frecuente el desarrollo de segundas neoplasias, sincrónicas o metacrónicas al tumor primario, en la VAS, esófago o pulmón (10-40%), que estarían en relación con la teoría del “Campo de Cancerización”<sup>16</sup>. La aparición de un segundo tumor primario, sobre todo de origen pulmonar o esofágico tiene un pronóstico ominoso. La quimioprofilaxis con retinoides sintéticos no evita la aparición de los segundos tumores, pero frenaría la carcinogénesis en lesiones preinvasivas<sup>4</sup>.

Tabla II.- Clasificación TNM y estadificación en los tumores de laringe supraglótica (UICC)

<b>Categoría T</b>	<b>Tumor primario</b>		
<b>TX</b>	No puede ser asegurado		
<b>T0</b>	No hay evidencia		
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ		
<b>T1</b>	Afecta a una sublocalización, movilidad normal de la cuerdas vocales		
<b>T2</b>	Afecta más de una sublocalización de supraglotis o región adyacente (base de lengua, valécula..) sin fijación de laringe.		
<b>T3</b>	Tumor limitado a laringe con fijación y/o invasión de región retrocricoidea, espacio preepiglótico o paraglótico, parte profunda de la base de la lengua o erosión del cartílago tiroides		
<b>T4a</b>	Tumor que invade el cartílago tiroides y/o se extiende hacia los tejidos blandos del cuello, glándula tiroides y/o esófago		
<b>T4b</b>	Tumor que invade espacio prevertebral, mediastino y arteria carótida interna		
<b>Categoría N</b>	<b>Ganglios linfáticos regionales</b>		
<b>NX</b>	No se puede asegurar su existencia		
<b>N0</b>	Ausencia de nódulos metastásicos		
<b>N1</b>	Metástasis en un único nódulo linfático ipsilateral ≤ 3 cm		
<b>N2a</b>	Metástasis en único nódulo linfático ipsilateral de > 3 cm pero < 6 cm		
<b>N2b</b>	Múltiples nódulos linfáticos ipsilaterales, ninguno > de 6 cm		
<b>N2c</b>	Nódulos linfáticos bilaterales o contralaterales ninguno > de 6 cm		
<b>N3</b>	Nódulo linfático de > 6 cm		
<b>Categoría M</b>	<b>Metástasis a distancia</b>		
<b>MX</b>	No se puede asegurar su existencia		
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis		
<b>M1</b>	Presencia de metástasis		
<b>ESTADIO</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>III</b>	T1, T2 T3	N1 N0, N1	M0 M0
<b>IVA</b>	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0 M0
<b>IVB</b>	T4b Cualquier T	Cualquier N N3	M0 M0
<b>IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

Se ha tratado de identificar los factores pronósticos más importantes para poder predecir la evolución del paciente y emplear las estrategias terapéuticas más eficaces en cada caso.

En el CECC algunos de estos factores son “propios del paciente” como la edad. En general, parece que los pacientes jóvenes tienen peor pronóstico, mientras que si superan los 60 años disminuye el riesgo de recidiva por una mayor estabilidad genética celular<sup>17</sup>.

El paciente con CECC suele presentar un deterioro importante de su estado general (escala de Karnofsky) por problemas respiratorios severos derivados del hábito tabáquico, etilismo crónico (hepatopatía) y el estado de inmunodeficiencia que éste provoca, asociándose la

respuesta inmune inducida por el tumor (eosinófilos, linfocitos T) a menor riesgo de recidivas.

Las células plasmáticas parecen tener efecto contrario, en relación con la síntesis de anticuerpos (IgA) que disminuyen la eficacia del propio sistema inmune. Hay un déficit a nivel tumoral y en sangre periférica de linfocitos T citotóxicos (LTc), linfocitos T supresores (LTs) y de células “Natural Killer” (NK), que se han relacionado con la incidencia de metástasis a distancia<sup>18</sup>. Los ganglios linfáticos también reaccionan ante la progresión tumoral aunque no se constate su invasión. Así, la histiocitosis sinusal, hiperplasia folicular y la abundancia de células plasmáticas en el ganglio se relacionan con mayor supervivencia, mientras que la depleción linfoide tiene peor pronóstico<sup>19</sup>.

Entre los factores “propios del tumor” tienen importancia en el mal pronóstico, la localización (zonas más silentes clínicamente y con mayor capacidad de metástasis) y el estadio avanzado, sobre todo por las metástasis ganglionares pN+, debiendo considerar las frecuentes micrometástasis, el número de ganglios afectados y la rotura capsular. Otros factores más recientemente estudiados se muestran en la tabla III.

Tabla III. Factores pronósticos relacionados con el CECC.

Procedimiento	Mal pronóstico		Buen pronóstico
Modo invasión	Infiltrante		Vegetante
Diferenciación	Poco, indiferenciado		Bien
Ploidía	Aneuploidía, fase S alta		Diploidía, fase S baja
Biología molecular	(amplificaciones) 11q13( <i>PRADI</i> ) 7p12-14( <i>ERBI</i> )	(pérdidas) 9p21 ( <i>MTS1</i> ) 17p13.1 ( <i>TP53</i> )	
FISH	Aneusomía y polisomía 8 y 9		
Inmunohistoquímica	Ki67, ciclina D1, p53, CD44		E-cadherina

En lo que se refiere a los factores pronósticos “propios del tratamiento” tenemos como positivos la quimio y radiosensibilidad con respuesta completa y entre los negativos los márgenes quirúrgicos afectados<sup>20</sup> y la traqueotomía previa a la cirugía por el riesgo de recidivas estomales<sup>21</sup>.

### II.1.7. Modelos de progresión tumoral. Metástasis.

Se ha establecido un modelo de progresión en el CECC que contempla su evolución desde lesiones preinvasivas (hiperplasia, displasia, carcinoma in situ) a carcinoma invasivo. Este modelo estaba basado en el propuesto para el cáncer colorrectal y establece la pérdida de heterocigosidad de determinados genes supresores. Estima que en el desarrollo del fenotipo invasivo del CECC están implicadas entre 6-10 alteraciones genéticas de forma cronológica y acumulativa<sup>22</sup>. Sin embargo, este modelo es bastante simplista al considerar que la clave de la progresión está sólo en 10 genes, dentro de la complejidad e interacciones del genoma, y no contempla un fenómeno tan importante en la progresión tumoral como son las metástasis ganglionares (Figura 3).

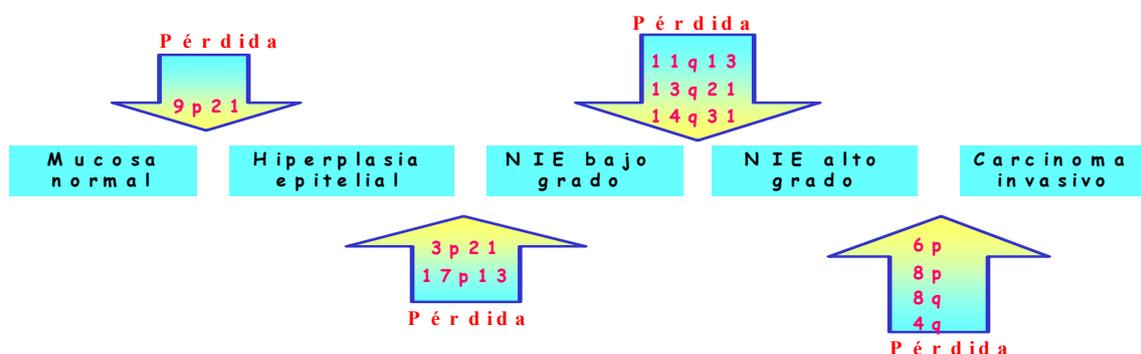


Figura 3. Modelo de progresión en el cáncer de cabeza y cuello (Califano et al ).

El fenómeno de las metástasis es una cascada de acontecimientos con interacción entre las células tumorales y el organismo. El tumor primario forma un clon celular que adquiere rápidamente un grado variable de heterogeneidad al acumular mutaciones de forma progresiva. Esto conduce al tumor a superar los pasos de la cascada metastásica, seleccionando las células más agresivas.

En resumen, los pasos fundamentales de este complejo proceso serían (Figuras 4 y 5):

- 1) **Invasión.** Los tumores malignos presentan cambios en la adhesión normal de las células. Se produce una pérdida de las moléculas de adhesión entre las mismas células tumorales que facilita su movilidad. En estas moléculas están integradas las inmunoglobulinas (CAM, DCC, CEA, MUC18...) <sup>23,24,25</sup> y las cadherinas (E-cadherina) <sup>26</sup>. También hay alteraciones en la adhesión entre células de distinto tipo (ICAM-1) <sup>27</sup>, como la establecida entre las células tumorales y el endotelio vascular.

Por último, hay moléculas que participan en la adhesión entre la célula y diversas sustancias del sustrato o matriz extracelular (integrinas/FAK, CD44, laminina)<sup>28,29</sup>.

- 2) **Proteólisis.** El tumor debe degradar la matriz extracelular en su borde para proseguir la invasión. Este proceso surge del desequilibrio entre las enzimas proteasas (metalo o serinproteasas) y sus inhibidores<sup>30,31</sup>. Las metaloproteasas más importantes son las colagenasas (MMP 1, 8, 13, 18), las estromelinas (MMP 3, 10, 7) y gelatinasas (MMP 2 y 9). Las serinproteasas principales son la plasmina y los activadores del plasminógeno.
- 3) **Movilidad.** Las células tumorales tienen capacidad para moverse activamente (proteínas Cdc42, Rac 1 y Rho, Tiam1)<sup>32,33,34</sup> y dependen de factores autocrinos o paracrinos que regulan esta movilidad (HGF, autotaxina, IGF1, IL8...)<sup>35</sup>.
- 4) **Angiogénesis.** El crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis son estrictamente dependientes de la formación de vasos sanguíneos, tanto para su nutrición como para diseminarse. La angiogénesis es un proceso normal en el que se forman vasos sanguíneos en determinadas situaciones (cicatrización, ciclo menstrual...), pero que también se activa en el crecimiento e invasión tumoral, siendo un riesgo para las metástasis. El efecto de la angiogénesis sobre la invasibilidad tumoral se debería a la reducción de la tasa de apoptosis celular y al predominio de células proliferantes. Las células endoteliales proliferan por los estímulos de algunos factores como FGF (1, 2,3,4)<sup>36</sup>, VEGF (A,B,C)<sup>37</sup>, angiogenina<sup>38</sup> y PD- ECGF<sup>39</sup>, y se ven inhibidas por PF4, TIMP, trombospondina y angioestatina<sup>39</sup>.
- 5) **Diseminación-colonización.** Las células tumorales deben penetrar en los vasos (intravasación), mantenerse en la sangre y poder abandonar el torrente circulatorio (extravasación) justamente en el órgano diana de la metástasis. La viabilidad de estas células en el torrente circulatorio es mayor de lo que se pensaba, aunque sólo una mínima parte forman colonias metastásicas en determinados órganos<sup>40</sup>. Esta capacidad órgano-específica de ciertos tumores se explica por el microambiente del órgano diana, unido a las características anatómico-mecánicas de sus vasos capilares.



Figura 4. Modelo del proceso tumoral en el CECC.

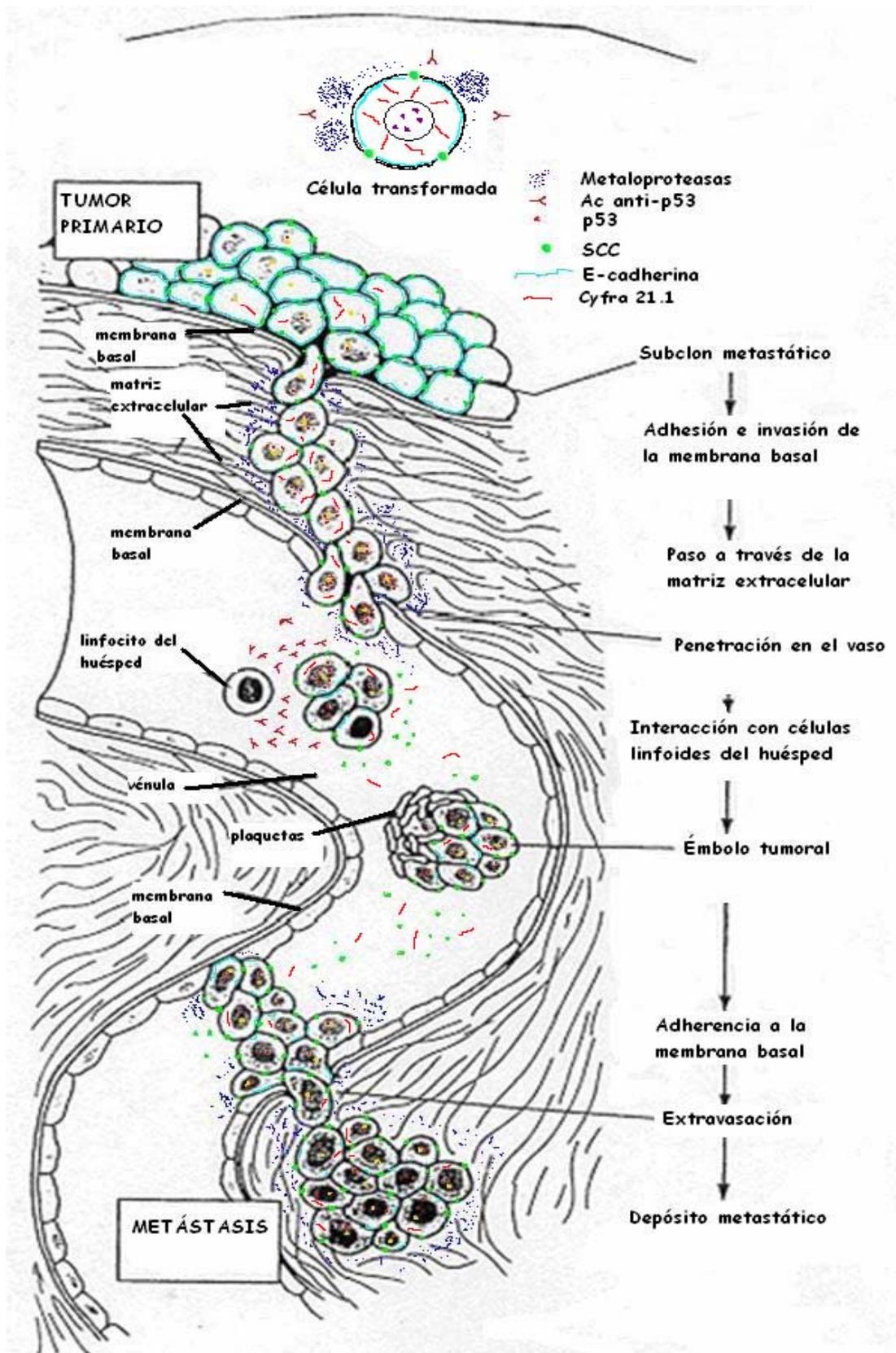


Figura 5. Esquema del proceso metastático e interacción de diferentes proteínas en sus pasos.

## II.2. ESTADO ACTUAL DE LOS MARCADORES TUMORALES

### II.2.1. Marcador tumoral. Concepto y clasificación.

Los marcadores tumorales (MT) son sustancias sintetizadas por las células neoplásicas o sanas en respuesta al tumor. Desde el punto de vista bioquímico son proteínas, con o sin actividad enzimática, detectadas en los fluidos extracelulares, durante o antes incluso de la manifestación clínica del tumor o de su recidiva precoz, permitiendo monitorizar la respuesta al tratamiento. Los MT sintetizados por las células neoplásicas suelen ser moléculas con capacidad antigénica que se localizan en la membrana celular. Los oncogenes y los genes supresores de tumores no se encuentran en los fluidos extracelulares y no se ajustan a la definición de MT, pero son empleados con fines pronósticos bajo el nombre de marcadores genéticos.

Se puede decir que el concepto de MT es amplio y cambiante, pero siempre pone de relevancia procesos relacionados con el desarrollo y la progresión tumoral. El primer MT fue la proteína de Bence Jones constituida por una cadena ligera de inmunoglobulina monoclonal que se produce en exceso y se detecta en la mitad de los pacientes con mieloma. Posteriormente se han descrito gran número de MT que clasificamos según sus características bioquímicas (Tabla IV), que están en relación con determinadas neoplasias <sup>41,42,43</sup> (Tabla V).

Tabla IV. Principales marcadores tumorales aplicados clínicamente.

Clasificación de los marcadores tumorales circulantes más utilizados.	
Antígenos oncofetales	Antígeno carcinoembrionario (CEA) Alfafetoproteína (AFP) Gonadotropina coriónica humana (HCG)
Glucoproteínas	Antígeno específico de la próstata (PSA) CA-125 CA15-3 CA19.9 CA72.4
Enzimas	Lactato deshidrogenasa (LDH) Enolasa neuronoespecífica (NSE) Fosfatasa ácida Fosfatasa alcalina
Hormonas	Serotonina Catecolaminas ACTH ADH
Proteínas séricas	Tiroglobulina Ferritina Inmunoglobulinas Beta-2-microglobulina
Otros	Cobre, zinc, hidroxiprolina

Tabla V. Marcadores tumorales y neoplasias relacionadas.

Relación entre neoplasias más comunes y MT utilizados.	
NEOPLASIA	MT
Cáncer de próstata	PSA, FAP
Tumores de células germinales	HCG, AFP, LDH
Cáncer de ovario	CA-125, LDH
Cáncer colorrectal	CEA, CA19.9
Cáncer gástrico	CEA, CA19.9
Cáncer de páncreas	CA19.9
Hepatocarcinoma	AFP
Cáncer de mama	CA 15.3, CEA
Cáncer de pulmón no de célula pequeña	CEA, CA-125
Cáncer de pulmón de célula pequeña	NSE, ACTH, ADH
Carcinoma medular de tiroides	Calcitonina
Mieloma	Inmunoglobulinas, β-2-microglobulina
Linfomas	LDH, β-2-microglobulina
Enfermedad de Hodgkin	Ferritina, cobre, zinc

MT: Marcadores tumorales

### II.2.2. Utilidad clínica.

La principal aplicación clínica de los MT es su aportación al diagnóstico del cáncer. Así, la presencia de proteína de Bence Jones en suero establece el diagnóstico de mieloma. Se ha encontrado que su concentración urinaria es muy representativa de la masa tumoral. En los años 60-70, sólo se usaba un número limitado de MT en el diagnóstico de tumores de baja incidencia como el feocromocitoma (norepinefrina) o el tumor carcinoide (vía triptófano-hidroxi-indol-acético), pero sentó las bases bioquímicas para el estudio de otros tumores más frecuentes.<sup>44,45</sup>

La fosfatasa alcalina placentaria-like (isoenzima Regan) fue de las primeras proteínas carcino-embriónicas identificadas. Se produce normalmente en la placenta por el sincitiotrofoblasto a partir de la duodécima semana de embarazo, pero se encuentra elevada en el cáncer colorrectal avanzado<sup>46,47,48</sup>. También se describió el CEA en el cáncer colorrectal, generalizándose su uso por el desarrollo de una técnica de radio-inmunoensayo altamente sensible para cuantificar su valor en plasma<sup>49,50,51</sup>. El descubrimiento del CEA sólo inició una intensa búsqueda de lo que se denominaron los antígenos tumorales fetales o proteínas carcino-embriónicas, que derivaban del estudio de determinadas enzimas asociadas a procesos glicolíticos<sup>52,53,54</sup>. Mediante inmunoensayo con anticuerpos monoclonales específicos de estas enzimas e isoenzimas se mejoró mucho su detección en cuanto a sensibilidad y especificidad. Así, isoenzimas de la fucosiltransferasa, la arilsulfatasa o la deoxitimidina trifosfatasa, se han demostrado en la progresión bioquímica de determinados tumores<sup>55,56,57</sup>.

En la actualidad muchas de las proteínas que se generan en estos mecanismos ligados al desarrollo neoplásico pueden detectarse a nivel sérico y ser útiles no sólo en el diagnóstico del cáncer, sino también en su pronóstico y seguimiento (recidiva o metástasis). Un hecho

a tener en cuenta en los MT es la frecuencia de valores elevados en enfermedades no neoplásicas y su solapamiento con los pacientes con cáncer<sup>58,59</sup>. Para mejorar su especificidad diagnóstica se ha sugerido recientemente el uso de MT múltiples. En carcinomas epiteliales la determinación en suero de CEA, CA125, CA19.9 y CA15.3 de forma simultánea ha permitido identificar arquetipos o patrones específicos para establecer el origen del tumor primario y/o el desarrollo de metástasis<sup>60,61</sup>. El mayor inconveniente de los MT múltiples lo constituye el coste y la selección adecuada de los integran cada panel. Su segunda aplicación clínica es el seguimiento del paciente durante y después del tratamiento. Los valores de los MT pueden informar sobre la remisión de la enfermedad o el desarrollo de una recidiva y de la respuesta al tratamiento, donde fallan otros procedimientos clínicos<sup>62,63</sup>. Esto ha sido corroborado en el control y seguimiento del mieloma con la proteína de Bence Jones, permitiendo ajustar o rediseñar un tratamiento de quimioterapia si se comprueba el aumento mantenido de su valor, siendo significativo de persistencia tumoral. La concentración del marcador refleja el éxito del procedimiento terapéutico (cirugía y/o quimioterapia) y su valor elevado persistente podría indicar una resección incompleta del tumor o bien metástasis o recidiva, sobre todo después de un seguimiento con cifras bajas<sup>64,65,66</sup>. Hay ocasiones en las que durante la radio y/o quimioterapia se pueden observar incrementos del MT, como ocurre con el PSA en el cáncer de próstata<sup>67</sup>.

Para hacer el seguimiento de un paciente después del tratamiento hay que determinar MT muy sensibles y específicos cada 6-12 meses, con el fin de detectar la recidiva de forma precoz. En caso de sospecha se deberían considerar períodos o intervalos más cortos. La monitorización de estos valores durante el seguimiento es más fiable que en el tratamiento pues su determinación no se interfiere o modifica por el proceso terapéutico. En esta secuencia de valores tiene importancia lo que se define como pendiente o tendencia, que es la tasa de incremento en la concentración del marcador, determinada por la frecuencia del análisis.

Otro concepto es el de densidad que es el cociente entre la concentración del marcador y el volumen de su órgano secretor. La densidad sólo tiene sentido en los casos en los que se puede evaluar el volumen tumoral con técnicas de imagen, como ocurre en el carcinoma de próstata con ecografía. En otros marcadores (CA125) sólo es posible comprobar la pendiente, de ahí la necesidad de disponer de valores seriados. Muchos MT tienen especificidad cuantitativa en vez de cualitativa, pues se sintetizan también en tejidos sanos o en procesos benignos, aunque la concentración es siempre mayor en los tumores, de ahí la necesidad de establecer un valor umbral. Para evitar estas situaciones ambiguas es mejor

valorar la pendiente en varias determinaciones y ver si se mantiene, incluso aunque se determinen valores que pudieran ser considerados como normales valorándolos individualmente <sup>62</sup>. Así, el aumento en las pendientes del PSA en pacientes sometidos a una prostatectomía total nos hace sospechar una recidiva, pues es un marcador tisular muy específico.

Por todo lo expuesto podemos interpretar que los valores séricos iniciales de algunos MT reflejan algunas características del tumor (volumen, localización, extirpe...) y se pueden incrementar con su progresión, alcanzando niveles más altos cuando el tumor primario es agresivo o ha desarrollado metástasis<sup>68,69</sup>. Sin embargo, niveles bajos no indican lo contrario puesto que muchos tumores no producen marcadores de agresividad o capacidad metastásica. La aplicación clínica en el pronóstico difiere en cada MT, unos verifican la presencia de recidiva de la enfermedad mientras que otros predicen el tiempo libre de recidiva, así como la supervivencia.

En los últimos años, se han incorporado técnicas de biología molecular que permiten estudiar muchas de las fases del ciclo celular y del desarrollo tumoral en cada una de las fases del proceso. Así, mecanismos como la apoptosis, angiogénesis, inhibición-estímulo del crecimiento, invasión y metástasis, en los que intervienen múltiples proteínas, tienen un gran potencial para aportar nuevos marcadores diagnósticos o dianas terapéuticas que permitan combatir el cáncer de manera más eficaz<sup>70,71,72,73</sup>.

### II.2.3. *Marcadores de metástasis.*

Se han estudiado diferentes MT en el CECC sin que, de momento, ninguno sea aplicable de forma decisiva en la clínica. Es una línea abierta de investigación, y en algunos estudios se pondera su valor predictivo, pero no alcanzan la utilidad diagnóstica de las neoplasias ginecológicas, hematológicas o digestivas. Es, por tanto, necesario perseverar en la búsqueda de nuevos MT y en mejorar el rendimiento de los actuales<sup>74</sup>. No parece que un solo marcador sea suficiente para predecir las metástasis en el CECC, por lo que sería interesante disponer de una batería múltiple de marcadores, específicos del tejido epitelial, relacionados con el fenómeno de progresión tumoral<sup>75</sup>. Así, se podría mejorar el rendimiento clínico de los disponibles, tanto en la posible detección preoperatoria de las metástasis, como en el diagnóstico precoz de las recidivas tumorales, donde el diagnóstico clínico y de imagen está dificultado por la cirugía y radioterapia previas.

Los principales MT séricos y tisulares, que pueden tener interés en detectar las metástasis en el CECC, porque ya han sido usados en estos u otros tumores, son:

#### *-Antígeno del carcinoma de células escamosas (AgSCC).*

Se trata de una fracción del antígeno tumoral TA-4 denominado antígeno de células escamosas (AgSCC)<sup>76</sup>, obtenido de tejido de células escamosas de cuello uterino, el cual, ha demostrado presentar concentraciones elevadas en tumores de células escamosas, incluyendo el CECC<sup>77</sup>. Esta glucoproteína aparece elevada en el suero del 60 % de los pacientes con tumores epiteliales. El límite superior de normalidad se ha fijado en 2,5 ng/ml. Se han visto umbrales superiores en enfermedades hepáticas y renales severas, al alterarse su eliminación. En CECC sus valores muestran relación con la masa tumoral, con una sensibilidad del 12% en el estadio T1 y del 90% en el T4<sup>78</sup>.

#### *- CYFRA 21.1.*

Las citoqueratinas son filamentos intermedios que forman el citoesqueleto celular y proporcionan la dureza característica de la mayoría de tumores malignos<sup>79</sup>. Bioquímicamente son polipéptidos con especificidad para cada tipo celular y cada epitelio expresa un patrón determinado. El epitelio escamoso expresa las citoqueratinas 7, 8, 9 y 19<sup>80</sup>. Esta especificidad para el tipo celular no se pierde en la transformación maligna, expresando los carcinomas escamosos el mismo patrón. CYFRA 21.1 representa los fragmentos solubles en suero de la citoqueratina 19. El valor umbral en suero, para personas sanas, es de 3,0 ng/ml. Algunos estudios realizados en cabeza y cuello mostraron a CYFRA 21.1 como un marcador aceptable para diagnóstico de carcinomas y una

herramienta útil en el seguimiento de la enfermedad. Se ha visto como después de la cirugía su valor disminuye y vuelve a aumentar en caso de recidiva<sup>81</sup>.

#### *-Anticuerpos anti-p53.*

Su expresión se puede determinar en tejido y en suero. La mutación de p53 es la alteración genética más común en los cánceres humanos y ha sido demostrada por inmunohistoquímica en el CECC. Los anticuerpos séricos de p53 son muy específicos, no expresándose en sujetos sin cáncer, pero no determinan el tipo de tumor<sup>82</sup>. En el suero de pacientes con CECC se han observado anticuerpos p53 en el 18-44%, asociándose a la expresión nuclear de la proteína detectada. A pesar de tener una sensibilidad limitada, podría ser útil en el pronóstico, pues su presencia resultó ser un marcador independiente del riesgo de recidivas y supervivencia<sup>83,84</sup>.

#### *-E-cadherina.*

Las cadherinas son proteínas de membrana dependientes de calcio que participan en la formación de uniones adherentes<sup>23,85</sup>. Hasta la fecha se ha podido demostrar un papel supresor de invasividad para un miembro de esta familia, la E-cadherina también conocida como L-CAM o uvomorulina<sup>23,86</sup>. Esta proteína responsable de la adhesión celular, puede ser determinada en tejido y en suero, relacionándose su pérdida de función con la invasión tumoral y las metástasis. Se piensa que el gen de la E-cadherina es un gen supresor que interviene en la diferenciación tumoral, pues la proteína no se expresa en el CECC poco diferenciado, aumentando progresivamente en los moderada y bien diferenciados. Los tumores sin expresión son más agresivos y con mayor incidencia a metastatizar<sup>87,88</sup>.

La forma soluble de la E-cadherina (80-84 kD), fue descubierta en el sobrenadante del medio de cultivo liberado por la línea tumoral de células tumorales humanas MCF-7<sup>89</sup>. Esta forma soluble es el producto de degradación de la forma intacta de la E-cadherina (120kD) generada por una proteólisis calcio dependiente. También se ha demostrado su presencia en fluidos biológicos de sujetos sanos, aunque los niveles séricos estaban más elevados en pacientes con cáncer<sup>90,91,92</sup>.

#### *- Metaloproteasas o matrixinas (MMP).*

Son endopeptidasas de matriz extracelular. Su determinación se hace en suero en forma de anticuerpos específicos. Hay establecida una clasificación de cuatro grupos: colagenasas, estromelinas, gelatinasas y metaloproteasas de membrana<sup>93,94</sup>. Aunque se pensaba que intervenían sólo en la rotura física de la matriz extracelular por el tumor (invasión local),

actualmente se sabe que están implicadas también en el crecimiento del tumor primario y de sus metástasis<sup>95,96</sup>. Se ha visto un aumento de la expresión de MMP-2 y MMP-9 en el CECC<sup>97</sup>. En el cáncer de laringe con sobreexpresión de colagenasa 3 (MMP-13) hay mayores tasas de progresión local y metástasis<sup>98</sup>.

### II .3. MODELO TEÓRICO

La célula epitelial sufre un cambio en su estructura genética (activación de oncogén, pérdida de gen supresor) que inicia su transformación. Se altera su ciclo y se produce un desequilibrio maduración/proliferación, con pérdida de la apoptosis o muerte programada. Se origina así un clon celular dominante inmortal que se perpetúa y adquiere supremacía sobre el resto.

El conflicto de espacio que supone el aumento del volumen tumoral debe ser solucionado por los sucesivos mecanismos de invasión, angiogénesis y metástasis (Figuras 4 y 5). Todos estos mecanismos están determinados genéticamente e intervienen en la fisiología normal de la célula (crecimiento, migración celular), formando parte del legado evolutivo, pero son utilizados por el tumor de forma aberrante para su propio beneficio. En esta progresión tumoral median un gran número de proteínas que intervienen en estos mecanismos a través de complejos procesos bioquímicos.

Las sustancias diversas que intervienen en los mecanismos de invasión y metástasis se pueden evidenciar de forma cualitativa o cuantitativa, aumentando su cantidad según el tumor progresa por los tejidos y vasos sanguíneos, aunque no se manifieste clínicamente la enfermedad. La determinación de estas sustancias en el suero sanguíneo estará en relación con la intensidad del fenómeno que queremos medir y de la sensibilidad del método para detectarlo.

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **III.1. HIPÓTESIS**

1. Los CECC representan un problema de salud importante en nuestro medio por su alta incidencia y elevada morbi-mortalidad por lo que se requieren medidas eficaces en el diagnóstico para ajustar y hacer más eficaces los procedimientos terapéuticos.
2. La progresión tumoral está determinada en pasos sucesivos (invasión, metástasis) mediados por determinadas moléculas o marcadores tumorales (MT) que se pueden detectar en el suero de los pacientes, incluso antes de que se produzca la metástasis clínica.
3. La determinación eficaz de MT múltiples y específicos de la progresión tumoral permitiría establecer un patrón de metástasis que podría aplicarse en el diagnóstico precoz y tratamiento individualizado de los pacientes con CECC.
4. La selección adecuada del tratamiento puede contribuir a mejorar la calidad de vida y supervivencia de estos pacientes.

### III.2. OBJETIVOS

- 1) Describir patrones específicos para el CECC por medio de MT séricos múltiples.
- 2) Relacionar las distintas variables clínicas y la supervivencia con los marcadores propuestos.
- 3) Predecir con dichos marcadores, la capacidad de progresión metastásica, seleccionando los más eficaces.

## **IV. MATERIAL Y MÉTODO**

#### IV. MATERIAL Y MÉTODO

En este bloque de material y método se describirá en un primer apartado los aspectos más destacados del diseño del estudio, la selección de pacientes y la toma de muestras. Un segundo apartado se dedicará al estudio serológico, diferenciando los distintos tipos de análisis y marcadores. Se describirá en cada MT el principio y protocolo del ensayo realizado. Por último, se expondrá la metodología estadística aplicada.

##### IV.1. SELECCIÓN DE LOS PACIENTES Y MUESTRAS. DISEÑO DEL ESTUDIO

Se incluyeron en el estudio los pacientes con CECC diagnosticados y tratados por los Servicios de Otorrinolaringología de los Hospitales *Central de Asturias* (HUCA, Oviedo) y *Valle del Nalón* (HVN, Langreo) de la Comunidad Autónoma del Principado de Asturias, entre enero de 2.003 y diciembre de 2.004, cerrando el estudio en mayo de 2005.

Los criterios de selección fueron los siguientes:

- Disponer de una historia que permita extraer los datos clínicos y de seguimiento.
- Diagnóstico histopatológico de CECC en el tumor primario.
- Indicación quirúrgica sobre el tumor primario y realización de vaciamiento cérvico-ganglionar.
- Ser el primer diagnóstico de la enfermedad y no haber realizado tratamientos previos con radio-quimioterapia.

El diagnóstico clínico se hizo por los procedimientos clínicos (endoscopia, biopsia) y de imagen (TAC y RNM) habituales. El diagnóstico histopatológico definitivo sobre la pieza de resección quirúrgica lo realizó un patólogo experimentado de los respectivos hospitales. El tratamiento se planteó según los protocolos establecidos y consensuados. Para la clasificación del estadio tumoral se utilizó el sistema TNM de la UICC.

En base a estos criterios se seleccionaron **39 pacientes**, 5 correspondientes al HUCA (12%) y 34 al HVN (88%).

Los 39 pacientes seleccionados entraron en un estudio longitudinal retrospectivo, con una primera fase de selección y recogida de muestra y otra posterior donde se procedió a su estudio serológico.

La toma de las muestras de sangre se realizó inmediatamente antes de la extirpación quirúrgica, durante la inducción anestésica, previo consentimiento informado. Se obtuvo una muestra de 10 cc de sangre total en un tubo, que se centrifugó para separar el suero, se alícuotó y congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Como muestras **control** se incluyeron 10 muestras de sangre procedentes de donantes del Banco de Sangre del Principado de Asturias, todos ellos mayores de 50 años. Previo

consentimiento informado se obtuvo una muestra de 10 cc de sangre total en un tubo, que se centrifugó para separar el suero, se alicuotó y congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su proceso.

## IV.2. ESTUDIO SEROLÓGICO

Se realizó en las muestras del suero de los pacientes una vez descongeladas. Los procedimientos de análisis y los marcadores tumorales seleccionados para el estudio se exponen a continuación.

### IV.2.1. Análisis quimioluminiscente.

Este tipo de método analítico consiste en la cuantificación de una sustancia, utilizando una reacción antígeno anticuerpo, y un marcador como indicador de la reacción que puede ser el éster de acrinina u otro. La combinación de los reactivos: peróxido-ácido e hidróxido de sodio, en contacto con la muestra y el analizador proporcionan la reacción quimioluminiscente. El peróxido-ácido provee el agente oxidante para el éster de acridina, y el hidróxido de sodio, proporciona el cambio de pH necesario para que la reacción de oxidación ocurra.

-AgSCC.

#### Descripción del marcador.

El AgSCC es una subfracción purificada del antígeno tumoral TA-4 que fue obtenido de tejidos con carcinoma de células escamosas del cérvix uterino<sup>99</sup> (Figura 6).

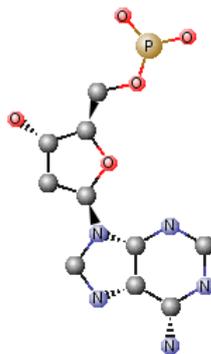


Figura 6. Fórmula molecular del AgSCC.

El TA-4 es una glucoproteína de 48.000 daltons que se compone al menos de 14 subfracciones con valores de pI (punto isoelectrico) que oscilan entre 5,44 y 6,62<sup>100</sup>. El AgSCC tendría en ese rango el valor máximo de 6,62.

## Principios del ensayo.

Para determinar la presencia de antígeno AgSCC en suero realizamos un inmunoanálisis en dos pasos, el cual, se muestra esquematizado en la figura 7.

En el primer paso se combinan la muestra y las micropartículas paramagnéticas recubiertas de anticuerpo antiAgSCC. El AgSCC presente en la muestra se une a las micropartículas recubiertas de anticuerpo. En el segundo paso, después del lavado, se añade el conjugado de anticuerpo antiAgSCC mezclado con acridinio, separándose este complejo de la fase sólida mediante la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posteriormente se añade NaOH que produce la liberación de la luz, siendo ésta la que determina la cantidad de SCC, en relación a las unidades relativas de luz (URL).

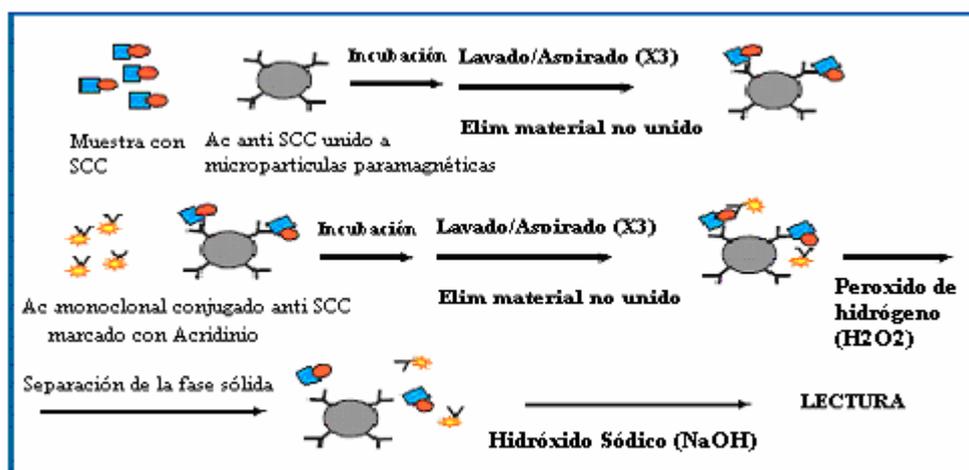


Figura 7. Pasos del análisis quimioluminiscente del AgSCC.

## Material y reactivos.

La determinación del AgSCC se realizó mediante el equipo autoanizador Architect i2000SR® (Abbott diagnostics division, Wiesbaden, Germany), que de forma automática realiza un inmunoanálisis quimioluminiscente de micropartículas (CMIA®).

El material integrante está formado por:

*Micropartículas:* un frasco de 6,6 mL de micropartículas recubiertas de anticuerpo monoclonal de ratón frente al AgSCC en tampón MES con estabilizante proteínico (bovino). La concentración mínima es de 0,08% de partículas sólidas. Utiliza como conservantes azida sódica y agentes antimicrobianos.

*Conjugado:* un frasco de 5,9 mL con anticuerpo monoclonal de ratón frente al antígeno SCC marcado con acridinio en tampón MES y estabilizante proteínico bovino. La concentración mínima es de 0,07 µg/mL. Como conservantes emplea azida sódica y agentes antimicrobianos.

*Solución preactivadora:* contiene 1,32% (p/v) de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

*Solución activadora:* NaOH 0,35 N.

*Tampón de lavado:* solución salina en tampón fosfato.

### **Protocolo del ensayo.**

Antes de cargar los reactivos Architect AgSCC por primera vez, agitamos el frasco de micropartículas para resuspender las que se hubiesen asentado. Para ello invertimos el frasco 30 veces comprobando visualmente su resuspensión. A continuación se colocaron los reactivos dentro del equipo.

*Calibración:* se analizaron los calibradores A, B, C, D, E y F por duplicado. Posteriormente se analizó una muestra única de cada uno de los controles SCC (bajo, medio y alto) para evaluar la calibración del ensayo. El intervalo de calibración fue de 0-70 ng/mL. Una vez aceptada la calibración, se almacenó en la memoria del equipo.

*Control de calidad:* para evaluar el estado de la calibración y evitar errores en la medida, se procesaron tres muestras de control (AgSCC controls Abbott®, Wiesbaden, Germany) con las concentraciones control dadas por el fabricante:

Control 1 (bajo): 2 ng/mL (1,6-2,4)

Control 2 (medio): 10 ng/mL (8-12)

Control 3 (alto): 50 ng/mL (40-60)

Los resultados obtenidos al procesar los controles fueron 2, 11 y 54 ng/mL respectivamente, estando dentro de los rangos establecidos, por lo que se aceptó la calibración.

*Proceso de las muestras:* se inició de forma automática. El autoanalizador tiene configurado en su software todo el procedimiento de la técnica, los volúmenes de pipeteo y los tiempos de cada paso del ensayo. Así, comienza pipeteando 150 µL de muestra de suero que se dispensa en una cubeta de reacción. A continuación, añade las micropartículas y mezcla e incuba la reacción. Posteriormente, mediante un imán, se atraen las partículas paramagnéticas unidas al analito en un lateral de la cubeta, mientras se aspira el contenido restante. Luego se añade la cantidad suficiente de conjugado, mezclando e incubando 10 minutos, para posteriormente lavar con la solución de lavado. El siguiente paso es la adición de la solución preactivadora, haciendo una lectura de blanco de señal. Se añade la solución activadora midiendo la emisión quimioluminiscente, que sustraída del blanco nos determina la luz que se traduce en la concentración de AgSCC.

*Evaluación de los resultados:* la concentración de AgSCC presente en las muestras se obtiene mediante interpolación de las unidades relativas de luz (URL) de las muestras en la curva patrón (curva de calibrado).

#### IV.2.2. Análisis inmunoradiométrico.

Este tipo de análisis emplea un anticuerpo en exceso para la detección del analito y un segundo anticuerpo marcado radiactivamente para permitir la cuantificación. Lo empleamos para valorar el marcador CYFRA 21.1.

-CYFRA 21-1.

##### **Descripción del marcador.**

Es un fragmento de citoqueratina 19 (Figura 8), proteína ácida que forma parte del filamento intermedio del tejido epitelial, con un peso molecular de 40.000 daltons<sup>101</sup>. Se encuentra presente en pacientes con distintos tipos de cáncer pues en la muerte celular se libera en suero en forma de fragmentos solubles<sup>102</sup>.

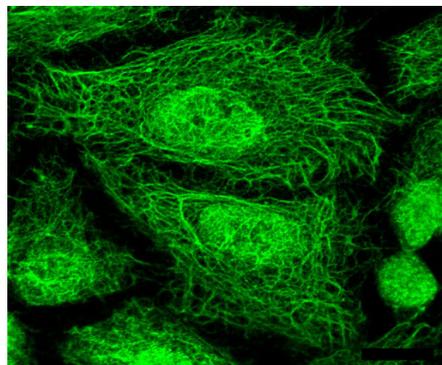


Figura 8. Imagen obtenida mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos anti-citoqueratina 19 en Células HEp-2.

El reconocimiento específico de este fragmento se realiza a través de dos anticuerpos monoclonales (BM 19-21 y KS 19-1, Fujirebio Diagnostics Inc, Japan), obtenidos tras la inmunización de ratones con células MCF7<sup>103,104</sup>.

##### **Principio del ensayo.**

La determinación se realizó mediante un estudio inmuno-radiométrico basado en una técnica “sandwich” en fase sólida. Utilizamos dos anticuerpos monoclonales contra dos puntos antigénicos apartados entre sí, dispuestos sobre la molécula de CYFRA 21-1. El primero se fija en la fase sólida ELSA y el segundo, marcado radiactivamente con I<sup>125\*</sup>, se utiliza como trazador. Las moléculas de CYFRA 21-1 presentes en la muestra se disponen entre los dos anticuerpos. El exceso de trazador se elimina mediante lavado, quedando sobre el ELSA el complejo anticuerpo fijado/antígeno/anticuerpo marcado. Así, la radiactividad es proporcional a la cantidad de CYFRA 21-1 en la muestra (Figura 9).

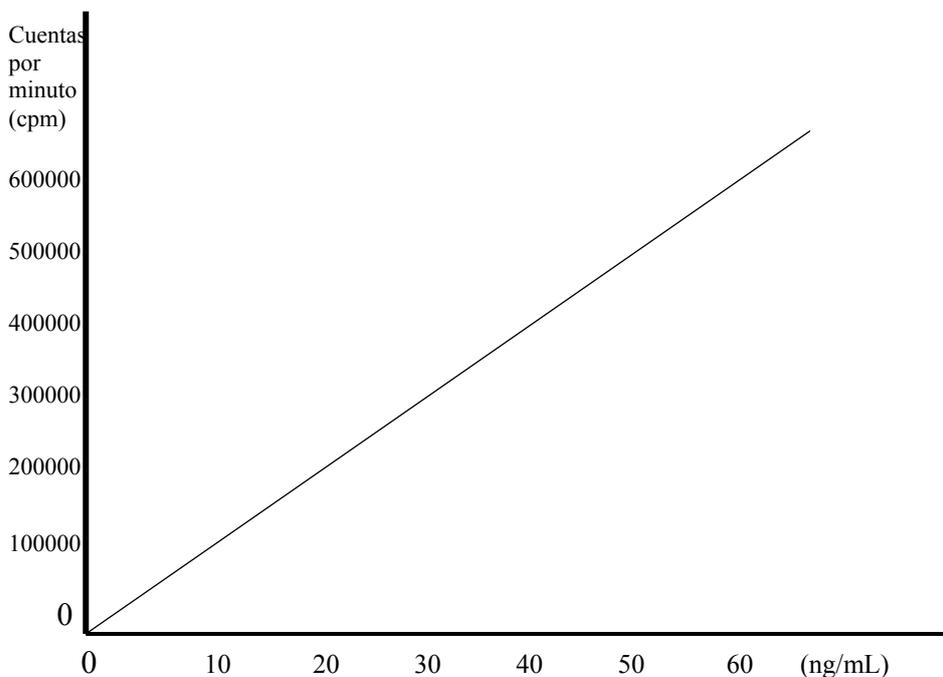


Figura 9. Modelo de gráfica obtenida para la interpolación de los resultados de CYFRA 21.1.

### Material y reactivos.

Para la determinación se empleó la técnica ELSA-CYFRA21.1 (CIS bio internacional®, Gif-sur-Yvette, Cedex, France).

Los reactivos que se utilizaron para la determinación fueron:

- *Tubos ELSA* listos para su uso con anticuerpo monoclonal anti-CYFRA 21-1 fijado e inmovilizado en el fondo del tubo.
- *Anticuerpo monoclonal* anti-CYFRA 21-1 marcado con  $I^{125*}$ , con tampón, albúmina bovina, azida sódica y colorante rojo (volumen 15 mL).
- *Estándar 0* liofilizado con suero bovino (4 mL).
- *Estándares liofilizados* con suero bovino y CYFRA 21-1 humano en 4 viales a concentraciones de 2, 10, 30, y 60 ng/mL, para reconstituir cada uno con 1 ml de agua destilada.
- *Control liofilizado* con suero bovino y CYFRA 21-1 humano en una concentración de 4 ng/mL, para reconstituir con 1 mL de agua destilada.
- *Solución concentrada de Tween 20* que se consigue diluyendo 9 mL de tween 20 en 3 litros de agua destilada agitando suavemente.

Para la determinación de CYFRA 21-1 se tuvieron en cuenta las precauciones de radioprotección, siguiendo la normativa en vigor.

Otro material empleado consistió en micropipetas de precisión con puntas desechables, que permiten pipetear 100 $\mu$ L, 300 $\mu$ L, 1 mL, y 4 mL (+/- 1%), agua destilada, tubos de plástico

desechables, agitador tipo vortex y contador de centelleo gamma calibrado para la detección del I<sup>125</sup>\*

### **Protocolo del ensayo.**

Los estándares, el control y los tubos ELSA fueron puestos a temperatura ambiente (18-25°C) al menos 30 minutos antes de ser utilizados. El trazador se conservó a 2-8 °C hasta el momento de su uso. Para el ensayo son necesarios los siguientes grupos de tubos:

- Grupo estándar “0” para la determinación de la unión no específica.
- Grupo estándar para determinar la curva estándar.
- Grupo de control para realizar el control.
- Grupo de tubos de muestra problema.

Los estándares se realizaron por triplicado y las muestras problema por duplicado.

En primer lugar se pipetea 100 µL de estándares, controles y muestras en los tubos ELSA correspondientes. Se añaden 300 µL de anti-CYFRA 21.1 en todos los tubos. Mezclamos ligeramente cada tubo con un agitador tipo Vortex y se incuban de 18-22 horas a 2-8°C. A continuación, se lavan los tubos ELSA aspirando completamente el contenido de cada tubo, añadiendo 3 mL de solución de lavado volviendo a aspirar. Esta operación se repite dos veces más hasta un total de tres. Finalmente se mide la radiactividad unida al ELSA con un contador de centelleo gamma.

Para cada grupo de tubos se hizo la media de los contajes en cuentas por minuto (cpm) y la curva estándar a partir de los resultados del grupo estándar (cpm versus concentración CYFRA 21-1 en ng/mL) (Figura 9).

### **Evaluación de los resultados.**

Los resultados se obtuvieron interpolando los resultados de las cpm de las muestras a través de la recta patrón. Las muestras con valores superiores a la mayor concentración del estándar (60 ng/mL) fueron diluidas y repetidas.

### IV.2.3. Análisis por ELISA.

Este tipo de análisis se basa en la detección del analito mediante un anticuerpo específico inmovilizado, posteriormente se realiza la adición de un anticuerpo conjugado unido a una enzima (peroxidasa de rábano), la cuantificación se produce al añadir el sustrato del enzima produciéndose una reacción de color que se mide en un espectrofotómetro. Empleamos la técnica ELISA para valorar los marcadores E-cadherina, MMP-2, MMP-9, MMP-13 activa y Anticuerpos anti-p-53.

*-E-cadherina.*

#### **Descripción del marcador.**

Se conoce también como uvomorulina o cell-CAM120/80<sup>105</sup>. Forma parte de la familia de las cadherinas que son moléculas de adhesión celular calcio dependientes localizadas en las células epiteliales de tejidos embrionarios y adultos (Figura 10)<sup>106,107</sup>.

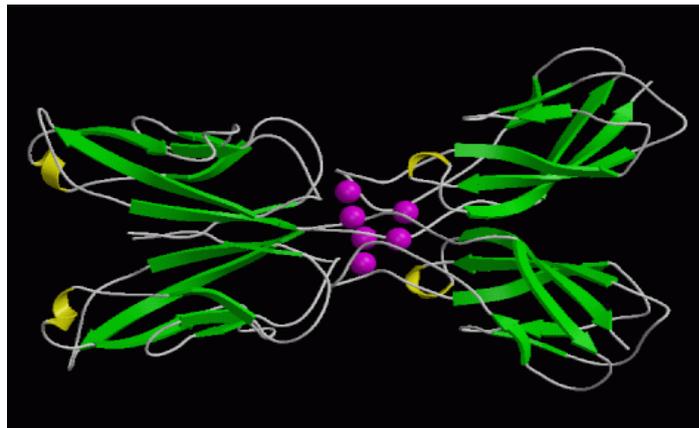


Figura 10. Estructura tridimensional de la E-cadherina.

La forma soluble de la E-cadherina tiene 80-84.000 daltons y fue descubierta en el sobrenadante del medio de cultivo de la línea de células tumorales humanas MCF-7<sup>89</sup>. Es el producto de la degradación de la forma intacta de la E-cadherina (120kD), generada por proteólisis calcio dependiente. También se ha descrito en fluidos biológicos de sujetos sanos, si bien los niveles séricos estaban más elevados en pacientes con cáncer<sup>90,91,92</sup>.

#### **Principio del ensayo.**

Se basa en un ELISA tipo “sandwich” (Figura 11) con dos anticuerpos de ratón anti E-cadherina humana que detectan la forma soluble permitiendo su determinación cuantitativa.

La cuantificación se realiza mediante una curva estándar usando concentraciones conocidas de E-cadherina, comparando la absorbancia de las muestras problema con la de los estándares.

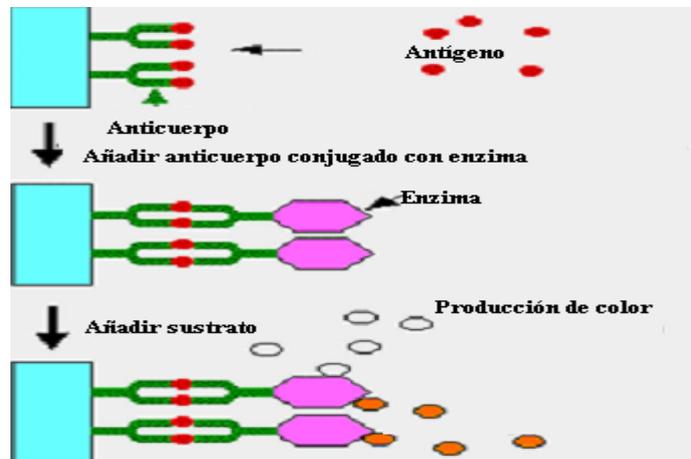


Figura 11. Esquema general de reacción de un ensayo ELISA.

### Material y reactivos.

Se utiliza un “kit” de enzimoanálisis ELISA (Zymed ® Laboratories, Inc, San Francisco, USA).

Los reactivos empleados consistieron en:

-*Placa de ELISA* de 96 pocillos con anticuerpo de ratón anti-E-cadherina humana unido a la placa.

-*Solución de anticuerpo monoclonal* conjugado con peroxidasa de rábano.

-*Estándares*: 2.700 ng de E-cadherina humana.

-*Solución para la dilución* de muestras.

-*Solución de sustrato*: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y tetrametilbenzidina.

-*Solución de parada*: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N.

-*Solución de lavado*: TBS: 0,1% de tween 20 y 5mM CaCl<sub>2</sub>.

Se deben preparar las siguientes soluciones:

-*Solución 1*: formada por la solución de anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano disuelta en 11 mL de agua destilada mezclada generosamente.

-*Solución 2*: rehidratar la solución estándar con 1 mL de agua destilada y dejar reposar 15 minutos. Esta solución posee una concentración de 2.700 ng/mL de E-cadherina. Se realizan diluciones seriadas con diluyente de muestras para conseguir 6 soluciones con las concentraciones 2700, 1350, 675, 338, 169 y 84 ng/mL para realizar la curva estándar.

### Protocolo del ensayo.

Las muestras se realizaron por duplicado con un factor de dilución 1/10.

Se pipetea 100  $\mu\text{L}$  de muestra y de estándar en los pocillos y se incuban por espacio de 2 horas a 37°C. A continuación se aspiran y lavan los pocillos 3 veces con 400  $\mu\text{L}$  de solución de lavado dejando la placa completamente seca. Se pipetea 100  $\mu\text{L}$  de la solución 1 en cada pocillo y se incuban 1 hora a 37 ° C. Se aspira y se lavan los pocillos 4 veces con 400  $\mu\text{L}$  de solución de lavado volviendo a dejar la placa completamente seca. Posteriormente, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de solución de parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N) a cada pocillo, en el mismo orden que el sustrato. Se incuban a temperatura ambiente (20-30° C) durante 15 minutos. Por último, se determina la absorbancia a 450 nm, realizando la lectura en la primera hora después de añadir la solución de parada.

### Evaluación de los resultados.

Se evaluó la representación de la media de la absorbancia de los estándares (eje Y) frente a la concentración (eje X) utilizando únicamente para la E-cadherina la escala log-log. La concentración de las muestras se obtuvo mediante la interpolación de los resultados en la recta patrón (Figura 12). En este momento no existen datos publicados con los valores de referencia de la fracción soluble de E-cadherina en población sana.

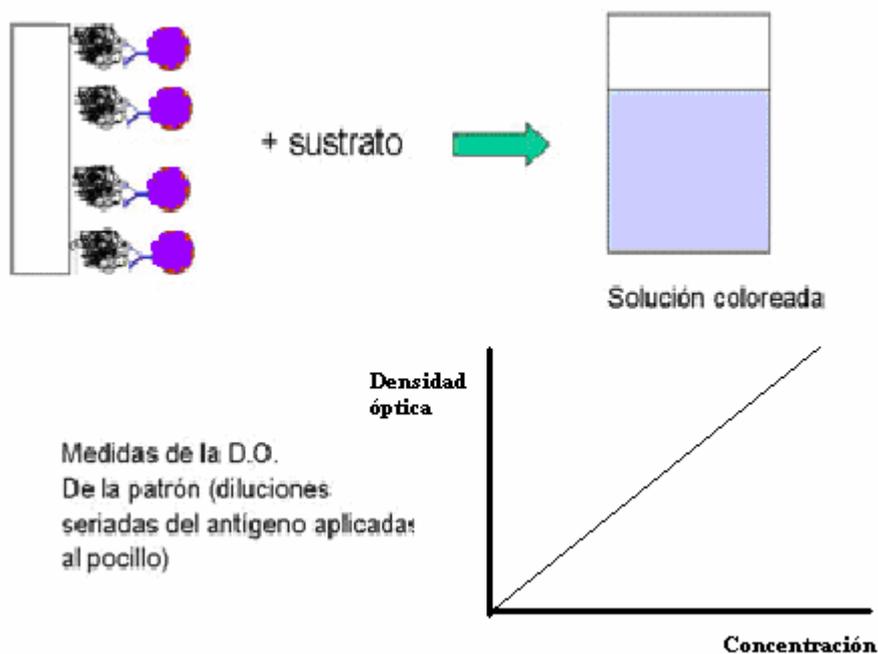


Figura 12. Esquema de la reacción entre el enzima fijado y el sustrato, formando un producto coloreado que se mide por espectrofotometría.

-Metaloproteasa 2 (MMP-2 gelatinasa A).

### Descripción del marcador.

La MMP-2 forma parte de la familia de las metaloproteasas de matriz, la cual está formada por endopeptidasas que hidrolizan las proteínas de la matriz extracelular. Según sobre que tipo de proteína actúen se dividen en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas y metaloproteasas de membrana. La actividad de las MMP está controlada por varios mecanismos entre los que destacan la regulación transcripcional, la activación de zimógenos, los inhibidores generales de las proteasas y los inhibidores tisulares específicos (TIMPs). La unión de las TIMPs con su MMP específica produce una inhibición completa de su actividad.

La MMP-2 se encuentra en los fibroblastos mesenquimales durante el desarrollo y la regeneración tisular. La MMP-2 junto con la MMP-9 degrada el colágeno IV que forma parte de la membrana basal y el colágeno desnaturalizado o gelatina<sup>108</sup>. Por tanto, este enzima interviene en la diseminación tumoral al romper la barrera de la membrana basal y facilitar la invasión hacia otros tejidos. La MMP-2 es secretada como una proenzima inactiva con estructura de propéptido (Figura 13) que, actuando como inhibidor al tener bloqueado su centro catalítico, debe ser escindido para activarse<sup>109,110</sup>.

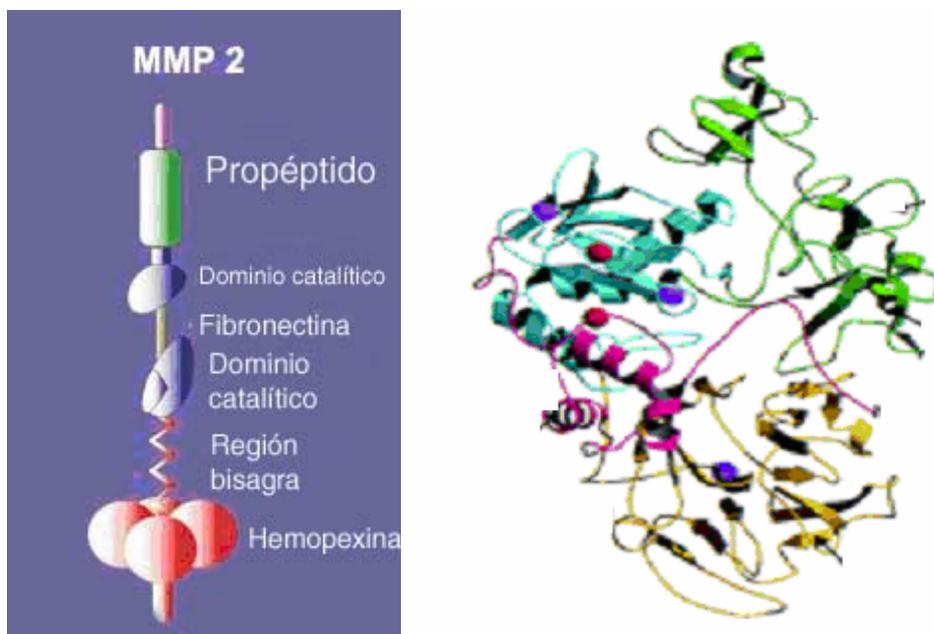


Figura 13. Dominios y estructura tridimensional de la MMP-2.

### **Principio del ensayo.**

Se trata de un inmunoensayo tipo “sandwich” empleando dos anticuerpos monoclonales de ratón. Uno de los anticuerpos, específico para la proteína MMP-2 humana, ha sido inmovilizado en la superficie de los pocillos de reacción. La muestra a determinar es pipeteada junto con el anticuerpo monoclonal detector biotinilado, incubándose en la placa durante 2 horas. En ese tiempo la MMP-2 presente se une a los anticuerpos de detección y de captura. El material no unido es eliminado, y posteriormente se añade el anticuerpo conjugado con estreptavidina-peroxidasa de rábano, el cual se une al anticuerpo detector. La peroxidasa de rábano cataliza la conversión del sustrato cromogénico tetrametilbenzidina, de una solución incolora a una solución azul o amarilla después de añadir el reactivo de parada. La intensidad de coloración será proporcional a la cantidad de MMP-2 en la muestra. La cuantificación se obtiene mediante una curva estándar usando concentraciones conocidas de MMP-2. Así, mediante la comparación de la absorbancia de la muestra problema con los estándares, se determina su concentración.

### **Material y reactivos.**

Para la determinación en suero de MMP-2 utilizamos un “kit” de enzimoimmunoanálisis ELISA (CALBIOCHEM®, Darmstadt, Germany).

Los reactivos empleados consisten en:

-*Placa de ELISA* con anticuerpo anti-MMP-2 fijado.

-*Solución estándar* de MMP-2: solución con proteína liofilizada de MMP-2 recombinante humana.

-*Anticuerpo detector*: anticuerpo monoclonal biotinilado anti MMP-2 humana.

-*Anticuerpo conjugado* concentrado: solución concentrada 400 veces de conjugado unido a estreptavidina-peroxidasa.

-*Diluyente de conjugado*: solución tampón para la dilución del conjugado 400X.

-*Solución de sustrato* (TMB): tetrametilbenzidamina.

-*Diluyente de muestras* (2): solución tampón para la dilución de las muestras.

-*Solución de lavado*: solución de PBS y surfactante. Contiene 2% de cloroacetamida.

-*Solución de parada*: H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2,5N.

### **Protocolo del ensayo.**

Se prepara la solución de lavado añadiendo 25 mL de dicha solución concentrada a 475 mL de agua desionizada, mezclando bien. Se reconstituyen los estándares añadiendo 1 mL de agua desionizada al estándar liofilizado para alcanzar una concentración de 50 ng/mL. Se deja atemperar la solución estándar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Diluir el estándar con diluyente de muestra, rotulando 7 tubos con las concentraciones 50; 25; 12,5;

6,25; 3,13; 1,56 y 0 ng/mL. Añadir 250 µL del diluyente de muestra a cada tubo excepto en el de 50 ng/mL que permanece sin diluir. Posteriormente pipetear 500 µL de la solución estándar reconstituida al primer tubo. Pipetear 250 µL del primer tubo y añadirlos al segundo mezclando bien. Repetir este proceso hasta el sexto tubo (1,56 ng/mL). El último tubo de 0 ng/mL debe llevar solamente diluyente de muestra. Se prepara la muestra diluyendo el suero en proporción 1:20. Se pipetea 50 µL de anticuerpo detector en cada pocillo. Se añaden las muestras y los estándares por duplicado, pipeteando 50 µL en cada pocillo utilizando una pipeta limpia para cada muestra. Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavan los pocillos tres veces con la solución de lavado. Se pipetea 100 µL del anticuerpo conjugado en cada pocillo, cubriendo a continuación la placa de ELISA, e incubando a temperatura ambiente 30 minutos. Los pocillos se lavan tres veces con la solución de lavado. Se llena la placa de agua destilada, se invierte sobre un fregadero y se golpea sobre un papel de filtro para que no quede nada de agua. Se añaden 100 µL de solución de sustrato a cada pocillo y se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se añaden 100 µL de solución de parada en el mismo orden que se añadió la solución de sustrato. Por último, se determina la absorbancia en cada pocillo utilizando un lector espectral a longitud de onda dual (450/595 nm). La lectura se debe realizar en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

#### **Evaluación de los resultados.**

Se evaluó la representación de la media de la absorbancia de los estándares (eje Y) frente a la concentración (eje X). La concentración de las muestras se obtuvo mediante la interpolación de los resultados en la recta patrón. En este momento no existen datos publicados con los valores de referencia de MMP-2 en población sana.

*-Metaloproteasa 9 (MMP-9, gelatinasa B).*

#### **Descripción del marcador.**

Es una endopeptidasa neutra responsable de la degradación de la matriz extracelular y, por tanto, implicada en la invasión tumoral y en las metástasis. La MMP-9 tiene actividad colagenasa con especificidad por el colágeno IV, componente fundamental de la membrana basal<sup>111</sup>. Es secretada por macrófagos estimulados, neutrófilos y células transformadas. Todas las metaloproteasas de matriz, excepto las del tipo de membrana, son secretadas como zimógenos inactivos o proenzimas hacia la matriz extracelular donde se activan<sup>112</sup> (Figura 14).

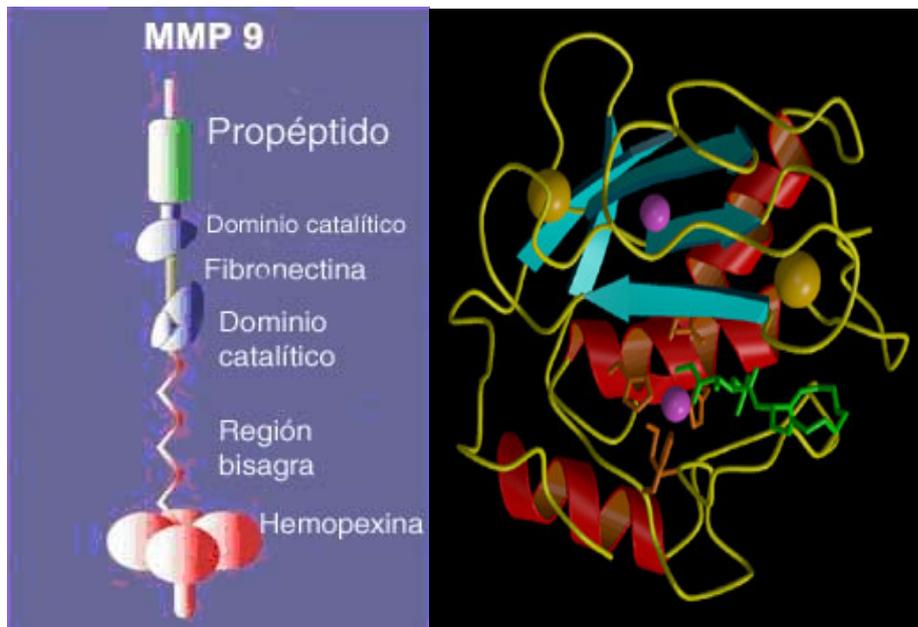


Figura 14. Dominios y estructura tridimensional de la MMP-9.

En su estructura tiene cuatro dominios estructurales: un propéptido amino-terminal, un centro catalítico (2 átomos de Zinc y un átomo de calcio), un dominio similar a la fibronectina 2 y otro dominio similar a hemopexina en el extremo carboxi-terminal<sup>113</sup>.

El centro catalítico incorpora 3 repeticiones homólogas de la secuencia de la fibronectina 2. Esta región se denomina dominio de unión a gelatina al estar implicada en la unión al colágeno desnaturalizado. El dominio similar a hemopexina tiene una secuencia similar a esa proteína plasmática y está muy conservado en todas las MMPs, con un papel importante en la unión al sustrato y en la interacción con TIMPs. Hay alta especificidad entre TIMPs y las formas latentes de MMPs. La TIMP-1 se une exclusivamente al zimógeno de la MMP-9<sup>114</sup>.

### **Principio del ensayo.**

Utilizamos un inmunoensayo tipo “sandwich” con un anticuerpo monoclonal de ratón y otro policlonal de oveja. El anticuerpo policlonal es específico para la MMP-9 humana. El principio del ensayo es igual al de la MMP-2 y al general de todas las técnicas de ELISA (ver página 47).

### **Material y reactivos.**

Para la determinación en suero de MMP-9 utilizamos un “kit” de enzoinmunoanálisis ELISA (CALBIOCHEM®, Darmstadt, Germany).

Los reactivos empleados consisten en:

- Placa de ELISA con anticuerpo anti-MMP-9 fijado.
- Solución estándar de MMP-9: solución de proteína recombinante MMP-9 humana.
- Anticuerpo detector: solución con anticuerpo monoclonal biotilado antiMMP-9 humana.

-*Anticuerpo conjugado concentrado*: solución concentrada 400 veces de conjugado unido a estreptavidina-peroxidasa.

-*Diluyente de conjugado*: solución tampón para la dilución del conjugado 400X.

-*Solución de sustrato*: tetrametilbenzidamina.

-*Diluyente de muestras*: solución tampón para la dilución de las muestras.

-*Solución de lavado*: solución de PBS y surfactante. Contiene 2% de cloroacetamida.

-*Solución de parada*: H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2,5N.

### **Protocolo del ensayo.**

Todos los pasos son similares a los descritos en MMP-2 con algunos matices que indicamos a continuación. La reconstitución de los estándares debe conseguir una concentración de 20 ng/mL. Las concentraciones de los 7 tubos son 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 y 0 ng/mL. El diluyente de muestra tampoco se añade en el tubo de mayor concentración, en este caso el de 20 ng/mL. En la preparación de la muestra los sueros se diluyen a 1:80. El resto del protocolo es exactamente igual al descrito en MMP-2 en la página 47.

### **Evaluación de los resultados.**

Se realiza de forma similar al descrito para la MMP-2. En este caso tampoco existen datos publicados con los valores de referencia de la MMP-9 en población sana.

-*Metaloproteasa 13 activa (MMP-13 activa, colagenasa 3)*.

### **Descripción del marcador.**

La MMP-13 también forma parte de la familia de las metaloproteasas de matriz, realizando la hidrólisis de las proteínas de la matriz extracelular. La MMP-13 o colagenasa 3 es una proteína de 452 aminoácidos (Figura 15), que es secretada por las células en forma de zimógeno inactivo, el cual se activa extracelularmente por la separación de su propéptido<sup>115</sup>. La escisión del propéptido de 84 aminoácidos puede ser catalizada por otras metaloproteasas como la MMP-2 y la MMP-14, o por otros factores como la plasmina.

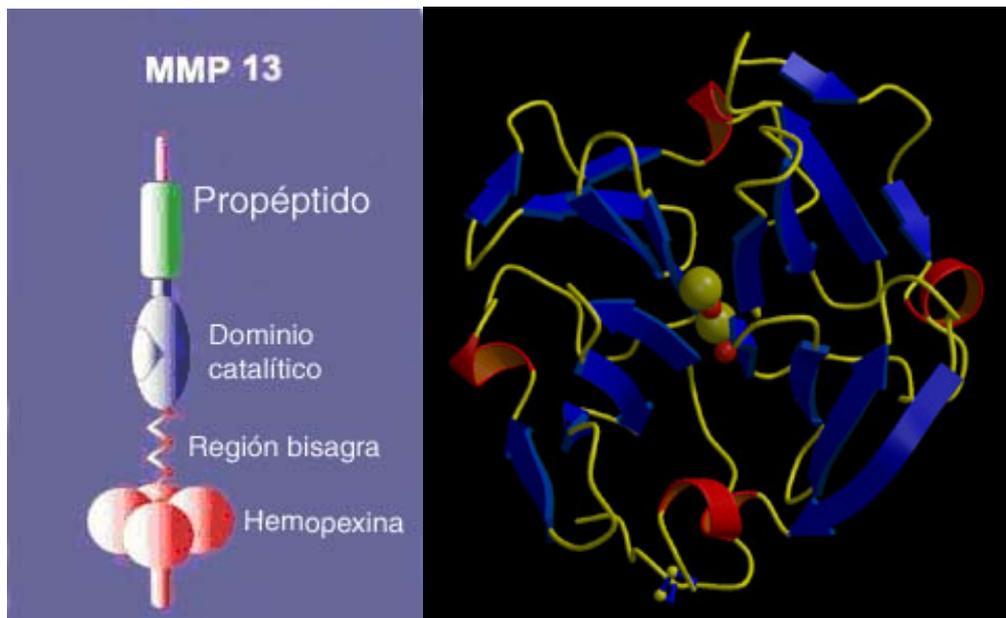


Figura 15. Dominios y estructura tridimensional de la MMP-13.

En condiciones normales la MMP-13 ya se expresa durante la embriogénesis y está presente en concentraciones muy bajas en el tejido adulto. Sin embargo, se ha relacionado con el desarrollo de metástasis en carcinomas de mama, pulmón, próstata, condrosarcomas, oteosarcomas y CECC<sup>97,116,117</sup>. También juega un papel importante en enfermedades óseas degenerativas como la osteoartritis y la artritis reumatoide.<sup>118</sup>

#### **Principio del ensayo.**

Es similar al descrito en MMP-2, difiriendo únicamente en que el anticuerpo fijado al pocillo reconoce la forma activada de la MMP-13 (ver página 47).

#### **Material y reactivos.**

Para la determinación en suero de la MMP-13 activa utilizamos un “kit” de enzoinmunoanálisis ELISA (CALBIOCHEM®, Darmstadt, Germany).

Los materiales utilizados fueron:

- Placa de ELISA con anticuerpo anti-MMP13 activa fijado
- *Solución estándar de MMP-13 activada*: solución de proteína recombinante MMP-13 activada humana.
- *Solución de dilución de estándares y suero*: solución a base de suero humano en tampón.
- *Solución de detección I*: solución con anticuerpo monoclonal biotinilado anti-procolagenasa-3.
- *Solución de detección II*: solución de fosfato con excipientes, se añade a la solución de conjugado antes de su uso.
- *Solución de conjugado*: solución de anticuerpo conjugado altamente polimérico con estreptavidina-peroxidasa, se añade a la solución II ante de su uso.
- *Solución de sustrato*: tetrametilbenzidamina.

*-Solución de lavado:* solución de tampón fosfato con aditivos.

*-Solución de parada:* H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 0,25M.

### **Protocolo del ensayo.**

Los estándares tuvieron que ser preparados previamente de la siguiente manera. Se rotulan 7 tubos con las concentraciones 32, 63, 125, 250, 500, 1000, y 2000 pg/mL. Se pipetea 900µL de diluyente de estándares y suero en el tubo de 2000pg/mL, y 500µL en el resto de los tubos. A continuación, se pipetea 100µL de la solución estándar (20ng/mL) en el tubo de 2000pg/mL, mezclando bien. Se vuelve a pipetear 500µL del tubo con el estándar de 2000pg/mL, al tubo rotulado con 1000pg/mL y se mezcla bien. Se repite este procedimiento de dilución en el resto de tubos.

Una vez preparados los estándares, se procede a diluir las muestras a 1:10 con la solución de dilución de muestras. Se pipetea 100µL de los estándares reconstituidos por duplicado y 100µL de cada muestra, también por duplicado. Incubamos a temperatura ambiente 2 horas. Se aspiramos y se lavan los pocillos 4 veces con la solución de lavado, comprobando que se llenan y vacían completamente en cada ciclo. Se vierte el contenido residual de la solución de lavado que pudiera quedar en la placa. A continuación añadimos 100µL de solución de detección I en cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente 90 minutos. Se vuelve a aspirar y lavar los pocillos 4 veces más con la solución de lavado, comprobando su relleno y vaciado completo en cada ciclo, vertiendo el contenido residual de solución de lavado que pudiera quedar en la placa.

Se añaden 100µL de solución de detección II en cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente 30 minutos. Se vuelve a aspirar y lavar los pocillos un total de 5 veces con la solución de lavado, comprobando su relleno y vaciado completo en cada ciclo, vertiendo el contenido residual de solución de lavado que pudiera quedar en la placa. Se añaden 100µL de solución de sustrato en cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente y en la oscuridad 15 minutos. A continuación se añaden 100µL de solución de parada a cada pocillo. Por último, determinamos la absorbancia a 450 nm, con filtro de referencia a 540, 570 ó 620 nm en 30 minutos.

### **Evaluación de los resultados.**

Se evaluó la representación de la media de la absorbancia de los estándares (eje Y) frente a la concentración (eje X). La concentración de las muestras se obtuvo mediante la interpolación de los resultados en la recta patrón. Hasta la fecha en la bibliografía revisada no aparecen referencias que describan los valores normales de MMP-13 activada.

-Auto anticuerpos anti-p53 (*Ac anti-p53*).

### **Descripción del marcador.**

El gen *p53* es uno de los principales genes supresores de tumores. Su alteración se demostró en el 60% de los cánceres humanos<sup>119</sup> (Figura 16). La forma más común de alteración son mutaciones sin sentido<sup>120,121</sup>, que determinan la acumulación anormal de proteína p53 en el interior de la célula tumoral.

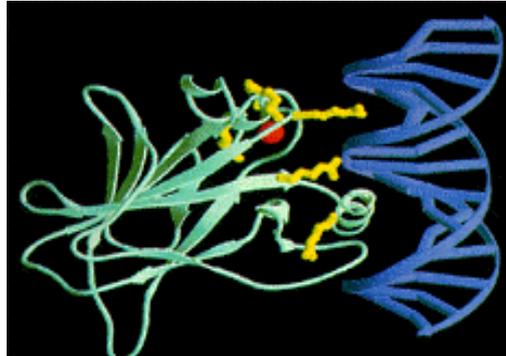


Figura 16. Estructura del core de la proteína p53, en verde; estructura del ADN en azul oscuro y en amarillo los aminoácidos más frecuentemente mutados.

Se ha observado que los pacientes con proteína p53 anormal pueden desarrollar una respuesta inmunológica contra ella<sup>122</sup>. Así, los *Ac anti-p53* séricos en pacientes con cáncer se correlacionan con la positividad inmunohistoquímica de la proteína<sup>82</sup>.

### **Principio del ensayo.**

Se realizó mediante un ensayo de inmunoenzimología. Se utilizó una placa de ELISA con proteína p53 salvaje humana altamente purificada unida a los pocillos de reacción. El anticuerpo conjugado unido a peroxidasa cataliza la oxidación de la tetrametilbenzidina produciendo una reacción colorimétrica.

### **Reactivos y materiales.**

La determinación de *Ac anti-p53* se realizó mediante un ensayo ELISA (IBL Inmuno-Biological Laboratorios, Hamburg, Germany).

Los reactivos empleados consisten en:

- Placa de ELISA*: pocillos con proteína p53 recombinante humana altamente purificada.
- Solución de calibrador*: 1 mL de suero humano con un título definido de *Ac anti-p53*.
- Solución control negativo*: 0,6 mL de suero humano sin *Ac anti-p53*.
- Solución de dilución de muestras*: son 6 viales. Hay que diluir el contenido de cada vial en 12 mL de agua destilada.
- Solución de anticuerpo detector*: solución de anticuerpo conjugado anti-p53.
- Solución de sustrato*: 12 mL de tetrametilbenzidamina.

*-Solución de parada:* 7,5 mL de HCl 2M.

*-Solución de lavado:* diluir previamente al ensayo con 285 mL de agua destilada.

### **Protocolo del ensayo.**

Se añaden 200 µL de solución de lavado diluida a cada pocillo y se espera durante tres minutos, se invierte y se sacude vigorosamente para que no quede líquido residual. Se añaden 100 µL de solución de calibración y control negativo sin diluir (por duplicado). Posteriormente se añade también los sueros problema (por duplicado) diluidos previamente 1:100 con diluyente de muestras, incubando una hora a temperatura ambiente. Se lava el contenido de los pocillos 5 veces con 200 µL de solución de lavado. A continuación se añaden 100 µL de solución de anticuerpo detector en cada pocillo y se incuba una hora a temperatura ambiente. Se lava el contenido de los pocillos 5 veces con 200 µL de solución de lavado. Seguidamente, se añaden inmediatamente 100 µL de solución de sustrato y se incuba durante media hora. Consecutivamente, se añade 50 µL de solución de parada en cada pocillo en el mismo orden seguido en los pasos anteriores. Por último, se lee la absorbancia a 450 nm, con filtro de referencia de 620 ó 750 nm.

### **Evaluación de los resultados.**

Al tratarse de un test cualitativo no se realiza la curva de calibradores. El fabricante fija para el calibrador (absorbancia de 450 nm) un valor superior a 0,7. La absorbancia del control negativo ha de ser inferior a la del calibrador.

El cálculo del nivel de corte se realiza multiplicando la absorbancia del calibrador por un factor específico del lote suministrado por el fabricante, que en este caso fue de 0,15.

Las muestras con valores superiores al nivel de corte son consideradas positivas, siendo negativas las que tienen valores inferiores. Se consideran en zona gris las muestras con una absorbancia +/- 5% del nivel de corte.

### V.3. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

#### V.3.1. *Variables clínico-patológicas.*

Incluyen sexo, edad (años), hábitos tóxicos (alcohol, tabaco), **localización** (laringe, faringe), **grado** de diferenciación (bien, moderado y poco), **estadio** (I, II, III, IV), **adenopatías metastáticas** (N-: no, N+: sí), radioterapia postoperatoria, **supervivencia** (meses). De ellas se destacan las que se relacionan con las variables analíticas.

#### V.3.2. *Variables analíticas.*

Niveles séricos de **AgSCC** (ng/mL), tomando como punto de corte en la supervivencia 1,5 ng/mL, que es el recomendado por la casa comercial del “kit” empleado. Niveles séricos de **CYFRA 21-1** (ng/mL), utilizando como punto de corte 3 ng/mL. Niveles séricos de **E-cadherina** soluble ( $\mu\text{g/mL}$ ). No hay establecido punto de corte. Niveles de **MMP-2** (ng/mL). No hay establecido punto de corte. Niveles séricos de **MMP-9** (ng/mL). No hay establecido punto de corte. Niveles séricos de **MMP-13 activada** (pg/mL). No hay establecido punto de corte. Presencia en suero de **Ac anti-p53** (+: sí, -:no).

## IV.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

### IV.4.1. *Pruebas empleadas.*

Las variables cuantitativas se expresaron utilizando la media, comparándose mediante la *t* de Student o por la *U* de MannWhitney en caso de no seguir una distribución normal.

Las variables cualitativas se expresaron como porcentaje y se compararon mediante el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ), con corrección de continuidad de Yates en los casos de tablas de 2x2, o bien por la prueba exacta de Fisher en los casos de tablas poco pobladas. Se estableció como nivel de significación estadística un valor de  $p < 0,05$ .

La supervivencia se analizó mediante las curvas de Kaplan-Meier, utilizando la prueba log-rank. Los puntos de corte de las variables cuantitativas se determinan utilizando curvas ROC.

Para el análisis estadístico utilizamos el programa estadístico Medcalc® v8.1.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

El análisis multimarcaador se realizó mediante regresión logística binaria por el método de introducir, definido por la existencia de una variable dependiente con dos categorías y una o más variables independientes que pueden ser tanto categóricas como cuantitativas.

### IV.4.2. *Terminología aplicada al estudio de marcadores tumorales.*

**Verdaderos positivos:** número de pacientes que actualmente padece cáncer en una población con un resultado positivo para un marcador tumoral.

**Falsos positivos:** número de pacientes de una población con un resultado positivo para un marcador tumoral que no padecen cáncer.

**Verdaderos negativos:** número de pacientes de una población con un resultado negativo para un marcador tumoral que no tienen cáncer.

**Falsos negativos:** número de pacientes de una población con un resultado negativo para un marcador tumoral que tienen cáncer.

**Sensibilidad:** capacidad de un test para detectar pacientes que actualmente presentan la enfermedad.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}}$$

La sensibilidad es una medida de la verdadera positividad. Las muestras usadas para determinar la sensibilidad proceden todas de pacientes con cáncer.

**Especificidad:** capacidad de un test para distinguir aquellos pacientes que no tienen cáncer de aquellos que lo tienen. Todas las muestras utilizadas para determinar la especificidad suelen obtenerse de pacientes sanos y de pacientes con enfermedades no tumorales.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos positivos}}$$

Un valor de especificidad del 100% identificará sólo pacientes con el tipo concreto de tumor y no otros con lesiones benignas o enfermedades no tumorales. Por tanto, la especificidad es una medida de la falsa positividad.

La sensibilidad y la especificidad se encuentran inversamente relacionadas y tienen un valor umbral seleccionado para cada marcador tumoral<sup>123</sup>.

El **valor umbral**, también llamado valor “cut-off”, se obtiene del percentil 95 de los valores encontrados en la población que no tiene cáncer. Sin embargo, hay siempre una superposición entre las concentraciones séricas del marcador tumoral en la población normal o con enfermedades no tumorales o lesiones benignas y las de pacientes con cáncer. Por tanto, se puede seleccionar un valor más bajo o más alto (percentil 99 ó percentil 90) en relación con los valores obtenidos en los sujetos sin neoplasia, según el marcador tumoral específico que se ha usado<sup>124</sup>. Si establecemos un valor umbral bajo, seleccionamos mayor número de sujetos sin cáncer, aunque un número menor de pacientes con cáncer tendrán resultados negativos. Así resulta un descenso en la especificidad y un aumento en la sensibilidad.

Por el contrario, si el valor umbral se sitúa en cifras elevadas, para asegurar que los sujetos sin cáncer tengan valor negativo en el test, podemos obtener mayor número de pacientes con cáncer con valores normales. Esto conllevaría menor sensibilidad pero mayor especificidad del marcador.

**Valor predictivo positivo (VPP):** se define como la probabilidad de que un paciente con un test positivo tenga cáncer. Es también la proporción de pacientes con enfermedad que han sido correctamente identificados mediante el test. Sólo se utilizan para este cálculo aquellas muestras de pacientes con y sin cáncer que muestran resultados positivos.

Verdaderos positivos

$$\text{VPP} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos positivos}}$$

**Valor predictivo negativo (VPN):** se define como la probabilidad de que un paciente con un test negativo no tenga cáncer. Es también una medida de la proporción de personas libres de enfermedad que son correctamente diagnosticadas.

Verdaderos negativos

$$\text{VPN} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{Falsos negativos}}$$

Otros conceptos igualmente importantes son incidencia y prevalencia. Entendemos por **incidencia** el número de nuevos casos que ocurren durante un período específico de tiempo. La tasa de incidencia para una enfermedad es el número de casos nuevos por unidad de población. La **prevalencia** se define como el número de casos de la enfermedad que existen en la población en un momento determinado. La **tasa** es el número de casos que hay expresado por unidad de población. La prevalencia de una enfermedad estaría en función de su incidencia y duración (tiempo desde el diagnóstico a la curación o muerte)

125

Un concepto relativamente nuevo es el **análisis ROC** que son las siglas de “características operativas relativas”. Se basa en la teoría de la detección de señal como método de análisis de sistemas diagnósticos. Establece criterios de decisión con objeto de determinar los umbrales normales y comparar la eficiencia de distintos marcadores para la misma enfermedad. El análisis ROC permite establecer los límites óptimos de normalidad y verificar la eficiencia de un test, seleccionando el valor umbral de una misma prueba o comparando pruebas distintas.

La mayoría de las pruebas obtienen resultados continuos, como el nivel de glucosa en sangre para diagnosticar la diabetes. La eficiencia de la prueba depende de donde se establezca el punto de corte, siendo habitual cierto grado de solapamiento en los valores (Figura 17).

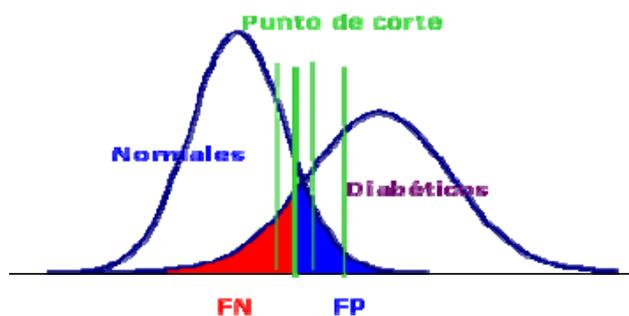


Figura 17. Punto de corte en la determinación de glucosa en sangre. Si lo desplazamos a la derecha (>glucosa), disminuyen los falsos positivos (región azul) y aumentan los falsos negativos (región roja), bajando la sensibilidad y subiendo la especificidad. Si lo desplazamos a la izquierda se produce el resultado contrario.

Para seleccionar adecuadamente el punto de corte se usan las curvas ROC<sup>126</sup> (Figura 18), en las que se representa la sensibilidad en función de la especificidad en distintos puntos de corte. La información que proporciona esta curva ROC podemos concretarla según sus siguientes morfotipos:

- Si la prueba fuera perfecta, sin solapamiento, hay una región en la que cualquier punto de corte tiene sensibilidad y especificidad iguales a 1. La curva sólo tiene el punto (0,1).
- Si la prueba fuera inútil, la sensibilidad (verdaderos positivos) es igual a la especificidad (falsos positivos). La curva sería la diagonal de (0,0) a (1,1).
- Las pruebas habituales tienen curvas intermedias.

Una forma de evaluar la bondad de la prueba es el área bajo la curva que podrá tener valores entre 1 (prueba perfecta) y 0,5 (prueba inútil). Esta área se puede interpretar como la probabilidad de clasificar correctamente a dos individuos enfermos, uno con cáncer y otro sin él.

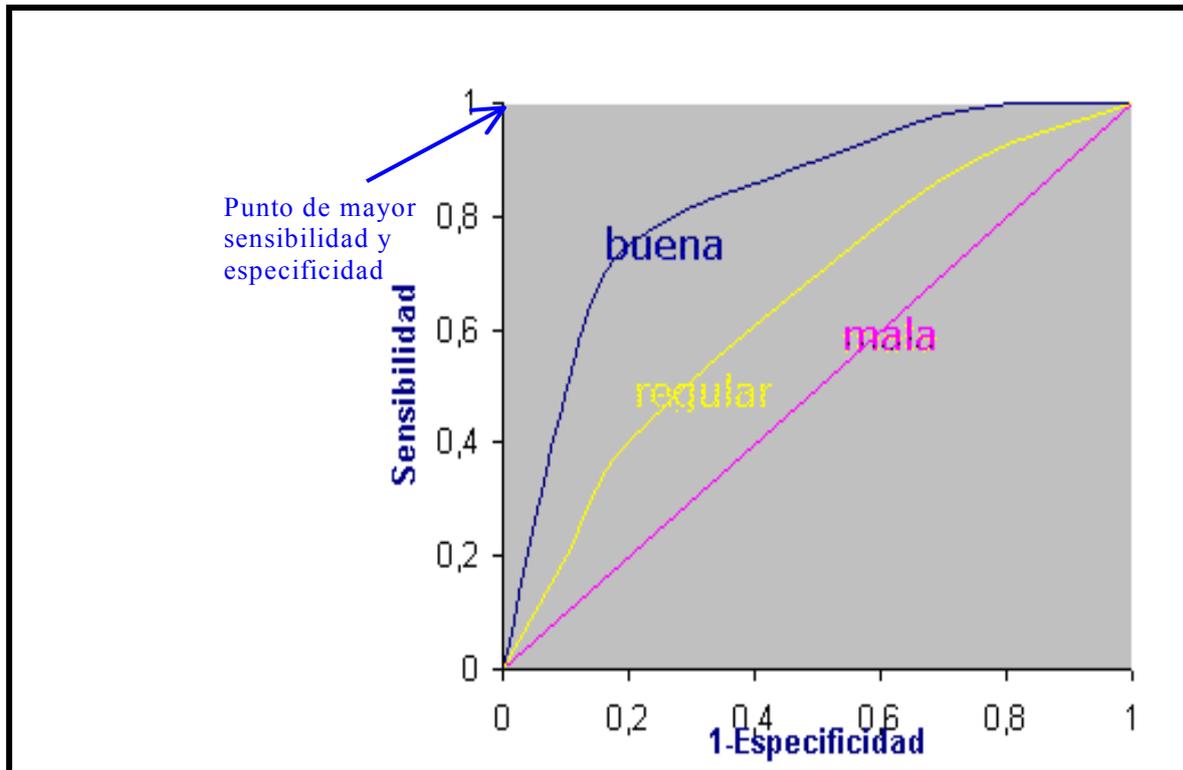


Figura 18. Ejemplo de los diferentes tipos de curvas ROC.

En resumen las curvas ROC son útiles para conocer el rendimiento global de una prueba (área bajo la curva), comparar dos pruebas con dos curvas distintas y elegir el punto de corte apropiado para un determinado paciente. No obstante, su uso presenta limitaciones pues sólo contemplan dos estados clínicos posibles: sano y enfermo, y no sirven para situaciones intermedias o si se trata de discernir entre más de dos enfermedades.

#### IV.4.3. Búsqueda bibliográfica.

Actualmente, los avances en la tecnología de la información y comunicación permiten acceder con facilidad y de forma exhaustiva a las fuentes bibliográficas. Las bases de datos actuales son la herramienta más adecuada para conocer los trabajos de investigación más relevantes. Utilizando la base de datos de la “National Library of Medicine” y seleccionando los términos científicos relacionados con este trabajo se tuvo acceso a revisiones y artículos de investigación relacionados con el CECC, marcadores tumorales séricos, metástasis ganglionares,..etc.

Enlace web: “National Library of Medicine” ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)).

## **V. RESULTADOS**

## V. RESULTADOS

En un primer apartado se presentarán los datos descriptivos de las variables clínico-patológicas estudiadas, dedicando una mayor extensión a la supervivencia y a su relación con el resto de las variables.

En un segundo apartado se describirán las variables analíticas de cada MT, de forma sistematizada, con una parte descriptiva y otra de correlación con las clínico-patológicas. Al final de cada marcador se hará un breve resumen de los resultados con valor estadístico. Para finalizar el bloque de resultados se expone una tabla resumen con las características de todos los MT, en términos de eficacia estadística, en relación con las metástasis ganglionares.

### V.1. RESULTADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Los resultados obtenidos del estudio de estas variables no pretenden definir los aspectos generales de los CECC, sino las características de los pacientes seleccionados y ver si se ajustan o desvían de lo esperado en este tipo de tumores. También servirán para establecer correlaciones con las variables analíticas estudiadas.

El grupo de 39 pacientes estudiados estaba formado por 37 hombres y 2 mujeres. La **edad** media fue de 61 años, con un rango entre 34 y 80.

Casi todos eran fumadores (97,4 %) y bebedores de alcohol (89,7%) En la tabla VI se detallan estos hábitos tóxicos y su tiempo de exposición.

Tabla VI. Tiempo de exposición y consumos más importantes de alcohol y tabaco.

	<b>Tabaco</b>	<b>Alcohol</b>
Exposición > 20 años	35 (90 %)	34 (87 %)
≥20 cigarrillos/día >100 g etanol/día)	34 (87 %)	17 (43,%)

La **localización** más frecuente fue la laringe (22 casos), siendo el resto de faringe (17 casos) (Tabla VII).

Tabla VII. Localización tumoral.

	Localización	Número (%)	Edad media (rango)
<b>Laringe</b> (n:22)	<b>Supraglotis</b>	12 (31)	62 (34-80)
	<b>Glottis *</b>	10 (25)	58 (46-76)
<b>Faringe</b> (n:17)	<b>Orofaringe</b>	12 (31)	61 (49-79)
	<b>Hipofaringe</b>	5(13)	66 (53-80)

\* Incluye glóticos, translóticos y subglóticos

Todos los pacientes tenían una **histopatología** de carcinoma escamoso que se hizo en la biopsia preoperatoria, estableciendo el grado histológico de diferenciación (pobre, moderado y bien) en la pieza de resección quirúrgica.

La **estadificación** se obtuvo de acuerdo al sistema TNM de la UICC. El 77% de los tumores estaban en estadios avanzados (III-IV).

Las **metástasis ganglionares** constatadas en el estudio histopatológico postoperatorio se observaron en 25 pacientes (64%), con distinta clasificación dentro de la categoría N (N1: 36%; N2b:40%; N2c:12%; N3: 12%). La **radioterapia** postoperatoria se administró a 25 pacientes (54%). Todos estos datos se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Estadificación, grado histológico, metástasis ganglionares y radioterapia.

	<b>Laringe</b> (n:22)			<b>Faringe</b> (n:17)			<b>(n:39)</b>
	<b>Supraglotis</b>	<b>Glottis *</b>	<b>Total (%)</b>	<b>Orofaringe</b>	<b>Hipofaringe</b>	<b>Total (%)</b>	<b>TOTAL (%)</b>
<b>Estadio</b>							
<b>I</b>	2	0	2 (5)	0	0	0 (0)	2 (5)
<b>II</b>	3	1	4 (10)	2	1	3 (8)	7 (18)
<b>III</b>	4	5	9 (23)	3	0	3 (8)	12 (31)
<b>IV</b>	3	4	7 (18)	7	4	11 (28)	18 (46)
<b>Grado histológico</b>							
<b>Pobre</b>	8	1	9 (23)	1	3	4 (10)	13 (33)
<b>Moderado</b>	2	5	7 (18)	8	2	10 (26)	17 (44)
<b>Bien</b>	2	4	6 (15)	3	0	3 (8)	9 (23)
<b>Metástasis ganglios</b>							
<b>Negativos</b>	5	5	10 (26)	3	1	4 (10)	14 (36)
<b>Positivos</b>	7	5	12 (31)	9	4	13 (33)	25 (64)
<b>Radioterapia</b>							
<b>Sí</b>	5	5	10 (26)	6	5	11 (28)	21 (54)
<b>No</b>	7	5	12 (30)	6	0	6 (16)	18 (46)

\* Incluye glóticos, translóticos y subglóticos

Los datos de **supervivencia** correspondientes a los 39 pacientes del estudio obtuvieron una mediana de supervivencia de 24 meses. En la figura 19 se muestra la curva de supervivencia global.

Se consideraron causas de muerte relacionadas con el tumor las metástasis y las recidivas, excluyéndose los segundos primarios ya que pueden tener una expresión distinta del tumor inicial y el tiempo de latencia entre los dos puede ser muy amplio.

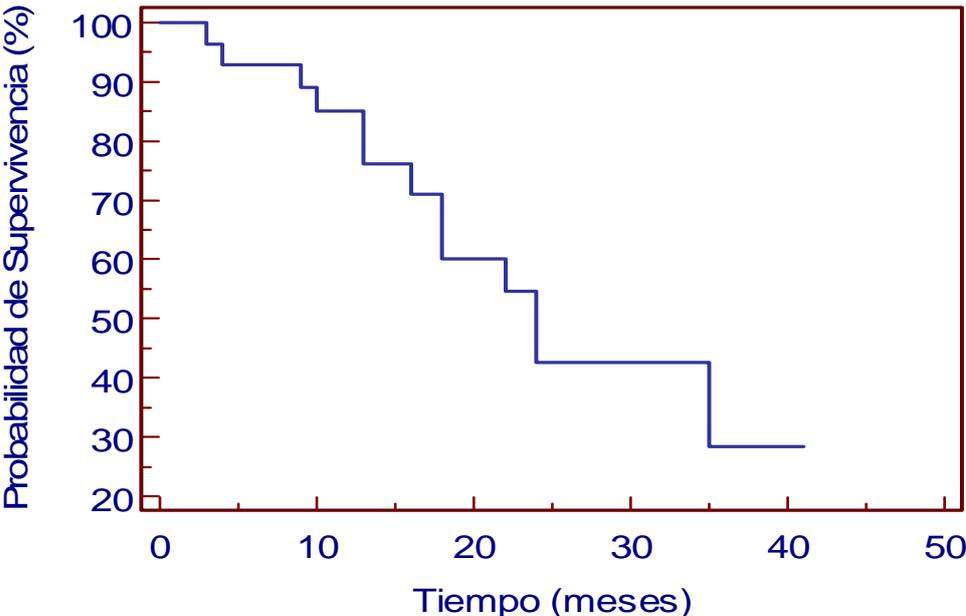


Figura 19. Supervivencia global.

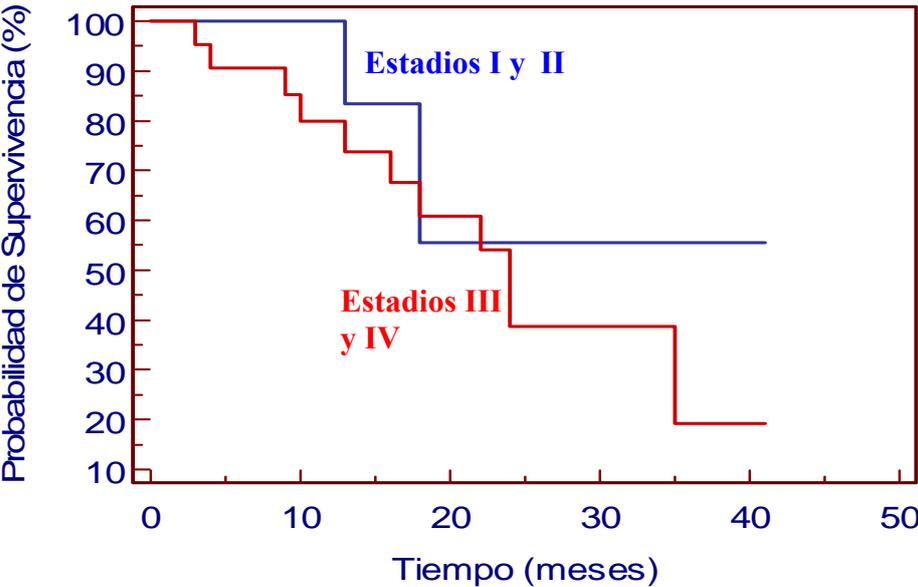


Figura 20. Supervivencia por estadios agrupados.

En general, la supervivencia de los pacientes con estadios de la enfermedad más avanzados (III-IV) fue peor que en estadios más precoces (I-II), aunque no existieron diferencias significativas en la prueba log Rank ( $\chi^2 = 0,7798$ ; gl = 1; p = 0,3772)(Figura 20).

Los pacientes con metástasis ganglionares tienen peor supervivencia, sobre todo pasados 20 meses del diagnóstico, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $\chi^2 = 0,1012$ ; gl = 1; p = 0,7504) (Figura 21).

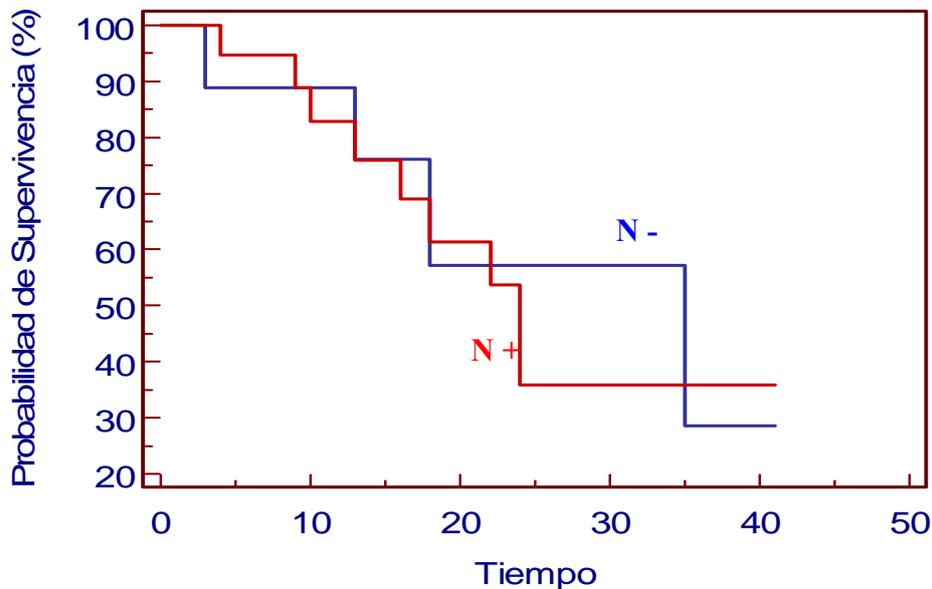


Figura 21. Metástasis ganglionares y supervivencia.

Se observa mayor supervivencia en los pacientes que no recibieron radioterapia, debido a que la mayoría de los que la recibieron eran estadios avanzados, aunque las diferencias no fueron significativas ( $\chi^2 = 0,4815$ ; gl = 1; p= 0,4878), (Figura 22).

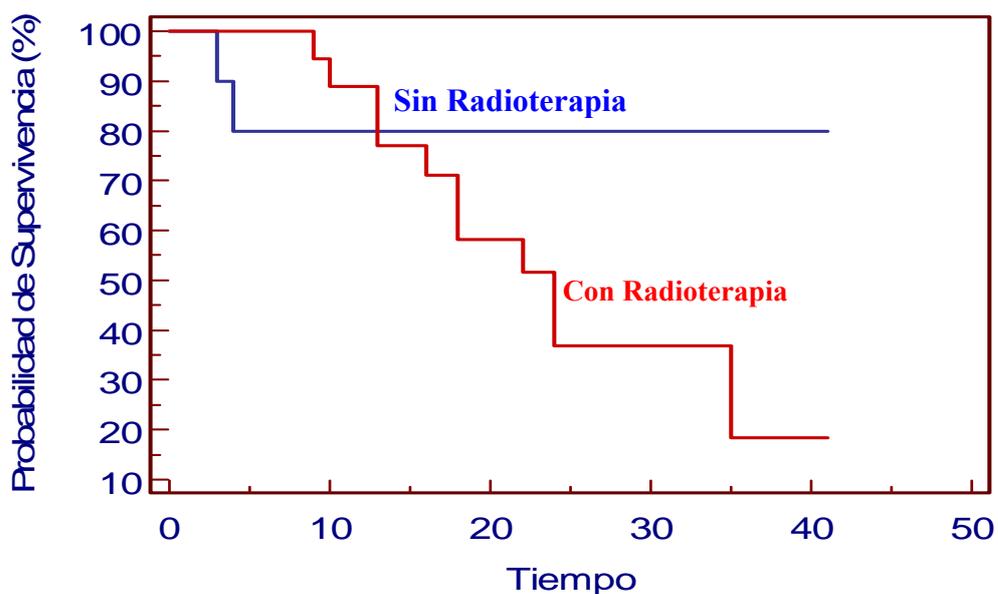


Figura 22. Antecedente de radioterapia y supervivencia.

La supervivencia según la localización tumoral también presentó algunas variaciones. Los tumores faríngeos tenían peor supervivencia que los laríngeos, aunque en este caso las diferencias sí fueron estadísticamente significativas con el log Rank ( $\chi^2 = 5,6262$ ; gl =1; p = 0,0177), (Figura 23).

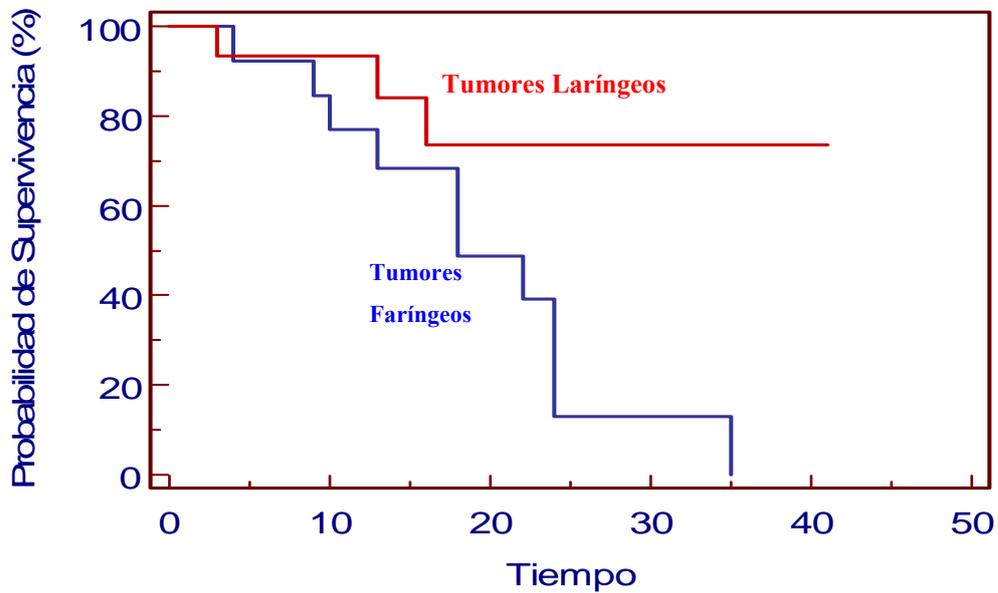


Figura 23. Localización tumoral y supervivencia.

## V.2. RESULTADOS ANALÍTICOS

### V.2.1. Antígeno de células escamosas (AgSCC).

#### Descripción.

Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n=39) oscilaron entre 0,6 y 57,8 ng/mL (media 3,72; mediana 1,6). En el caso de los controles (n=10) se distribuyeron entre 1,1-1,7 ng/mL (media 1,35; mediana 1,3 ng/mL). En la tabla IX se observa la distribución de estos valores en función de su concentración.

Tabla IX. Valores séricos de AgSCC en pacientes con CECC y controles. Punto de corte 1,5 g/mL.

Concentración AgSCC	Pacientes (%)	Controles (%)
<1,5 ng/mL	18 (46%)	8 (80%)
>1,5 ng/mL	21 (54%)	2 (20%)

Para clasificar los resultados se tomó inicialmente como punto de corte 1,5 ng/mL, pues ese valor o menor era el observado en el 95% de los sujetos sanos, según lo especificado por el fabricante del “kit” empleado (n = 616).

La comparación de los valores de AgSCC entre pacientes (media 3,72 mg/mL; IC: 0,70-6,70) y controles (media 1,35 ng/mL; IC 1,20-1,49) no mostró diferencias estadísticamente significativas (p=0,4275). En las figuras 24 y 25 se representan los niveles comparados de SCC.

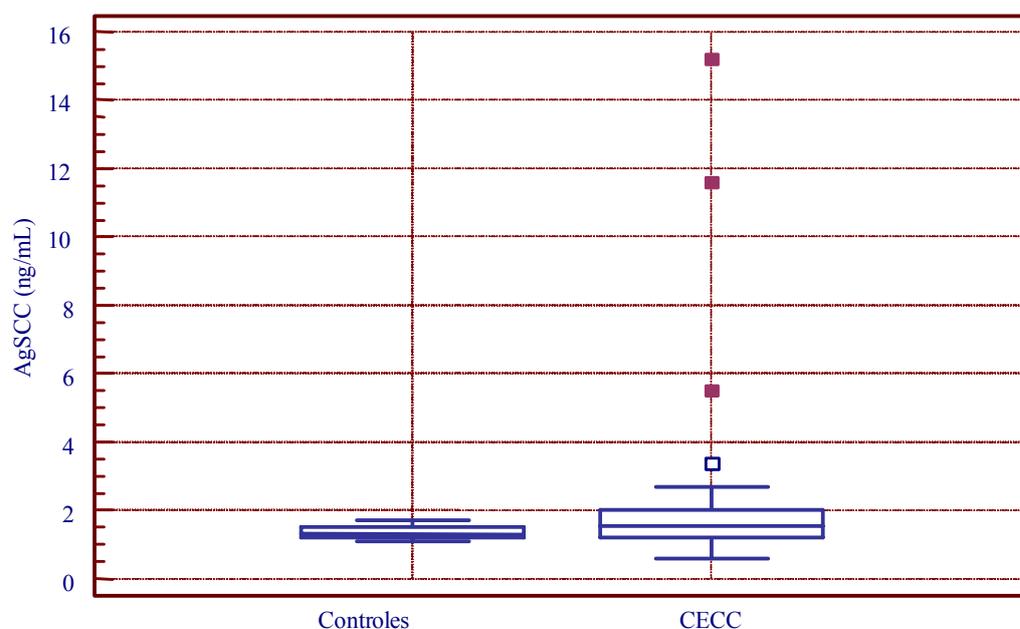


Figura 24. Valores de AgSCC en controles y pacientes. Se muestran valores de la media, percentiles (25 y 75) y el rango.

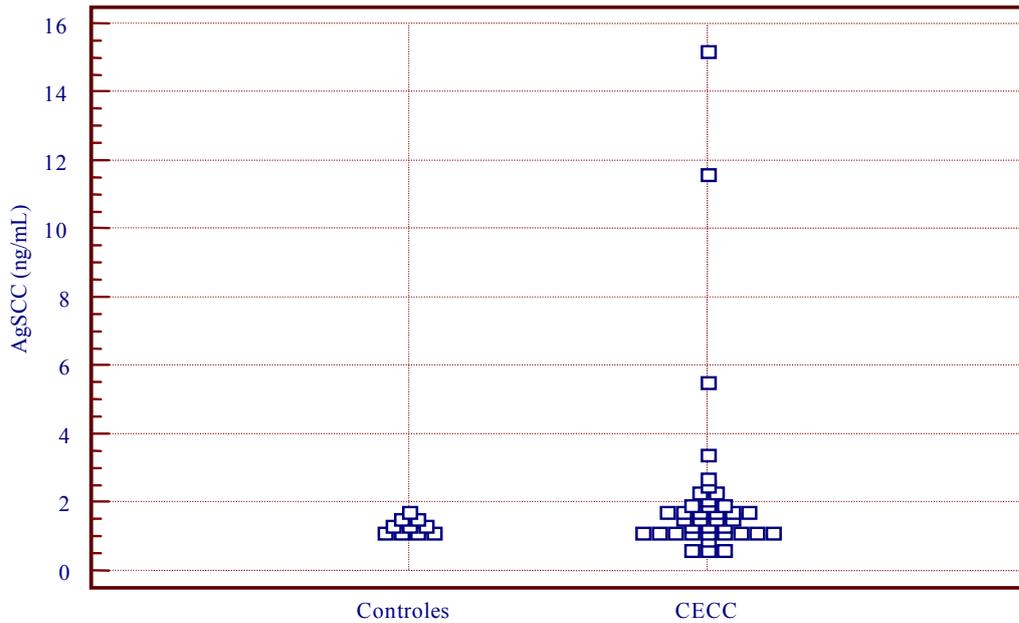


Figura 25. Dispersión por puntos de los valores de AgSCC en controles y pacientes.

**Correlación con variables clínicas.**

En la figura 26 se muestra el análisis ROC de AgSCC frente a la presencia de metástasis ganglionares.

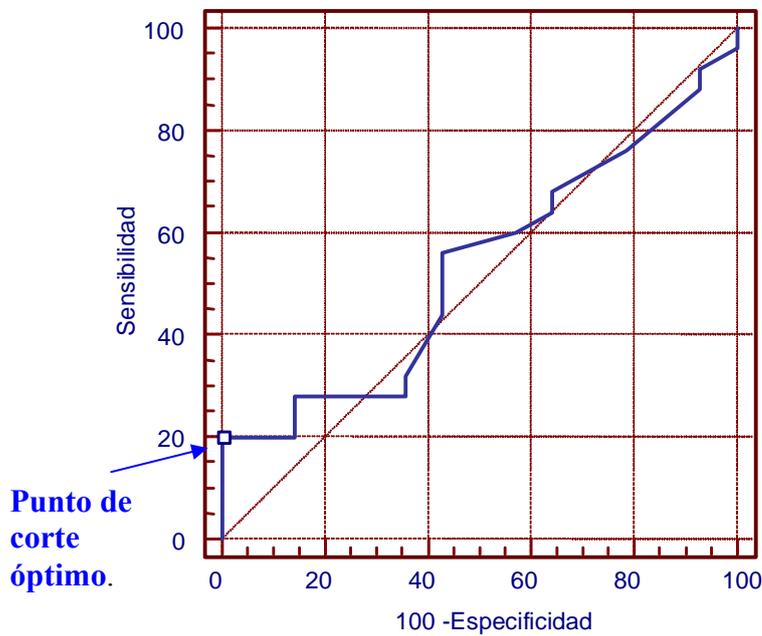


Figura 26. Curva ROC para AgSCC versus presencia de metástasis.

El área bajo la curva fue de 0,530. El punto de corte óptimo se fijó en 2,7 ng/mL para una sensibilidad del 20 % y una especificidad del 100%. El VPP fue del 71%, y el VPN del

37%. Aplicando este valor obtenemos cuatro pacientes con metástasis ganglionares y cifras superiores a 2,7 ng/mL.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de AgSCC de los pacientes con metástasis (mediana 1,7; IC: 1,2-2,14) frente a los que no las presentaron (mediana 1,5; IC: 1,12-2,07), siendo  $p = 0,7585$ .

Los valores de AgSCC en función del estadio se pueden ver en la figura 27.

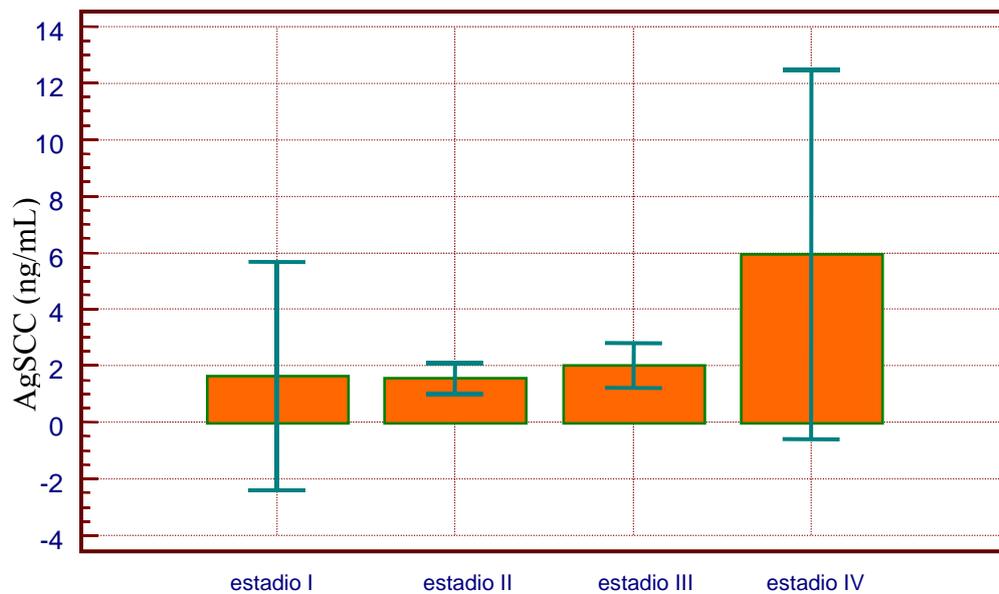


Figura 27. AgSCC y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

Las concentraciones medias (ng/mL) por estadios fueron para I: 1,65; II: 1,54; III: 2,01 y IV: 5,9. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de AgSCC en función del estadio ( $p = 0,608$ ).

En la figura 28 se muestra la distribución de los niveles de AgSCC en función de la localización del tumor

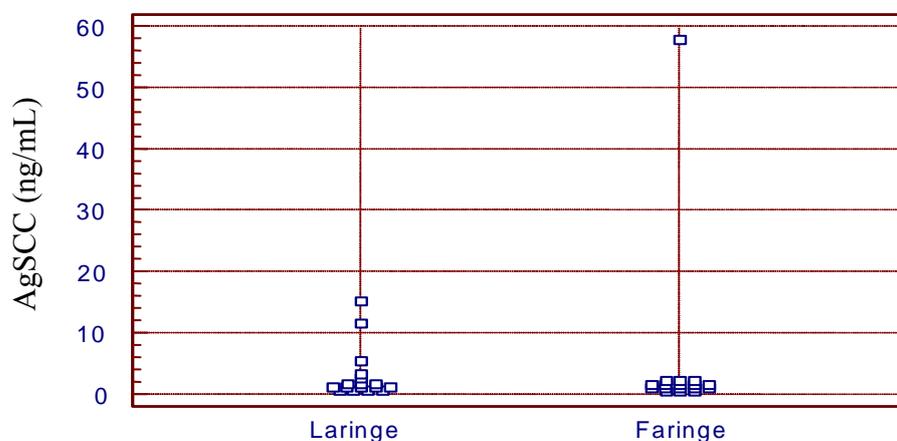


Figura 28. Distribución por puntos de los valores de AgSCC en función de la localización.

La concentración de AgSCC en tumores laríngeos (mediana 1,15; IC: 1,13-3,17) fue similar a la de los tumores faríngeos (mediana 1,16; IC: 1,1-2,2), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,5808$ ).

En la figura 29 se muestran los valores de AgSCC según el grado de diferenciación histológico. La concentración media de AgSCC fue superior en los pacientes con tumores poco diferenciados (8,16 ng/mL), en relación con los moderadamente (1,55 ng/mL) y bien diferenciados (1,4 ng/mL). Aunque estos valores no tenían diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,107$ ), si estuvieron próximas entre tumores poco y moderadamente diferenciados ( $p = 0,0892$ ).

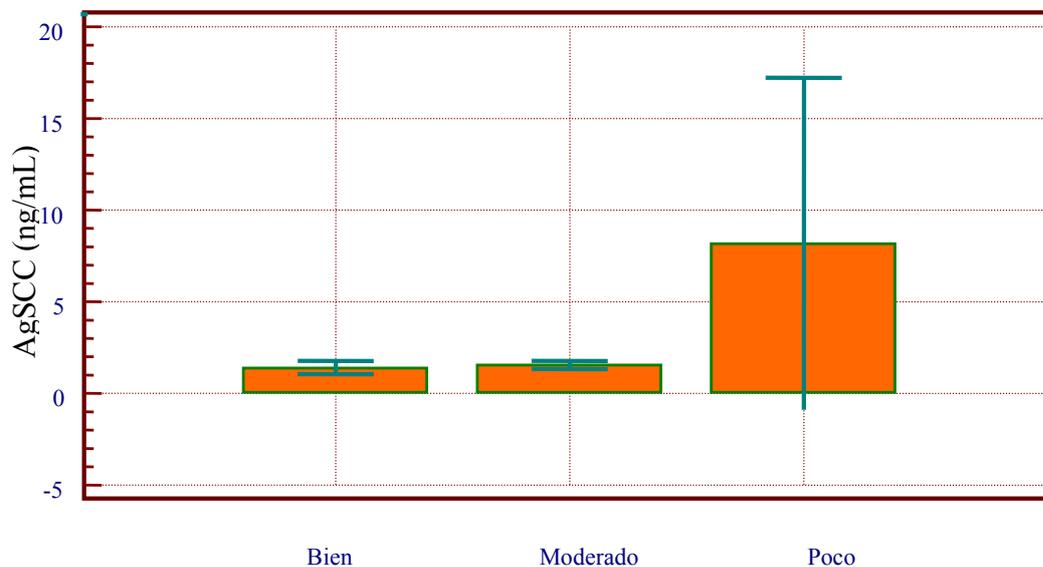


Figura 29. Niveles de AgSCC y grado de diferenciación histológico (barras de error de la media para IC del 95%).

En la figura 30 se muestra la curva de supervivencia en función de la concentración de AgSCC, utilizando como punto de corte 1,5 ng/mL. Este punto nos aporta una sensibilidad del 56% y una especificidad del 57%, para el diagnóstico de metástasis y es el más utilizado en la clínica.

El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas en la prueba log Rank ( $\chi^2 = 0,2271$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,6337$ ).

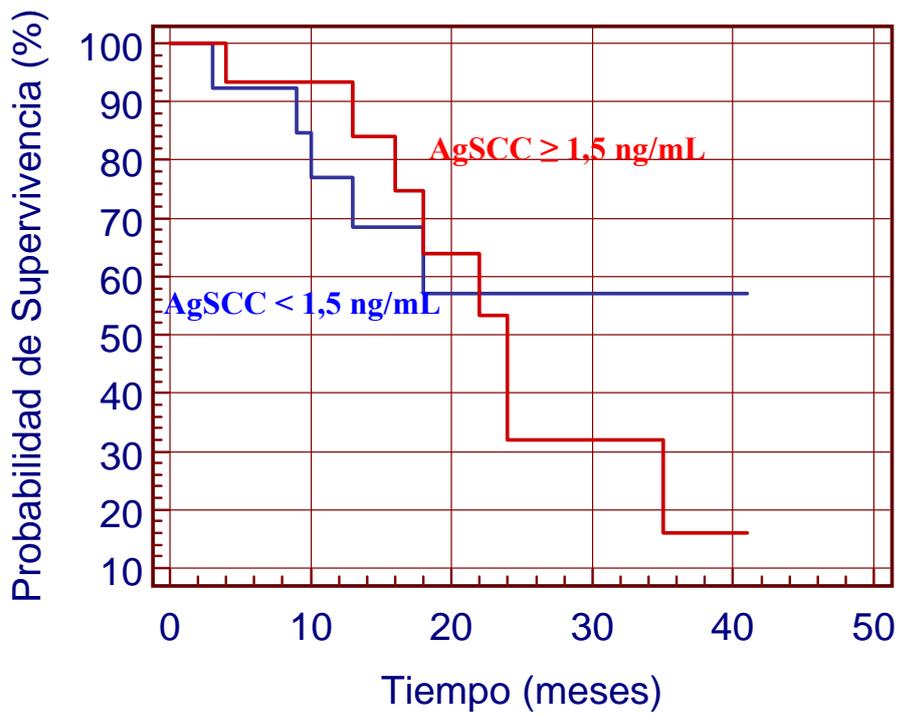


Figura 30. Supervivencia en relación con el punto de corte 1,5 ng/ml para el AgSCC.

En resumen los valores del AgSCC tuvieron una sensibilidad del 20% y una especificidad del 100% aplicando un punto de corte de 2,5 ng/mL para el diagnóstico preoperatorio de las metástasis, siendo el VPP del 71%, el VPN del 37% y el área bajo la curva ROC de 0,530. Ninguna de las variables clínicas se correlacionó de forma significativa con sus valores.

### V.2.2. CYFRA 21.1.

#### Descripción.

Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n = 39) oscilaron entre 0,1-406 ng/mL (media 14,58; mediana 1,60). En el caso de los controles (n=10) se distribuyeron entre 0,1-1,8 ng/mL (media 0,39; mediana 0,15). En la tabla X se observa la distribución de estos valores en función de su concentración.

Tabla X. Valores séricos de CYFRA 21.1 en pacientes con CECC y controles. Punto de corte 3 ng/mL.

Concentración CYFRA 21.1	Pacientes (%)	Controles (%)
< 3 ng/mL	30 (76%)	10 (100%)
> 3 ng/mL	9 (24%)	

La comparación de los valores de CYFRA 21.1 entre pacientes (mediana 1,60; IC: 1,21-2,35) y controles (mediana 0,15; IC: 0,10-0,73) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0001$ ). En las figuras 31 y 32 se representan los valores comparados de CYFRA 21.1.

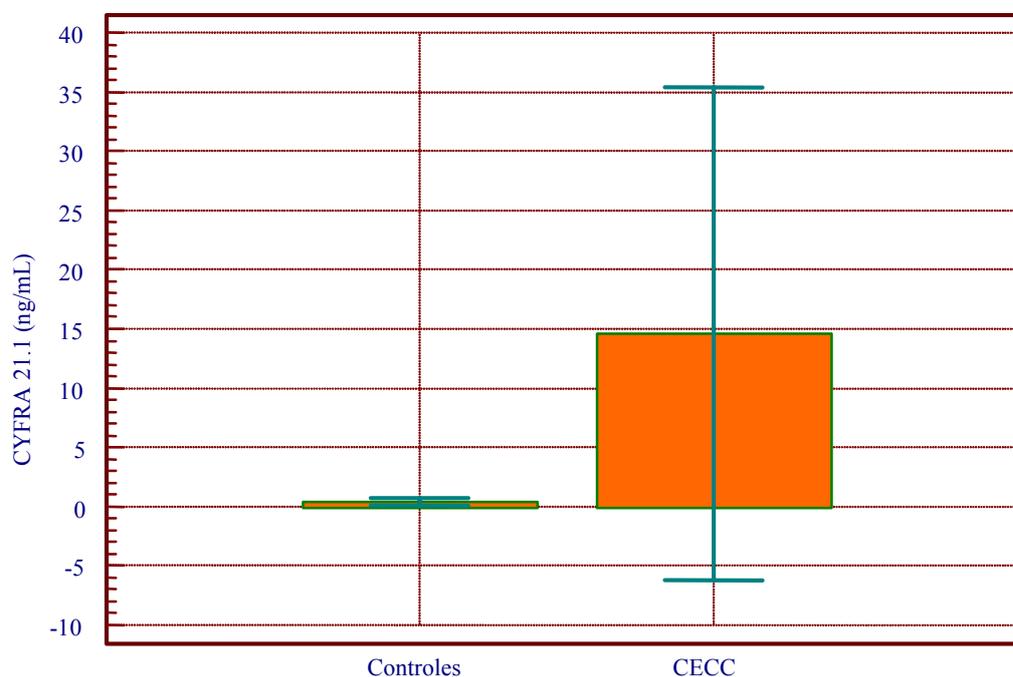


Figura 31. Valores de CYFRA 21.1 en controles y pacientes. Se muestran valores de la media con un IC del 95%.

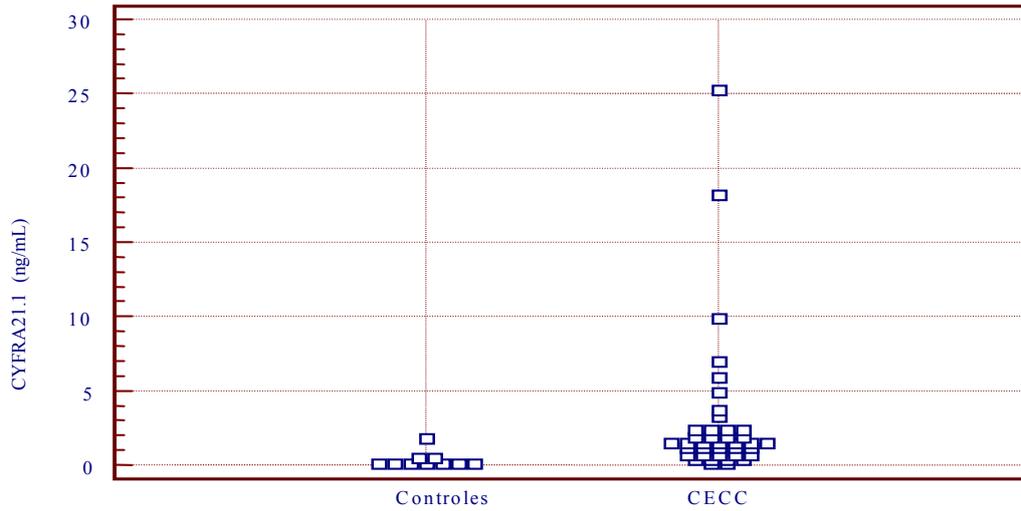


Figura 32. Dispersión por puntos de los valores de CYFRA 21.1 en controles y pacientes.

**Correlación con variables clínicas.**

En la figura 33 se muestra el análisis ROC de CYFRA 21.1 frente a la presencia de metástasis ganglionares.

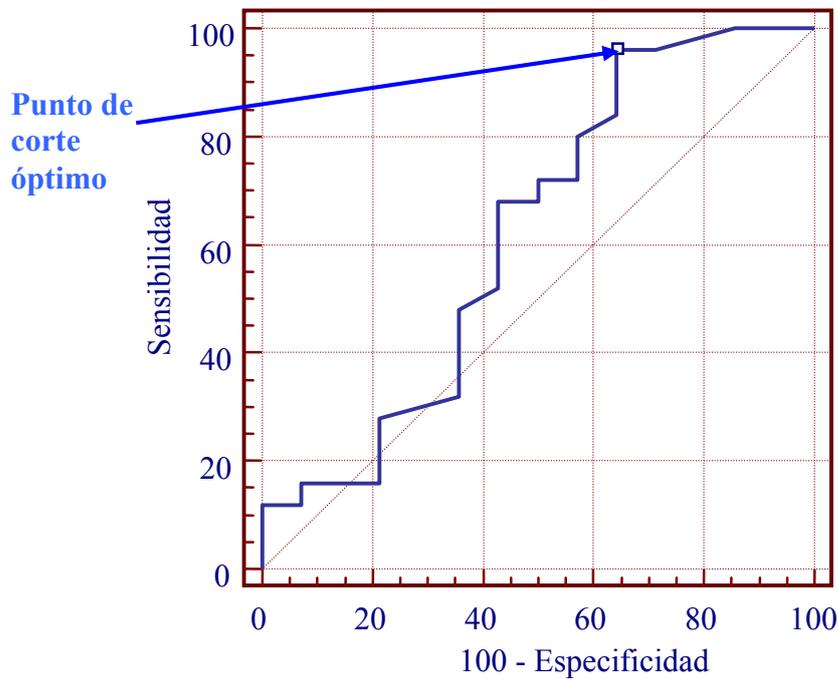


Figura 33. Curva ROC para CYFRA 21.1 versus presencia de metástasis.

El área bajo la curva fue de 0,620. El punto de corte óptimo se fijó en 0,5 ng/mL para una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 35,7%. El VPP fue del 70 % y el VPN del 80 %.

Con este valor encontramos que 24 pacientes con metástasis ganglionares tenían cifras superiores a 0,5 ng/mL, mientras que 10 no las presentaron.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CYFRA 21.1 de los pacientes con metástasis (mediana 1,70; IC: 1,27-2,56) frente a los que no las tuvieron (mediana 1,35; IC: 0,40-4,33), siendo  $p = 0,1243$ .

Los valores de CYFRA 21.1 en función del estadio se pueden ver en la figura 34.

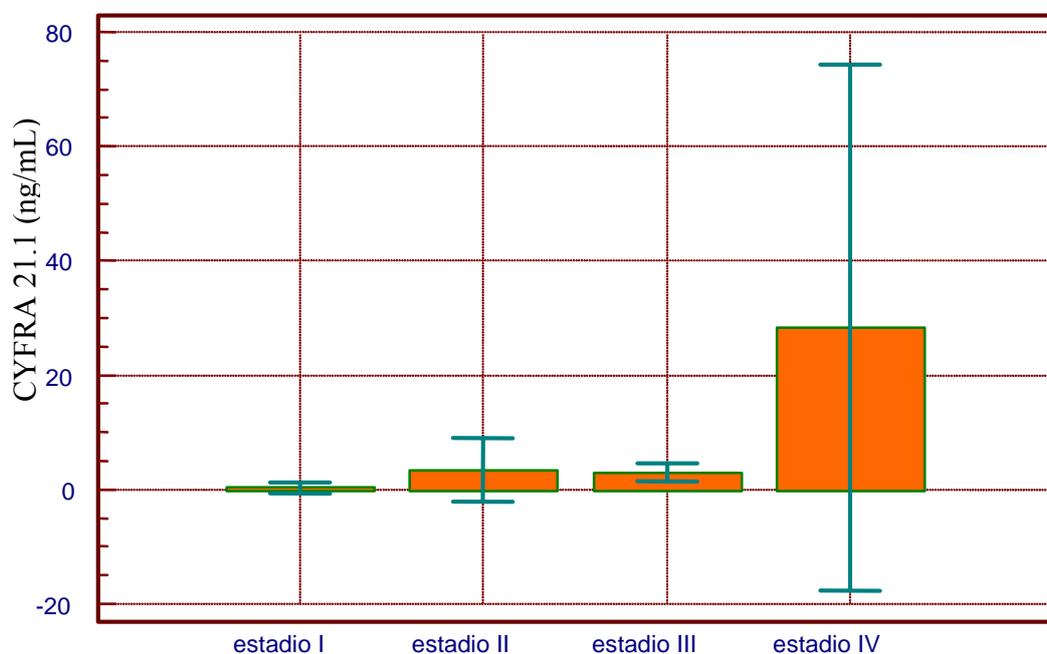


Figura 34. CYFRA 21.1 y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

Las concentraciones medias (ng/ml) por estadios fueron para I: 0,3; II: 3,4; III: 2,93 y IV: 28,30. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CYFRA 21.1 en función del estadio ( $p=0,701$ ). Sin embargo, agrupando los estadios I, II, y III frente al IV, sí obteníamos valores significativos ( $r = 0.8428$ ,  $p < 0,0001$ ).

En la figura 35 se muestra la distribución de los niveles de CYFRA 21.1 en función de la localización del tumoral.

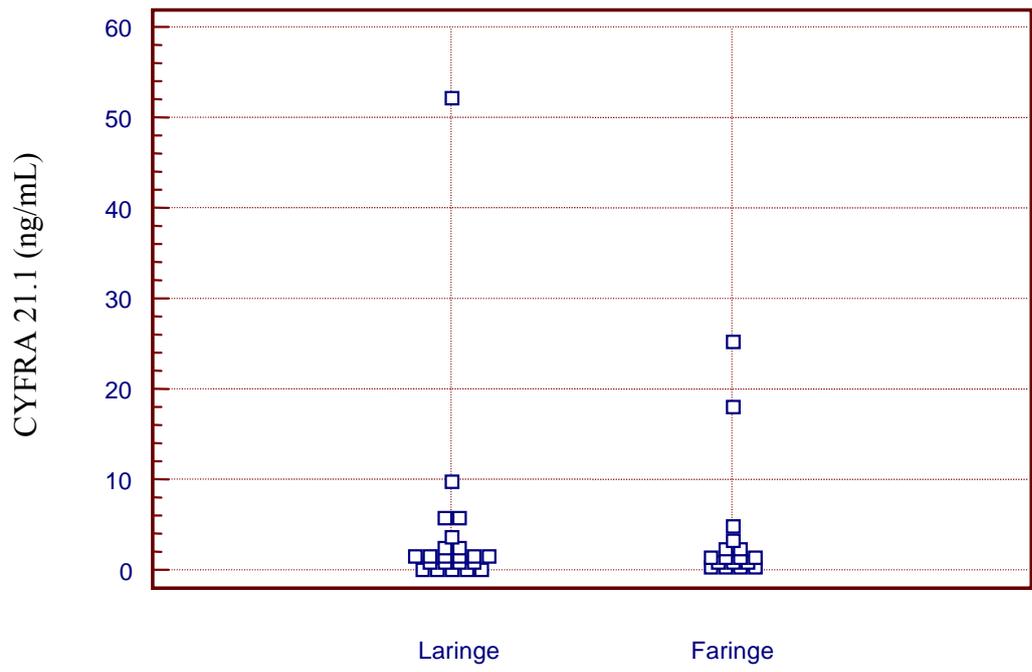


Figura 35. Distribución niveles CYFRA 21.1 en función de la localización.

La concentración de CYFRA 21.1 en tumores laríngeos (mediana 1,65; IC: 0,96- 2,5) fue similar a la de los tumores faríngeos (mediana 1,06; IC: 0,83-3,07 ng/mL), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estos niveles según la localización del tumor ( $p = 0,9323$ ).

En la figura 36 se muestran los valores de CYFRA 21.1 según el grado de diferenciación histológico.

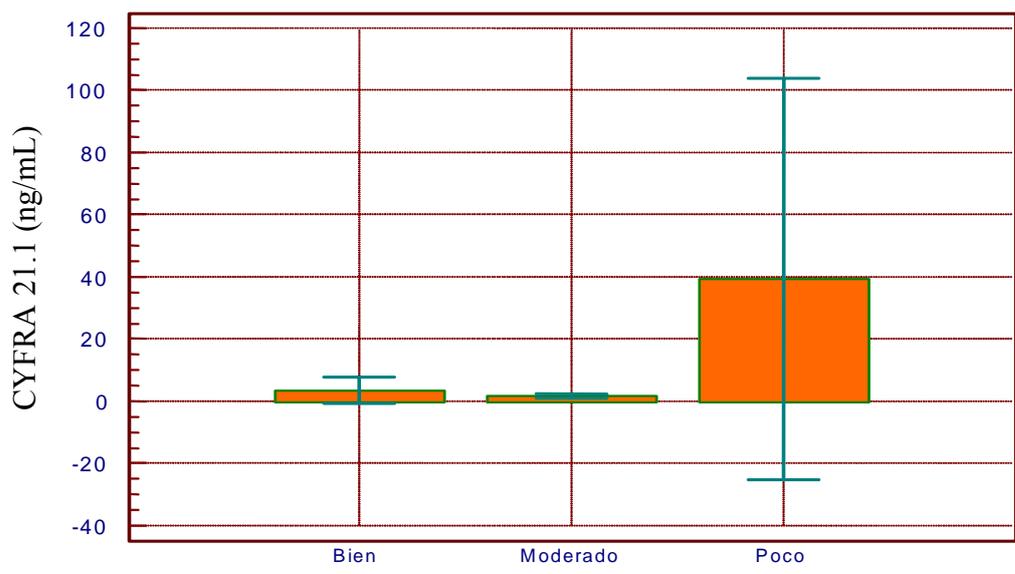


Figura 36. Niveles de CYFRA 21.1 y grado de diferenciación histológico (barras de error de la media para IC del 95%).

La concentración media de CYFRA 21.1 fue superior en los pacientes con tumores poco diferenciados (39,22 ng/mL), en relación con los moderadamente (1,65 ng/mL) y bien diferenciados (3,40 ng/mL). Aunque estos valores no fueron estadísticamente significativos ( $p=0,256$ ), sí alcanzaban significación entre tumores poco y moderadamente diferenciados ( $p = 0,0226$ ).

En la figura 37 se observa la curva de supervivencia según la concentración de CYFRA 21.1, utilizando como punto de corte 3 ng/mL, que es el valor más utilizado en la clínica. La mediana de la supervivencia en los 6 pacientes con valores superiores a 3 ng/mL fue de 35 meses, mientras que en los 22 pacientes con valores inferiores se redujo a 24 meses. El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas en la prueba log Rank ( $\chi^2 = 0,1491$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,6994$ ).

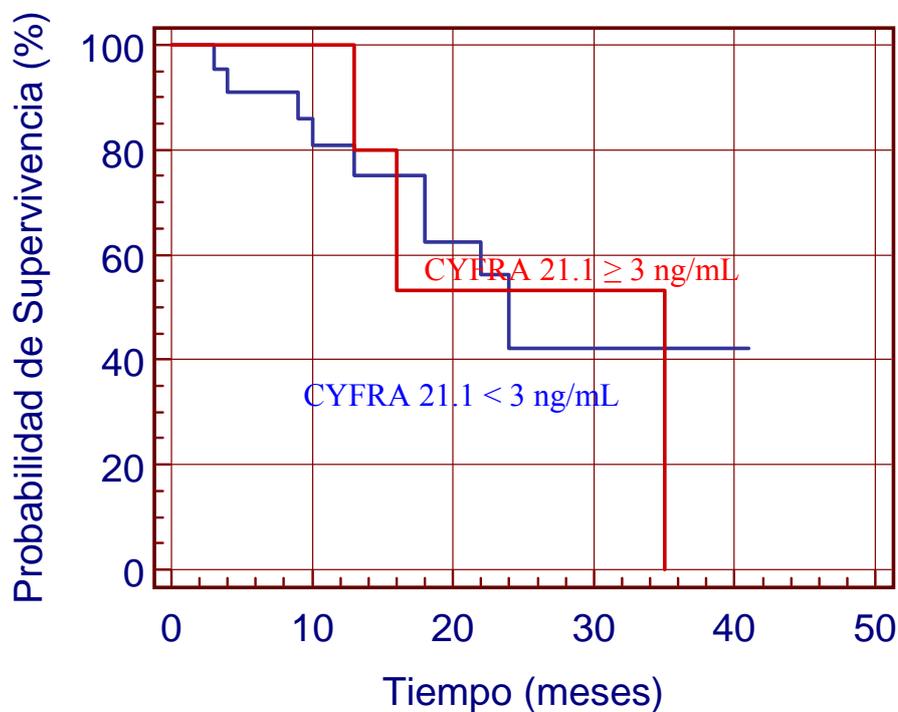


Figura 37. Supervivencia en relación con el punto de corte 1,5 ng/mL para CYFRA 21.1.

El resumen de los resultados de CYFRA 21.1 muestra que la sensibilidad para el diagnóstico preoperatorio de las metástasis fue del 96% y la especificidad del 35,7%. El VPP fue del 70%, y el VPN del 80%. El área bajo la curva ROC fue de 0,620.

Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de CYFRA21.1 de controles y pacientes con CECC. Hubo también diferencias significativas entre los niveles de CYFRA 21.1 de los tumores poco diferenciados frente a los moderadamente diferenciados.

### V.2.3. E-cadherina.

#### Descripción.

Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n= 39) oscilaron entre 1,102-7,852  $\mu\text{g/mL}$  (media 2,968; mediana 2,527). En el caso de los controles (n=10) se distribuyeron entre 1,154-2,131  $\mu\text{g/mL}$  (media 1,869; mediana 1,912), observando que sólo 4 controles superaban los 2  $\mu\text{g/mL}$ . En la tabla XI se observa la distribución de estos valores en función de su concentración.

Tabla XI. Valores séricos E-cadherina en pacientes con CECC y controles.

Concentración E-cadherina	Pacientes (%)	Controles (%)
$\leq 2,5 \mu\text{g/mL}$	15 (38%)	0(0%)
$> 2,5 \mu\text{g/mL}$	24(62%)	0(0%)
1-2 $\mu\text{g/mL}$	0(0%)	6(60%)
2-2,5 $\mu\text{g/mL}$	0(0%)	4(40%)

La comparación de los valores de E-cadherina entre pacientes (media 2,97  $\mu\text{g/mL}$ ; IC: 2,42-3,51  $\mu\text{g/mL}$ ) y controles (media 1,87  $\mu\text{g/mL}$  IC: 1,66-2,07  $\mu\text{g/mL}$ ) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0483$ ). En las figuras 38 y 39 se representan los valores comparados de E-cadherina.

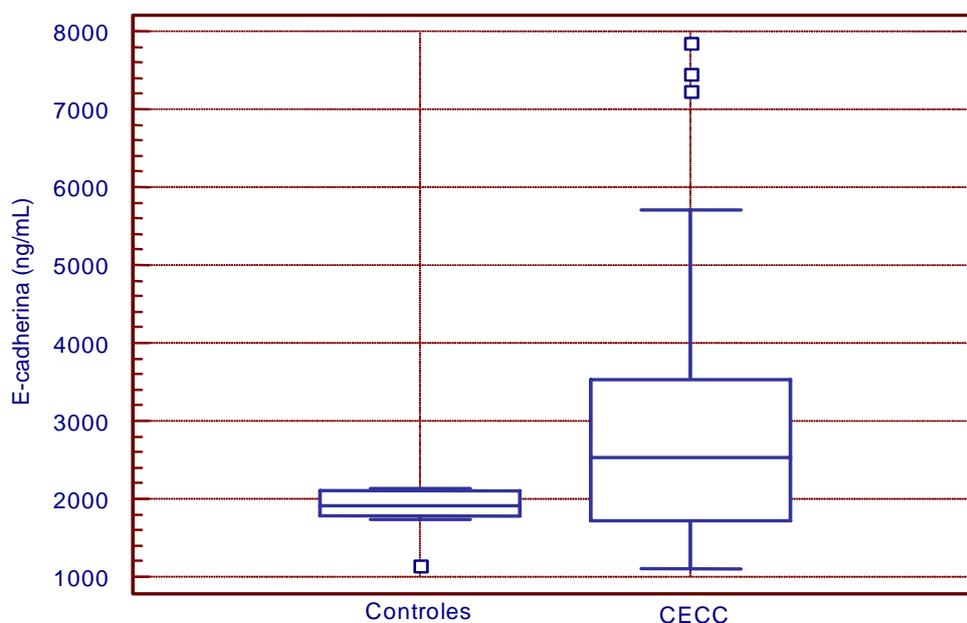


Figura 38. Valores de E-cadherina en controles y pacientes. Se muestran los valores de la media, percentiles (25 y 75) y el rango.

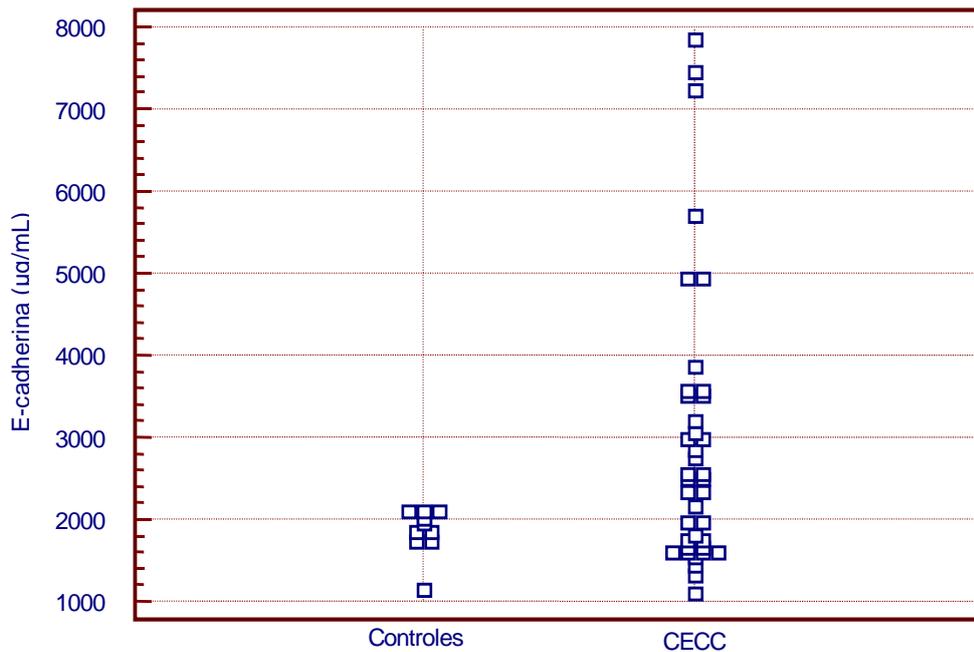


Figura 39. Dispersión por puntos de los valores de E-cadherina en controles y pacientes.

### Correlación con variables clínicas.

En la figura 40 se muestra el análisis ROC de E-cadherina frente a la presencia de metástasis ganglionares.

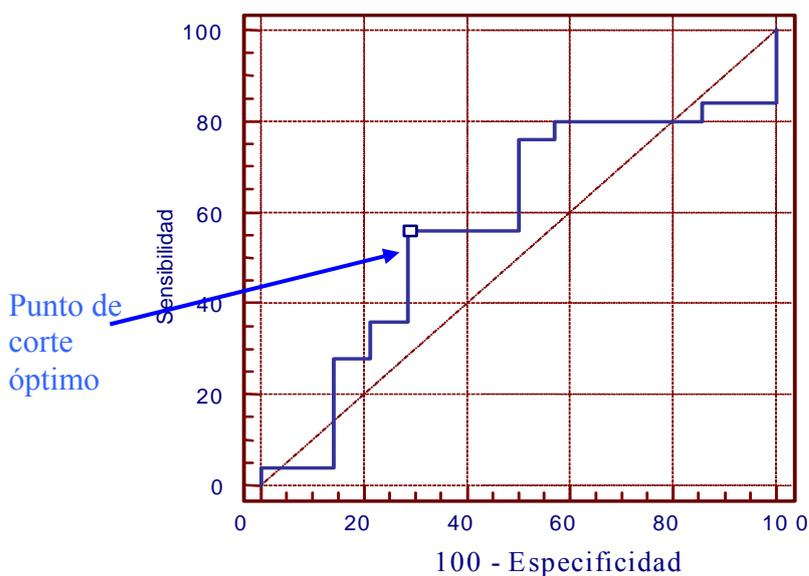


Figura 40. Curva ROC para E-cadherina versus presencia de metástasis.

El área bajo la curva fue de 0,574. El punto de corte óptimo se fijó en 2,56 µg/mL, para una sensibilidad del 56 % y una especificidad del 71,4%. El VPP fue del 73% y el VPN del

45%. Con este valor obtenemos que 14 pacientes con metástasis ganglionares tenían valores superiores a 2,56 y otros 5 no las presentaron.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de E-cadherina de los pacientes con metástasis (media 2,99; IC: 2,35-3,65) frente a las que no las tuvieron (media 2,889; IC: 1,76-4,04), siendo  $p = 0,869$ .

Los valores de E-cadherina en función del estadio se pueden ver en la figura 41.

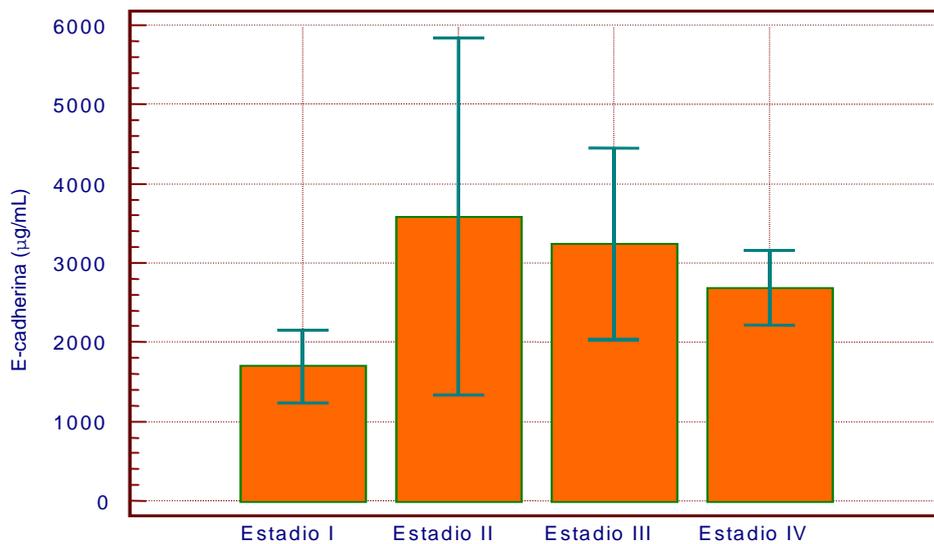


Figura 41. E-cadherina y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

Las concentraciones medias ( $\mu\text{g/mL}$ ) por estadios fueron para I: 1,69; II: 3,58; III: 3,23 y IV: 2,69. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de E-cadherina en función del estadio ( $p = 0,431$ ).

En la figura 42 se muestra la distribución de los niveles de E-cadherina en función de la localización del tumor.

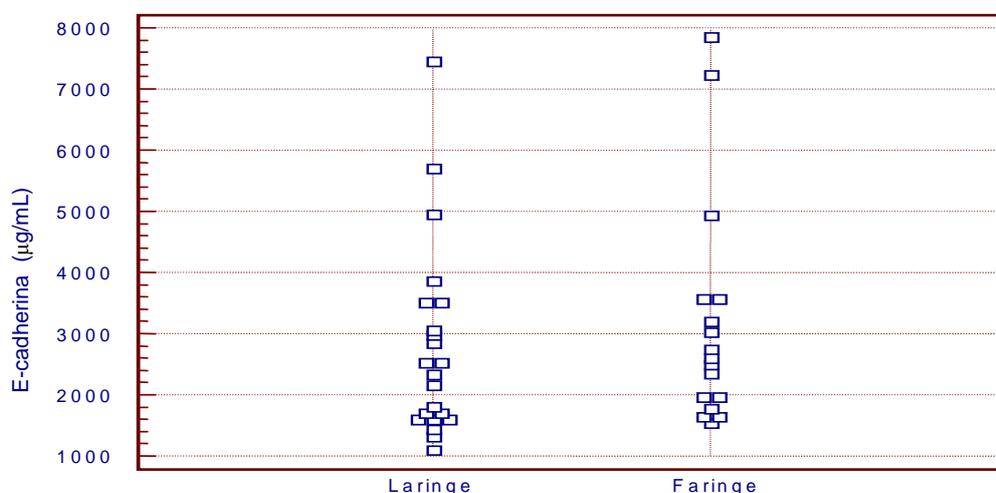


Figura 42. Distribución niveles de E-cadherina en función de la localización.

La concentración de E-cadherina en tumores laríngeos (media 2,79; IC: 2,01-3,49) fue similar a la de los tumores faríngeos (media 3,19; IC: 2,23-4,15), no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre estos niveles según la localización del tumor ( $p = 0,4777$ ).

En la figura 43 se muestran los valores de E-cadherina según el grado de diferenciación histológico.

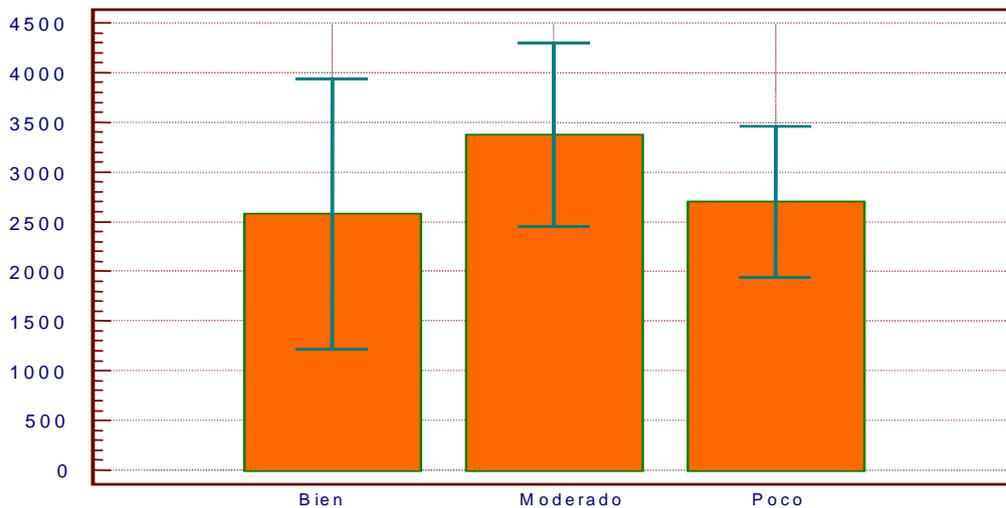


Figura 43. Niveles de E-cadherina y grado de diferenciación histológico (barras de error de la media para IC del 95%).

La concentración media de E-cadherina en función del grado de diferenciación fue superior en los moderadamente diferenciados (3,375  $\mu\text{g/mL}$ ), en relación a los poco (2,702  $\mu\text{g/mL}$ ) y bien diferenciados (2,584  $\mu\text{g/mL}$ ), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,425$ ).

En la figura 44 se observa la curva de supervivencia según la concentración de E-cadherina, utilizando un punto de corte superior o igual a 2,56  $\mu\text{g/mL}$ .

La supervivencia para los pacientes con valores de E-cadherina superiores al punto de corte fue para la mediana de 24 meses, mientras que para valores inferiores alcanzó los 35 meses. El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas en la prueba log Rank ( $\chi^2 = 0,3913$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,5316$ ).

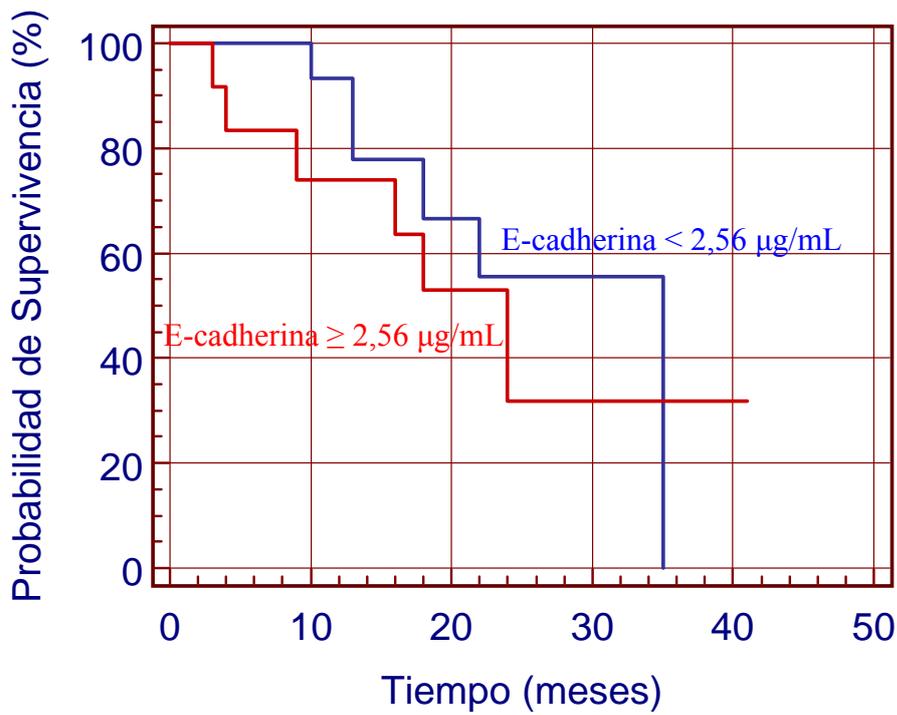


Figura 44. Supervivencia en relación con el punto de corte 2,56 µg/mL para E-cadherina.

Como resumen de los resultados de la E-cadherina hay que decir que la sensibilidad para el diagnóstico preoperatorio de las metástasis fue del 56%, la especificidad del 71,4%, el VPP del 76% y el VPN del 45%, aplicando como punto de corte un valor superior o igual a 2,56 µg/mL. El área bajo la curva ROC fue de 0,574. Existieron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de E-cadherina de controles y pacientes con CECC.

#### V.2.4. Metaloproteasa 2 (MMP-2).

##### Descripción.

Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n=39) oscilaron entre 119,7-907,2 ng/mL (media 355,63, mediana 311,7). Aproximadamente un tercio de los pacientes tuvieron una concentración superior a 400 ng/mL. En el caso de los controles (n=10) los valores se distribuyeron entre 257,9-651,4 ng/mL (media 430,1; mediana 407,35). En la tabla XII se observa la distribución de estos valores.

Tabla XII. Valores séricos de MMP-2 en pacientes con CECC y controles. Punto de corte 400 ng/mL.

Concentración MMP-2	Pacientes (%)	Controles (%)
< 400 ng/mL	27 (69%)	5(50%)
> 400 ng/mL	12 (31%)	5(50%)

La comparación de los valores de MMP-2 entre pacientes (media 355,6 ng/mL; IC: 310,1-401,1) y controles (media 430,1 ng/mL; IC: 331,9-528,3) no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,1393$ ). En las figuras 45 y 46 se representan los niveles comparados de MMP-2.

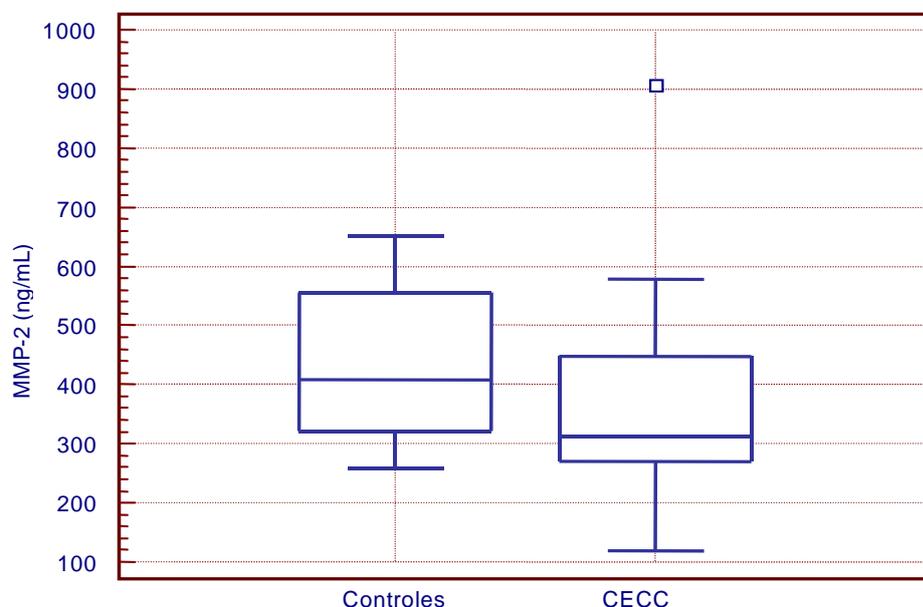


Figura 45. Valores de MMP-2 en controles y pacientes. Se muestran valores de media, percentiles (25 y 75) y el rango.

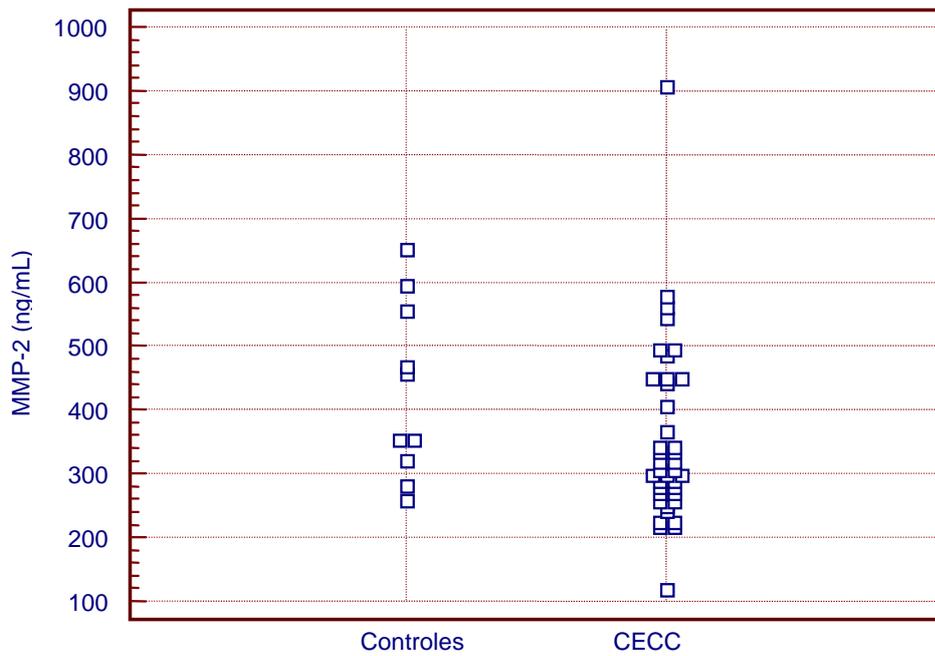


Figura 46. Dispersión por puntos de los valores de MMP-2 en controles y pacientes.

**Correlación con variables clínicas.**

En la figura 47 se muestra el análisis ROC de MMP-2 frente a la presencia de metástasis ganglionares.

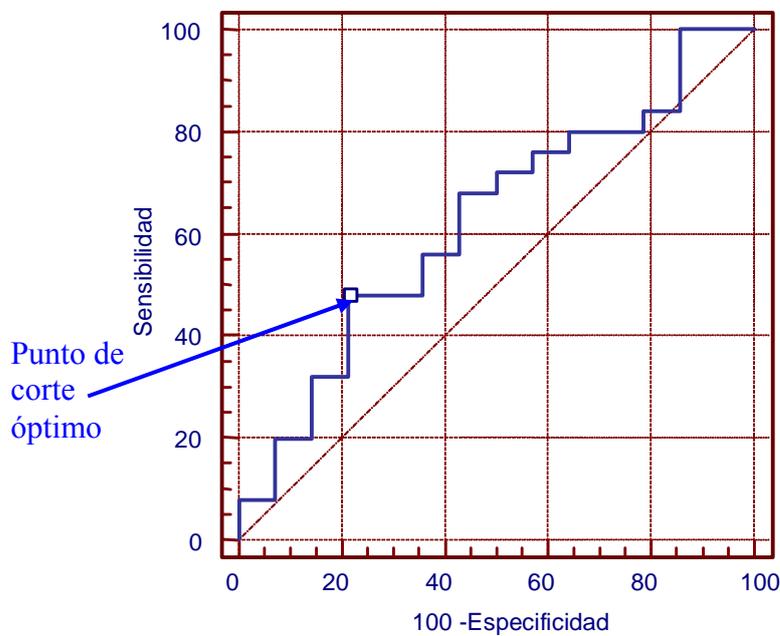


Figura 47. Curva ROC para MMP-2 versus presencia de metástasis.

El área bajo la curva fue de 0,623. El punto de corte óptimo se fijó en una concentración de MMP-2 menor o igual a 290,7 ng/mL, para una sensibilidad del 48 % y una especificidad del 78,6%. Con este punto de corte obtenemos que 12 pacientes con metástasis ganglionares tenían valores inferiores o iguales, mientras que otros 3 con valores inferiores no las presentaron. El VPP fue del 80%, y el VPN del 45,8%.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-2 de pacientes con metástasis (media 330,0; IC: 284,2-375,8) frente a las que no las presentaron (media 401,3; IC: 299,2-503,5), siendo  $p = 0,1292$ .

Los valores de MMP-2 en función del estadio se pueden ver en la figura 48. Las concentraciones medias (ng/mL) por estadios fueron para I: 283,9; II: 454,9; III: 339,4 y IV: 335,8. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-2 en función del estadio ( $p = 0,210$ ).

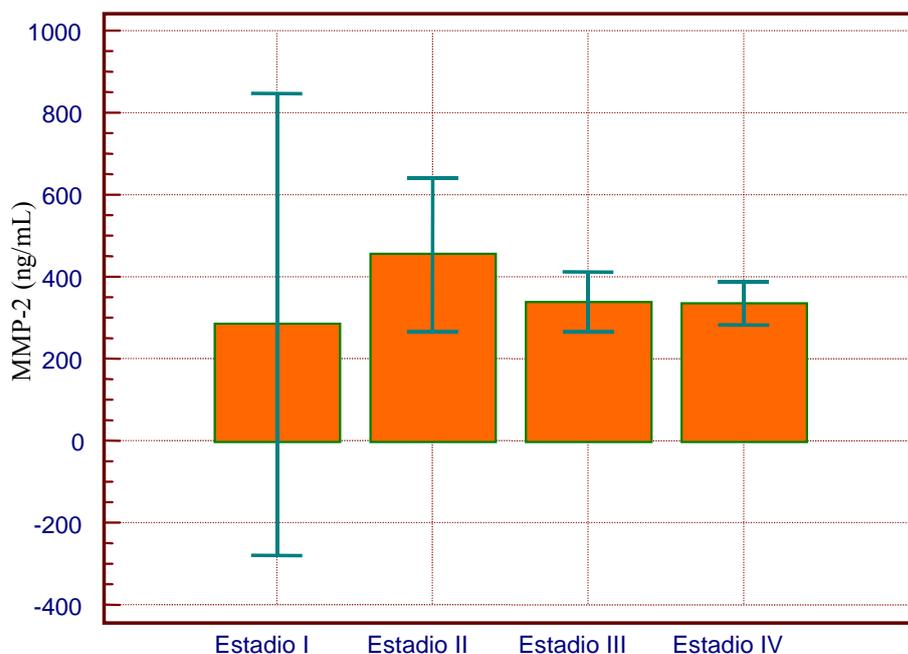


Figura 48. MMP-2 y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

En la figura 49 se muestra la distribución de los niveles de MMP-2 en función de la localización del tumor.

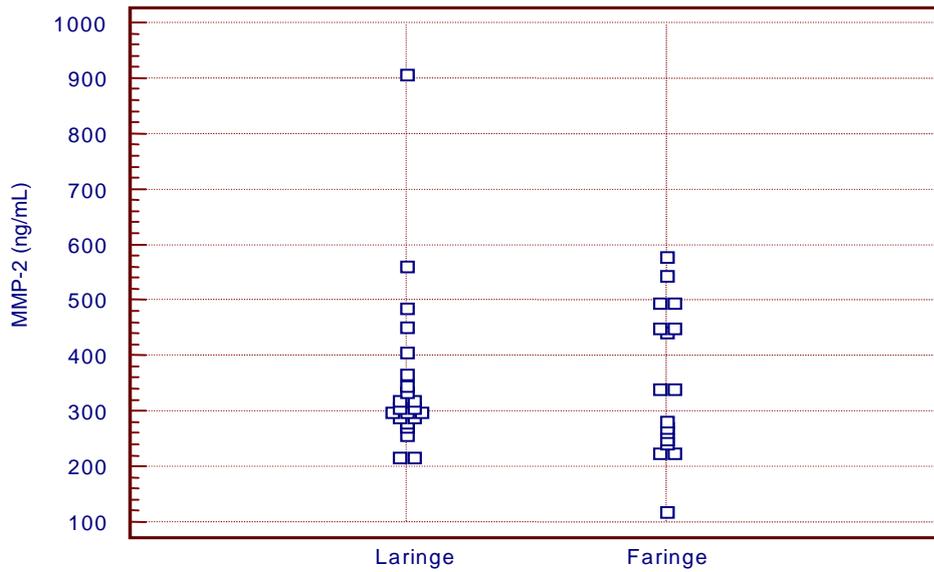


Figura 49. Distribución niveles de MMP-2 (ng/mL) en función de la localización.

La concentración de MMP-2 en tumores laríngeos (media 356,6; IC: 290,9-422,2) fue similar a la de los tumores faríngeos (media 354,4; IC: 285,6-423,2), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en estos niveles ( $p = 0,9622$ ).

En la figura 50 se muestran los valores de MMP-2 según el grado de diferenciación histológico.

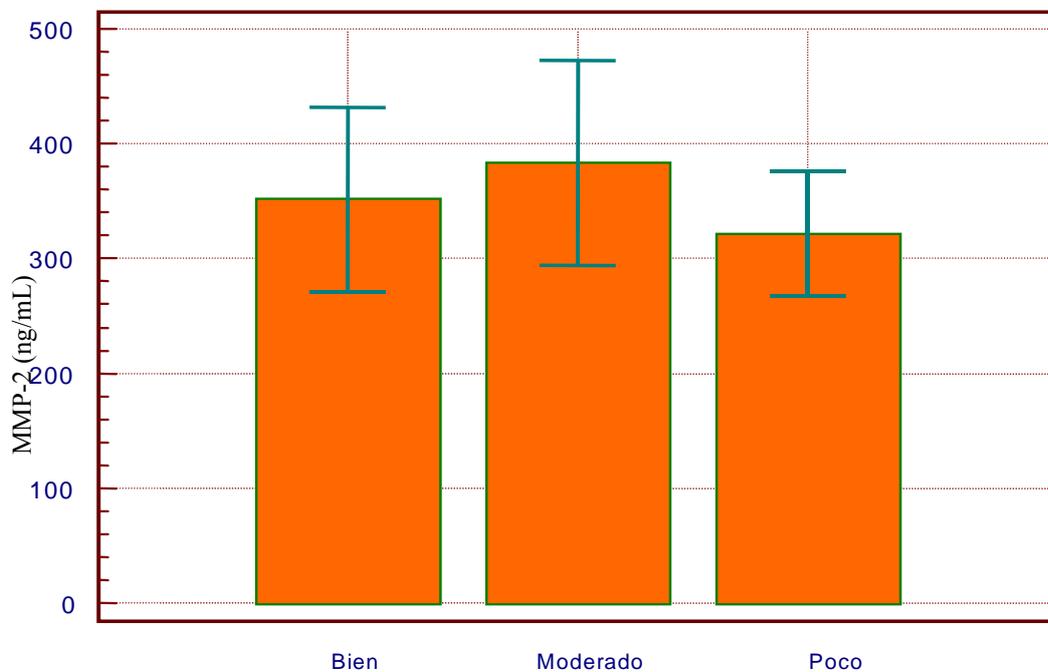


Figura 50. Niveles medios de MMP-2 y grado de diferenciación histológico (barras de error de la media para IC del 95%).

La concentración media de MMP-2 fue superior en los pacientes con tumores moderadamente diferenciados (383,7 ng/mL), en relación con los poco (321,7 ng/mL) y bien diferenciados (351,6 ng/mL), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,497$ ).

En la figura 51 se observa la curva de supervivencia según la concentración de MMP-2, utilizando como punto de corte 290,7 ng/mL. Se observa una menor supervivencia en los pacientes con concentraciones inferiores o iguales al punto de corte, siendo la mediana de la supervivencia de 16 meses, mientras que con valores superiores alcanzó los 35 meses. El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia mostró diferencias estadísticamente significativas para la prueba log Rank ( $\chi^2 = 7,168$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,0074$ ).

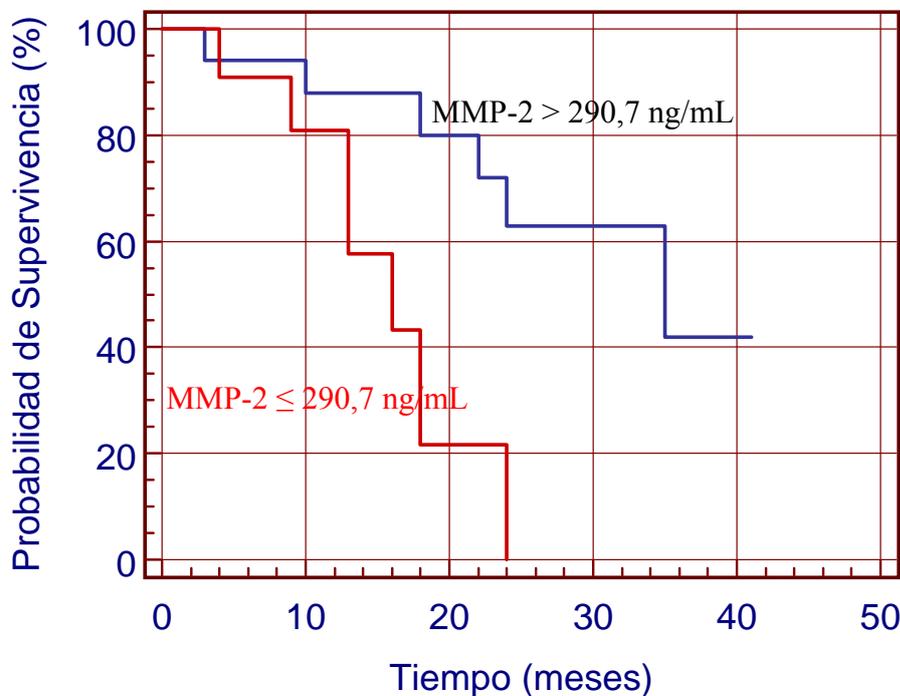


Figura 51. Supervivencia en relación con el punto de corte 290,7 ng/mL para MMP-2.

Como resumen de los resultados de la MMP-2 hay que decir que la sensibilidad para el diagnóstico preoperatorio de las metástasis fue del 48%, la especificidad del 78%, el VPP del 80% y el VPN del 45,8%, aplicando como punto de corte una concentración inferior o igual a 290,7 ng/mL. El área bajo la curva ROC fue de 0,623. Existieron diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes con valores de MMP-2 inferiores o iguales al punto de corte con respecto a valores superiores.

### V.2.5. Metaloproteasa 9 (MMP-9).

#### Descripción.

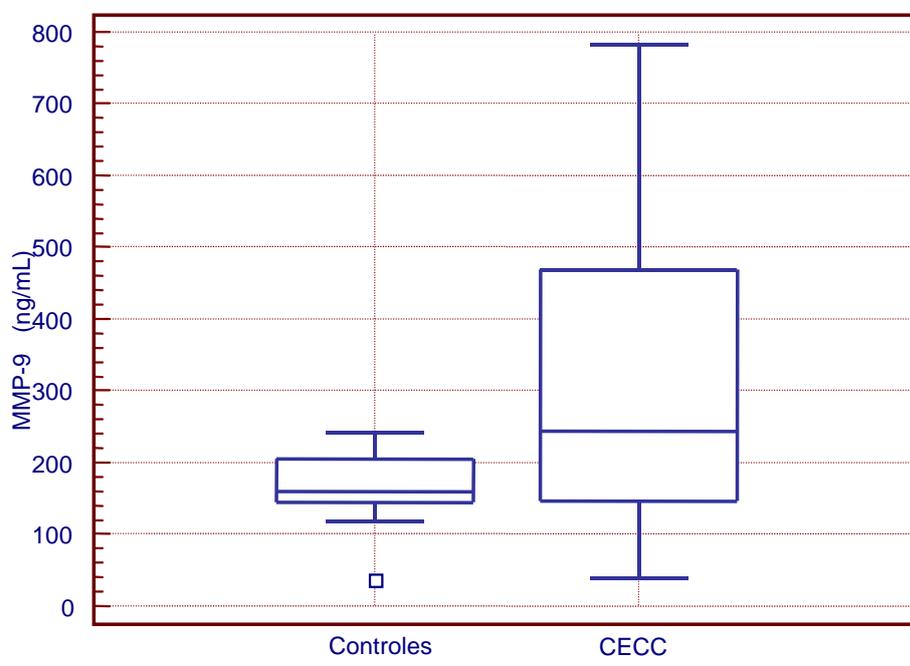
Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n=39) oscilaron entre 38,4-784 ng/mL (media 309,7; mediana 243,2). Aproximadamente dos tercios de los pacientes tuvieron una concentración superior a 200 ng/mL. En el caso de los controles (n=10) se distribuyeron entre 36,8-241,8 ng/mL (media 161,7; mediana 159,9). En la tabla XIII se observa la distribución de estos valores en función de su concentración.

Tabla XIII. Valores séricos de MMP-9 en pacientes con CECC y controles. Punto de corte 200ng/mL.

Concentración MMP-9	Pacientes (%)	Controles (%)
> 200 ng/mL	24(61%)	3(30%)
< 200 ng/mL	15(39%)	7(70%)

La comparación de los valores de MMP-9 entre pacientes (mediana 243,2 ng/mL; IC: 177,8-332,7 ng/mL) y controles (mediana 159,9 ng/mL; IC: 109,1-236,3 ng/mL) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0445$ ).

En las figuras 52 y 53 se representan los niveles comparados de MMP-9.



Figuras 52. Valores de MMP-9 en controles y pacientes. Se muestran valores de media, percentiles (25 y 75) y el rango.



El área bajo la curva fue de 0,603. El punto de corte óptimo se fijó a 473,6 ng/mL para una sensibilidad del 32 % y una especificidad del 92,9%. El VPP para la presencia de metástasis fue del 80%, mientras que el VPN del 41%.

Con este punto de corte obtenemos que 8 pacientes con valores superiores tenían metástasis ganglionares, mientras que 2 no las presentaban.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-9 de pacientes con metástasis (media 345; IC: 247,2-442,7) frente a los que no las presentaron (media 246,6; IC: 160,4-332,9), siendo  $p = 0,1697$ .

Los valores de MMP-9 en función del estadio se pueden ver en la figura 55.

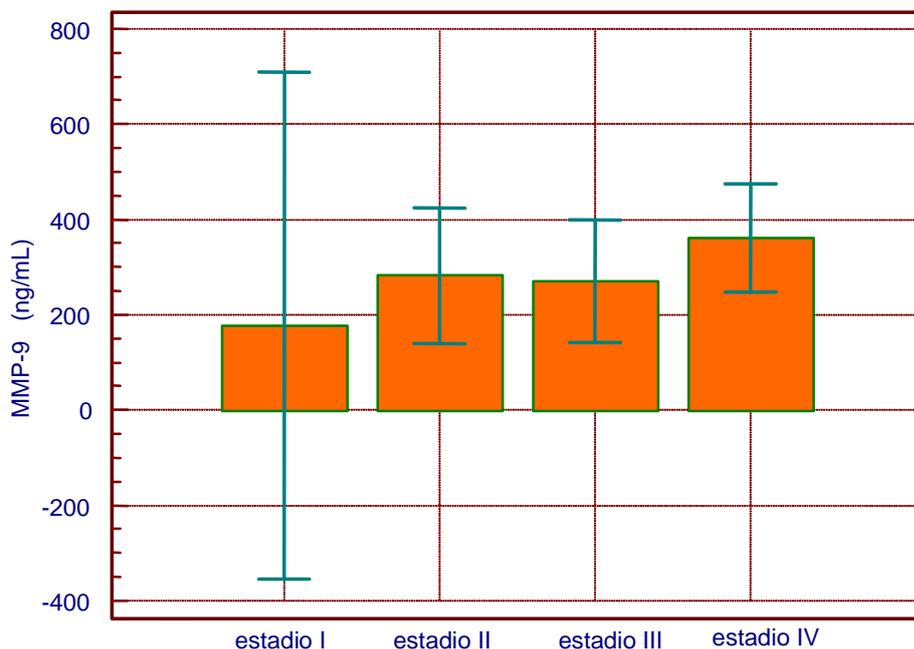


Figura 55. MMP-9 y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

Las concentraciones medias (ng/mL) por estadios fueron para I: 178,4; II: 282,8; III: 269,9 y IV: 361,2. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-9 en función del estadio ( $p = 0,520$ ).

En la figura 56 se muestra la distribución de los niveles de MMP-9 en función de la localización del tumor.

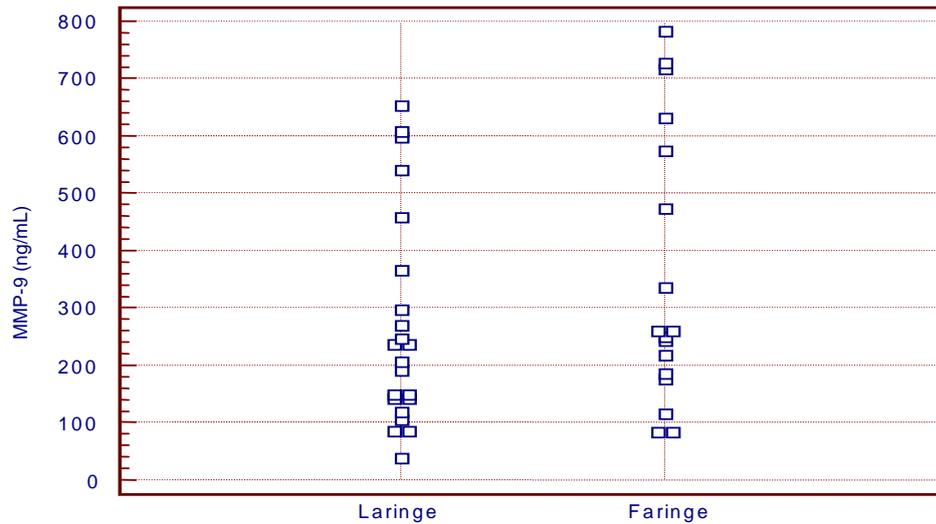


Figura 56. Distribución por puntos de los valores de MMP-9 en función de la localización.

La concentración de MMP-9 en tumores laríngeos (media 270,1; IC: 187,4-352,9) fue similar a la de los tumores faríngeos (media 360,9; IC: 238,1-483,7), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en estos niveles según la localización del tumor ( $p = 0,1904$ ).

En la figura 57 se muestran los valores de MMP-9 según el grado de diferenciación histológico.

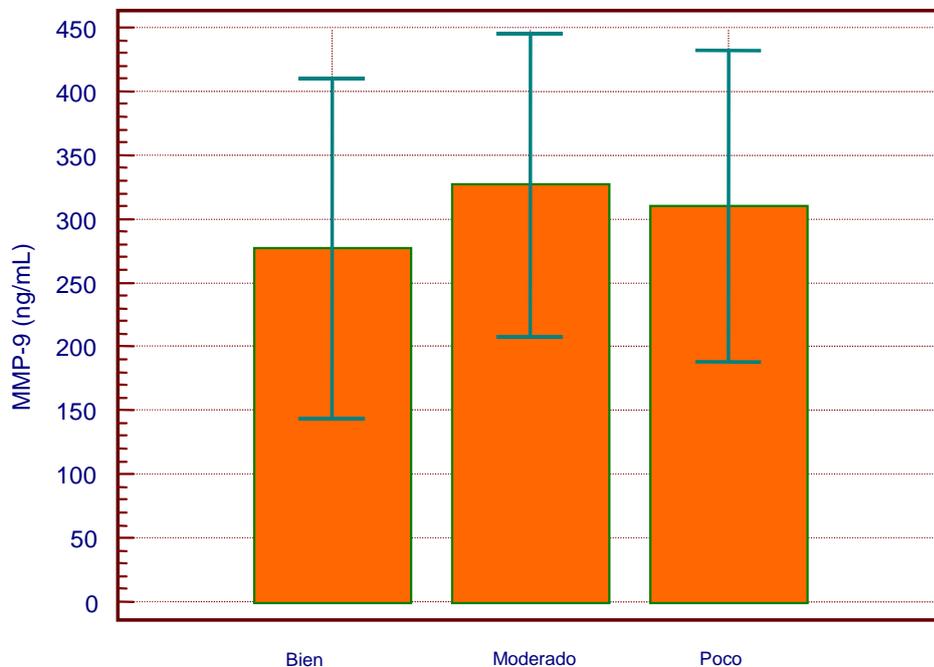


Figura 57. Niveles de MMP-9 y grado de diferenciación tumoral (barras de error de la media para IC del 95%).

La concentración media de MMP-9 fue superior en los pacientes que presentaban tumores moderadamente diferenciados (326,87 ng/mL), en relación con los poco (310,07 ng/mL) y bien diferenciados (276,8 ng/mL), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,856$ ).

En la figura 58 se observa la curva de supervivencia según la concentración de MMP-9, utilizando como punto de corte 473,6 ng/mL. La mediana de supervivencia en los pacientes con valores de MMP-9 superiores al punto de corte fue de 23 meses, mientras que con valores inferiores fue de 24 meses, por tanto muy similar. El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas para la prueba log Rank ( $\chi^2 = 0,046$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,946$ ).

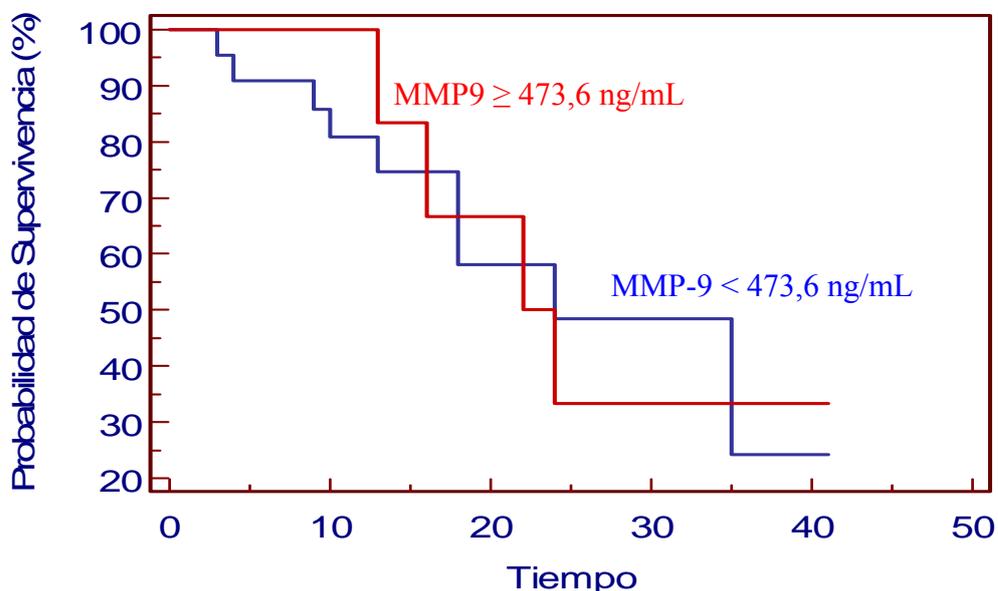


Figura 58. Supervivencia en relación al punto de corte 473,6 para MMP-9.

Como resumen de los resultados de la MMP-9 hay que decir que la sensibilidad para el diagnóstico preoperatorio de las metástasis fue del 32%, la especificidad del 92,9%, el VPP del 80% y el VPN del 41%, aplicando como punto de corte una concentración superior o igual a 473,6 ng/mL. El área bajo la curva ROC fue de 0,603. Los niveles de MMP-9 que presentaron los pacientes con CECC fueron superiores a las de los controles, siendo esta diferencia significativa. El resto de las variables no mostró valores significativos.

### V.2.6. Metaloproteasa 13 activada (MMP-13 activada).

#### Descripción.

Los niveles séricos para los pacientes con CECC (n=39) oscilaron entre 436,65-2096,85 pg/mL (media 679,10; mediana 648,12). En el caso de los controles (n=10) se distribuyeron entre 345,54-691,20 pg/mL (media 533,67; mediana 531,49).

En la tabla XIV se observa la distribución de estos valores en función de su concentración.

Tabla XIV. Valores séricos de MMP-13 activada en pacientes con CECC y controles. Punto de corte 600 pg/mL.

Concentración MMP-13 activada	Pacientes (%)	Controles (%)
> 600 pg/mL	25(64%)	3(30%)
< 600 ng/mL	14(36%)	7(70%)

La comparación de los valores entre pacientes (mediana 648,12; IC: 597,39-688,70) y controles (mediana 534,49; IC: 349,06-678,99) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0151$ ). En las figuras 59 y 60 se representan los niveles comparados de MMP-13 activada.

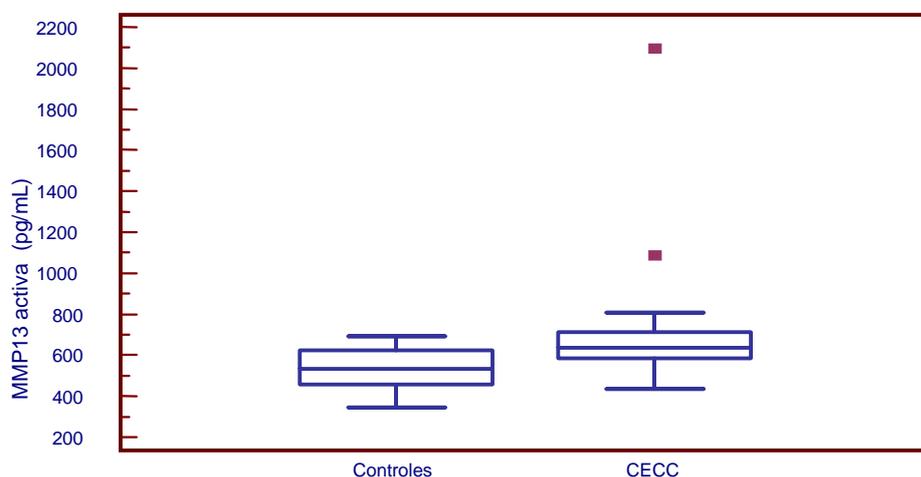


Figura 59. Valores de MMP-13 activada en controles y pacientes. Se muestran valores de media, percentiles (25 y 75) y el rango.

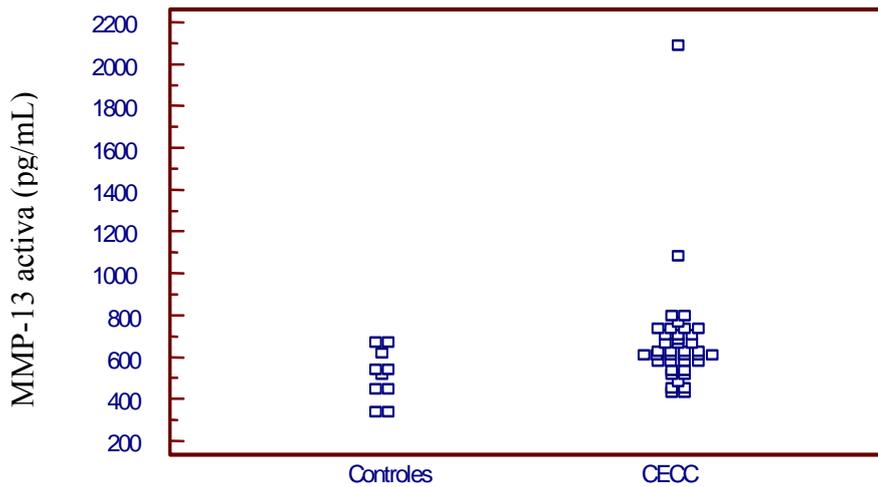


Figura 60. Dispersión por puntos de los valores de MMP-13 activa en controles y pacientes. MMP-13 activada (pg/mL)

### Correlación con variables clínicas.

En la figura 61 se muestra el análisis ROC de MMP-13 frente a la presencia de metástasis ganglionares.

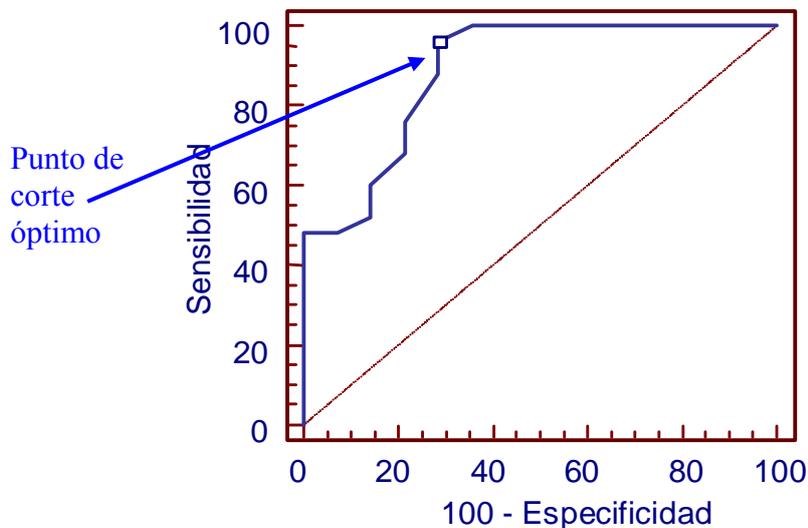


Figura 61. Curva ROC para MMP-13 activa versus presencia de metástasis.

El área bajo la curva fue de 0,887. El punto de corte óptimo se fijó en 585,15 pg/mL, para una sensibilidad del 96 % y una especificidad del 71,4%. El VPP para detectar metástasis ganglionares fue del 86%, mientras que el VPN del 90%. Un total de 25 pacientes con valores superiores al punto de corte presentaron metástasis, por 4 que no. Todos los pacientes con valores superiores a 689,76 pg/mL tenían metástasis ganglionares. En este caso sí existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0001$ ) entre los niveles

de MMP-13 de los pacientes con metástasis (mediana 679,63; IC: 628,6-742,6) frente a los que no las presentaron (mediana 536,62; IC: 461,3-640,7).

Los valores de MMP-13 activada en función del estadio tumoral se pueden ver en la figura 62.

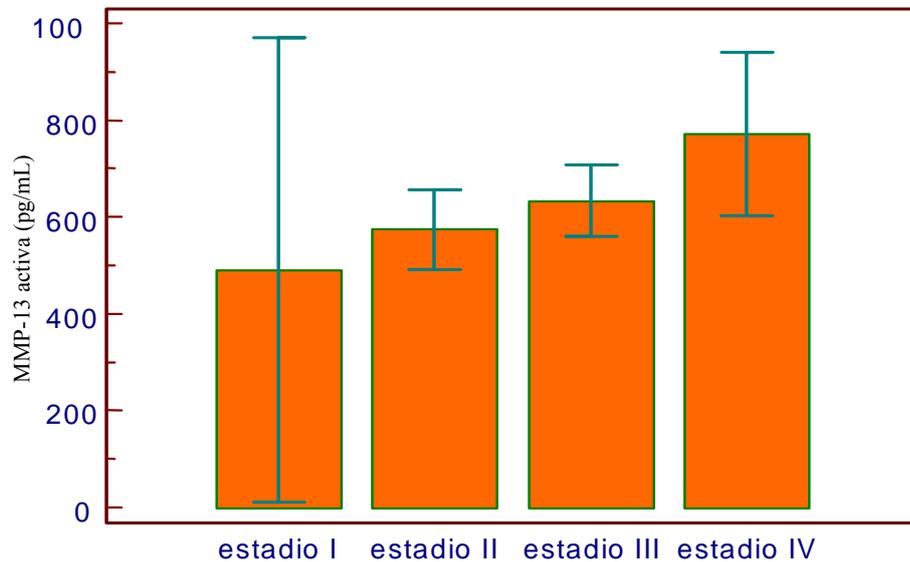


Figura 62. MMP-13 activa y estadio tumoral (barras de error de la media para IC del 95%)

Las concentraciones medias (pg/mL) por estadios fueron para I: 490; II: 574,4; III: 632,9 y IV: 771,6. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de MMP-13 activa en función del estadio ( $p = 0,192$ ).

Los valores de MMP-13 activada en función de la localización del tumor se representan en la figura 63.

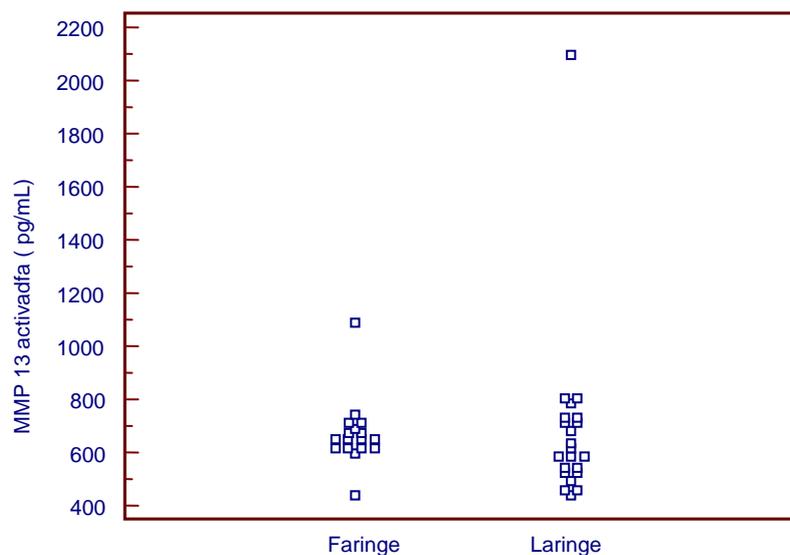


Figura 63. Distribución niveles de MPP-13 activada en función de la localización.

La concentración de MMP-13 activa en tumores laríngeos (mediana 605,04; IC: 533,2-727,9) fue similar a la de los tumores faríngeos (mediana 648,12; IC: 616,6-704,3) pg/mL), no existiendo diferencias estadísticamente significativas en estos niveles según la localización del tumor ( $p = 0,3427$ ).

En la figura 64 se muestran los valores de MMP-13 activada según el grado de diferenciación histológico.

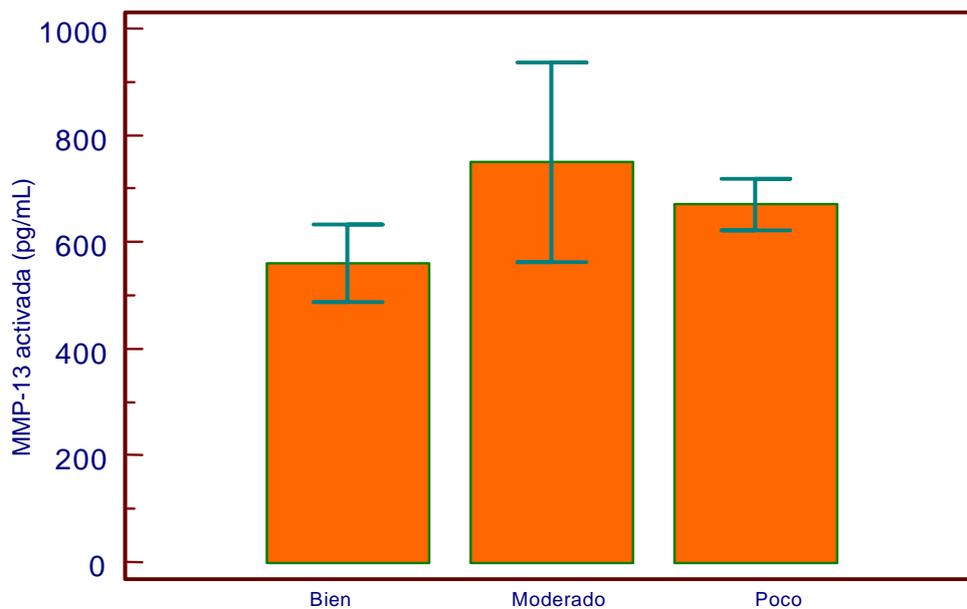


Figura 64. Niveles de MMP-13 activada y grado de diferenciación histológico (barras de error de la media para IC del 95%).

La concentración media de MMP-13 activada fue superior en los pacientes con tumores moderadamente diferenciados (749,7 pg/mL), en relación con los poco (669,9 pg/mL) y bien diferenciados (558,9 pg/mL), no existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,213$ ).

En la figura 65 se observa la curva de supervivencia según la concentración de MMP-13 activada, utilizando como punto de corte 585,15 pg/mL. La mediana de la supervivencia de los pacientes con concentraciones de MMP-13 activada superiores al punto de corte fue de 24 meses, mientras que con valores inferiores fue de 13 meses. Sólo 4 pacientes presentaron concentraciones inferiores al punto de corte, de ahí el escaso número de datos en esa curva de supervivencia. El estudio comparativo de ambas curvas de supervivencia no mostró diferencias estadísticamente significativas para la prueba log Rank ( $\chi^2 = 2,6347$ ;  $gl = 1$ ;  $p = 0,1045$ ).

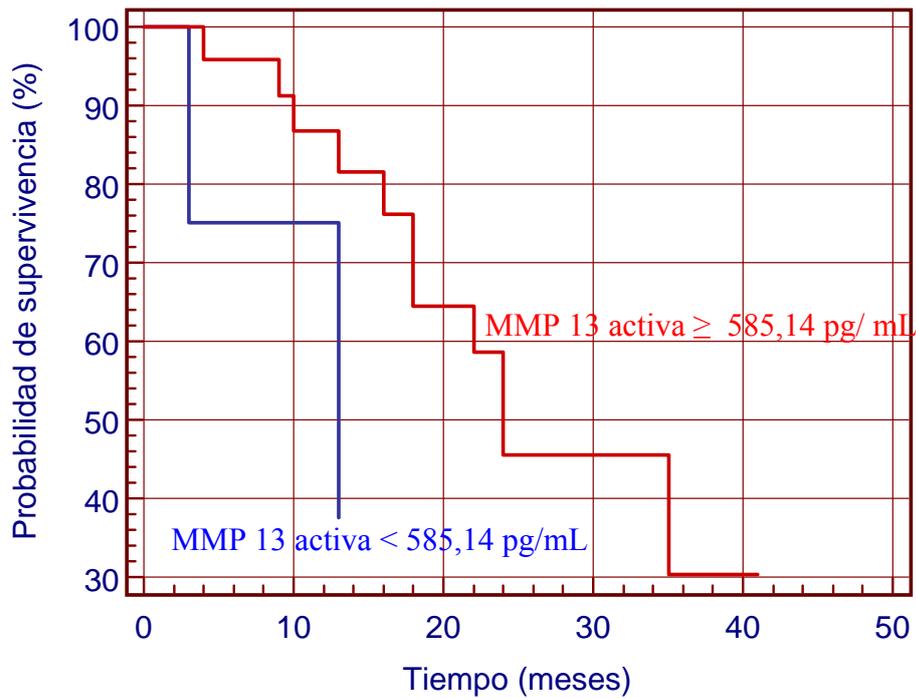


Figura 65. Supervivencia en relación con el punto de corte 585,14 pg/mL para MMP-13 activada.

En el resumen de los resultados para MMP-13 activa, la sensibilidad para el diagnóstico de metástasis ganglionares fue del 96%, la especificidad del 71.4%, el VPP del 86% y el VPN del 90%. El área bajo la curva ROC fue de 0,887. Hubo diferencias significativas entre los controles y pacientes con CECC ( $p = 0,0151$ ).

También existieron diferencias significativas en el valor de MMP-13 activada entre los pacientes con metástasis ganglionares y los que no las presentaron ( $p = 0,0001$ ).

### V.2.7. Anticuerpos anti-p53 (Ac anti-p53).

#### Descripción.

Su presencia en suero se muestra de forma cualitativa, considerando positivos aquellos que presentaron una absorbancia mayor a la del punto de corte, según las especificaciones del fabricante.

Los resultados de los pacientes y controles se muestran en la tabla XV.

Tabla XV. Valores séricos Ac anti-p53 en pacientes con CECC y controles.

Ac anti-p53	Pacientes (%)	Controles (%)
Positivo	13 (33%)	0 (0%)
Negativo	26 (77%)	10 (100%)

El valor de  $\chi^2$  fue de 2,99, observando diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles ( $p = 0,030$ ).

#### Correlación con variables clínicas.

Se comparó el resultado de la prueba con la presencia de metástasis. En la tabla XVI se exponen estos resultados.

Tabla XVI. Valores séricos de los Ac anti-p53 en función de la presencia de metástasis.

Metástasis \ Anti-p53	Negativo	Positivo	Total (%)
No	14	0	14 (35,9%)
Sí	12	13	25 (64,1%)
Total (%)	26 (66,7%)	13 (33,3%)	39 (100%)

No encontramos ningún paciente sin metástasis que tuviese Ac anti-p53, aunque hubo 12 pacientes con metástasis en los que no se detectaron anticuerpos séricos. La sensibilidad de la prueba para el diagnóstico de las metástasis fue del 48% y la especificidad del 100%. El VPP fue del 100% y el VPN del 53,8%. El valor de  $\chi^2$  fue 8,705, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0032$ ).

En la tabla XVII se muestran los resultados encontrados al comparar la localización tumoral con la presencia de Ac anti-p53 .

Tabla XVII. Valores séricos de los Ac anti-p53 en función de la localización.

Localización \ Anti p53	Negativo	Positivo	Total (%)
Faringe	8	9	17 (43,6%)
Laringe	18	4	22 (56,4%)
Total (%)	26 (66,7%)	13 (33,3%)	39 (100%)

El valor de  $\chi^2$  fue de 3,767, no encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0523$ ; OR 5,06; 95% IC: 0,99-28,1), aunque se observa mayor frecuencia de resultados negativos en los tumores laríngeos.

En la tabla XVIII se muestran los resultados de comparar los estadios de la enfermedad con la presencia de Ac anti-p53, agrupando los estadios precoces (I y II) y los más avanzados (III y IV).

Tabla XVIII. Valores séricos de los Ac anti-p53 en función del estadio.

Estadio \ Anti p53	Negativo	Positivo	Total (%)
Estadios I-II	9	0	9 (23,1%)
Estadios III-IV	17	13	30 (76,9%)
Total (%)	26 (66,7%)	13 (33,3%)	39 (100%)

No se observaron Ac anti-p53 en los estadios precoces, siendo exclusivos de los estadios más avanzados.

El valor de  $\chi^2$  fue 4,062 encontrando diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0,0438$ ).

En la tabla XIX se muestran los resultados al comparar el grado de diferenciación y la presencia de Ac anti p53.

Tabla XIX. Valores séricos de los Ac anti-p53 en función del grado de diferenciación.

Diferenciación \ Ac anti-p53	Negativo	Positivo	Total (%)
Poco	7	6	11 (33,3%)
Moderado	11	6	17 (43,6%)
Bien	8	1	9 (23,1%)
Total (%)	26 (66,6%)	13 (33,3%)	39 (100%)

El valor de  $\chi^2$  fue de 2,991 (gl = 2), no observando diferencias estadísticamente significativas (p = 0,2241).

En la figura 66 se muestra la curva de supervivencia en función de la presencia o ausencia de Ac anti-p53 en suero. La mediana de la supervivencia de los pacientes sin Ac anti-p53 séricos fue de 35 meses, mientras que si los tenían se reducía a 17 meses. Estos resultados eran estadísticamente significativos para la prueba log Rank ( $\chi^2 = 5,28$ ; gl = 1; p = 0,0216).

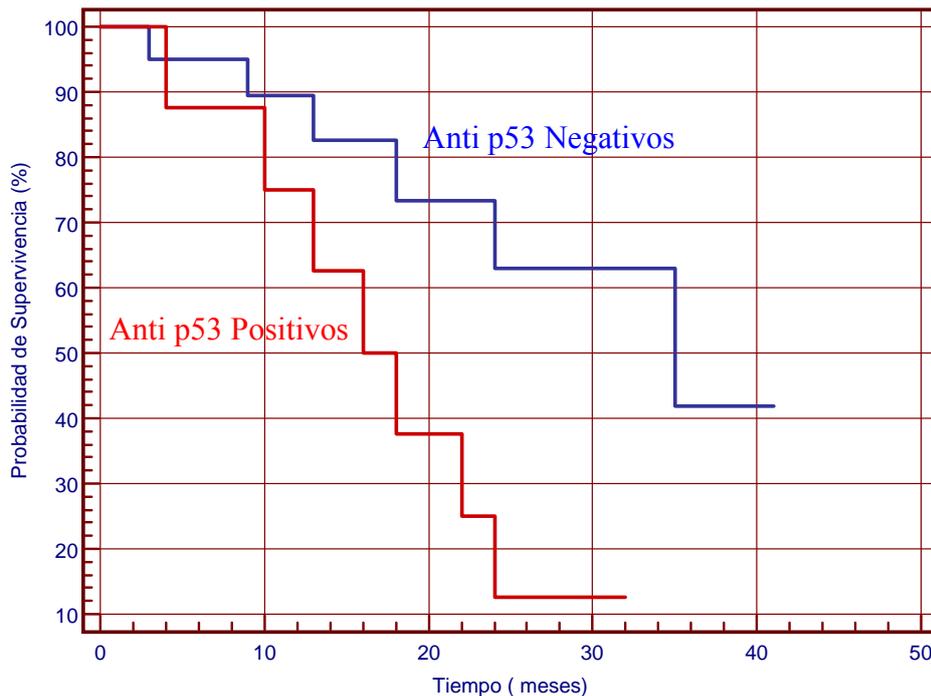


Figura 66. Supervivencia en relación con la presencia o ausencia de Ac anti-p53.

Como resumen de los Ac anti-p53 hay que resaltar que la sensibilidad para el diagnóstico de metástasis fue del 48% y la especificidad del 100%. EL VPP fue del 100% y el VPN del 53%. Existieron diferencias significativas entre controles y pacientes. Hubo también diferencias significativas entre su positividad y la presencia de metástasis, estadios avanzados y menor supervivencia.

### V.2.8. Análisis multimarcaador.

Para obtener mayor información sobre la presencia de metástasis ganglionares se realizó un análisis de todos los marcadores en conjunto, para establecer un perfil que aumente su potencial y resolución.

En un **primer paso** se compararon los diferentes marcadores de metástasis mediante el estadístico U de Mann-Whitney. En la tabla XX se muestran los valores de p de cada marcador y la puntuación obtenida con el test para predecir las metástasis.

Tabla XX. Resultados de cada marcador en función de la presencia de metástasis (U de Mann-Whitney).

Marcadores	Puntuación	Grado de libertad	Significación
SCC	1,137	1	,286
CYFRA 21.1	,725	1	,394
E-cadherina	,029	1	,864
MMP-2	2,384	1	,123
MMP-9	1,963	1	,161
MMP-13	5,722	1	<b>,017</b>
Anti-p53	10,920	1	<b>,001</b>
Estadísticos globales	17,420	7	,015

Se marcaron en rojo las dos únicas variables con suficiente potencial diagnóstico, los Ac anti-p53 y la MMP-13 activada, al tener valores de p iguales a 0,001 y 0,017, respectivamente.

A continuación, en un **segundo paso**, mediante regresión logística binaria por el método de introducir, se define una ecuación que determina cual de los dos marcadores tiene mayor potencial para predecir las metástasis (variable dependiente) (Tabla XXI).

Tabla XXI. Valores de Ac anti-p53 y MMP-13 frente a la presencia de metástasis (Regresión logística binaria).

	B	Error estándar	gl	Significación	I.C. 95,0% para XP(B)	
					Inferior	Superior
MMP-13	,019	,007	1	,011	1,004	1,034
Anti-p53	20,443	10385,621	1	,998	,000	.
Constante	-11,860	4,637	1	,011		

Obtenemos así las variables de la ecuación genérica  $Z = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + \dots$

Donde  $Z = B_0$  (constante) +  $B_1$  (factor del marcador 1) $X_1$ + $B_2$  (factor del marcador 2) $X_2$ ....

Los datos obtenidos se sustituyen en la ecuación:

$$Z = -11,86 + 0,019 X_1 + 20,443 X_2$$

Donde  $X_1$  es el resultado de la prueba Ac anti-p53 y  $X_2$  el valor sérico de MMP-13 activada.

La probabilidad de metástasis ganglionar se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Probabilidad de metástasis} = \frac{e^Z}{1 + e^Z}$$

En la tabla XXII se muestra la probabilidad de metástasis para distintos posibles valores de MMP-13 activada en función de la positividad o negatividad de Ac anti-p53, teniendo en cuenta que la probabilidad para metástasis era del 100 % con los Ac anti-p53 positivos.

Tabla XXII. Probabilidad de metástasis calculada en función de los valores de MMP-13 y Ac anti-p53.

MMP-13 (pg/mL)	Anti-p53	Probabilidad (%)
300	NEG	0,211
325	NEG	0,339
350	NEG	0,543
375	NEG	0,871
400	NEG	1,393
425	NEG	2,220
450	NEG	3,523
475	NEG	5,546
500	NEG	8,627
525	NEG	13,182
550	NEG	19,623
575	NEG	28,191
600	NEG	38,699
625	NEG	50,375
650	NEG	62,011
<b>685</b>	<b>NEG</b>	<b>76,042</b>
700	NEG	80,845
725	NEG	87,158
750	NEG	91,606
775	NEG	94,609
800	NEG	96,578
825	NEG	97,844

MMP-13 (pg/mL)	Anti-p53	Probabilidad(%)
300	POS	100,000
325	POS	100,000
350	POS	100,000
375	POS	100,000
400	POS	100,000
425	POS	100,000
450	POS	100,000
475	POS	100,000
500	POS	100,000
525	POS	100,000
550	POS	100,000
575	POS	100,000
600	POS	100,000
625	POS	100,000
650	POS	100,000
685	POS	100,000
700	POS	100,000
725	POS	100,000
750	POS	100,000
775	POS	100,000
800	POS	100,000
825	POS	100,000

A continuación, se sustituyeron los valores de los Ac anti-p53 y MMP-13 activada de los 39 pacientes como valores de  $X_1$  y  $X_2$  obteniendo los valores de  $Z$  de cada paciente. De esta manera obtenemos una **curva ROC** de frecuencia acumulada de las dos variables juntas ( $Z$ ) en relación a las metástasis ganglionares (Figura 67).

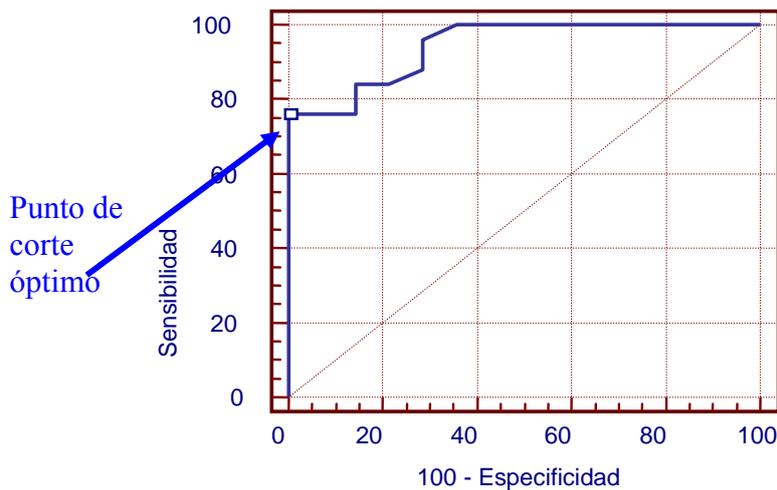


Figura 67. Curva ROC para los valores de  $Z$  (Ac anti-p53 +MMP13 activada) versus presencia metástasis ganglionares.

El área bajo la curva fue de 0,943, con un error estándar de 0,036. El punto de corte óptimo se fijó para un valor de  $z$  superior a 0,76; para una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100%. Se observó que para la probabilidad del 76% (Tabla XXII, valor en rojo) se obtendrían las mejores sensibilidades y especificidades. El punto más cercano al 76% lo obtenemos con los Ac anti-p53 negativos y una concentración de MMP-13 de 685 pg/mL, considerando positivos los valores de  $Z$  superiores a 0,76.

El análisis comparativo de las tablas de frecuencia de los Ac anti-p53 solos (Tabla XVI) con los Ac anti-p53 + MMP-13 activada (Tabla XXIII), muestran una prueba  $\chi^2$  que tomó un valor de 17,818 ( $p = 0,0001$ ) siendo estadísticamente significativa. Los resultados obtenidos con la prueba de Ac anti p53 solos que tenían una sensibilidad de 48%, especificidad de 100%, VPP de 100% y VPN de 53%, mejoran su rendimiento cuando le asociamos MMP-13 llegando a una sensibilidad de 76%, especificidad de 100%, VPP de 100% y VPN de 70%. De esta manera conjunta mejoramos el diagnóstico de verdaderos positivos (pasamos de 13 a 19), disminuimos los falsos negativos (pasamos de 12 a 6).

Tabla XXIII. Ac anti-p53 + MMP-13 activada y presencia de metástasis ganglionares.

Metástasis\ Anti-p53+MMP13	Negativo	Positivo	Total (%)
No	14	0	14 (35,9%)
Sí	6 ( <del>6</del> )	19 ( <del>16</del> )	25 (64,1%)
Total (%)	19 (51,3%)	20 (48,7%)	39 (100%)

Como resumen del estudio multimarcaador con Ac anti-p53+MMP-13 (utilizando un valor de corte de  $z > 0,76$ ) hay que resaltar que la sensibilidad para el diagnóstico de metástasis fue del 76% y la especificidad del 100%. EL VPP fue del 100% y el VPN del 70%. Existieron diferencias significativas entre los Ac antip53 solos y asociados con MMP-13. Por último, en la tabla XXIV se muestran los resultados de manera resumida.

TablaXXIV. Resumen del potencial diagnóstico de la presencia de metástasis mostrado por cada marcaador.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN	ABC	P de corte
AgSCC	20	100	71	37	0,530	>2,7ng/mL
CYFRA21.1	96	35,7	70	80	0,620	>0,5ng/mL
E-cadherina	56	71,4	73	45	0,571	>2,56µg/mL
MMP-2	48	78,6	80	45,8	0,623	≤290,7ng/mL
MMP-9	32	92,9	80	41	0,603	≥ 473,6 ng/mL
MMP-13 activa	96	71,4	86	90	0,887	≥585,15 pg/mL
Ac anti p53	48	100	100	53,8	-	-
Anti p53 + MMP-13	76	100	100	68	0,943	Z > 0,76

## **VI. DISCUSIÓN**

## VI. DISCUSIÓN

La discusión se realizará sobre los resultados obtenidos, haciendo un contraste con los datos ya publicados, para posteriormente hacer una interpretación final de los mismos. De esa interpretación se obtendrán las conclusiones.

### VI.1. ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

El estudio de estas variables clínicas en un número limitado de CECC no pretende establecer resultados de tipo epidemiológico, sino definir la muestra estudiada y comprobar que se ajusta a las características descritas para estos tumores en series más amplias. El CECC afecta predominantemente a varones y es poco frecuente en mujeres, como observamos en nuestra serie en la que sólo estudiamos a dos mujeres. Hay factores de riesgo estrechamente asociados a su desarrollo como son el consumo de tabaco y alcohol. El 97% de nuestros pacientes eran fumadores y el 89% consumidores de alcohol, siendo una neoplasia casi exclusiva de pacientes con estos hábitos como ha sido bien descrito en artículos previos.<sup>7,8</sup>

En nuestra área geográfica la localización anatómica de estos tumores afecta más a la laringe, por el mayor número de tumores supraglóticos, teniendo la faringe una frecuencia ligeramente menor<sup>1,2</sup>. Nuestra serie también cumple este criterio como observamos en la tabla V.

La mayoría de los pacientes estudiados tenían tumores avanzados, con el 77% en estadios III-IV, presentando un gran número de ellos metástasis ganglionares (64%) (Tabla VI). Estas circunstancias también condicionaron que el 54 % de los pacientes recibiesen radioterapia postquirúrgica.

El grado histológico también está dentro de lo descrito en los CECC con predominio de los moderadamente diferenciados, aunque la dispersión de la muestra hace que este dato casi no tenga valor.

La supervivencia fue similar a lo publicado en estas neoplasias si consideramos el estadio avanzado y la categoría N. Se exhiben tendencias que nos hacen considerar a los pacientes con estadios avanzados (III-IV), metástasis ganglionares (N+) y que recibieron radioterapia, con peor supervivencia, aunque sin alcanzar significación estadística. Sí alcanzó este valor la localización faríngea con respecto a la laríngea (figura 23). Otros autores encuentran significativos estos datos, sobre todo en relación al estadio y, sobre todo, a la presencia de metástasis ganglionares, pero presentando series más amplias<sup>127,128</sup>. Acerca de estas variables podemos decir que se ajustan a lo esperado y exhiben las tendencias habituales en los CECC. Probablemente no alcanzan valores estadísticamente

significativos al ser una muestra reducida, pero si aumentásemos el número de casos podría confirmarse esa tendencia.

## VI.2. ASPECTOS ANALÍTICOS

### VI.2.1. *Antígeno de células escamosas (AgSCC).*

En nuestro estudio no existen diferencias entre el valor de AgSCC en pacientes y controles, quizás por el tamaño de la muestra, aunque trabajos publicados recientemente recogen datos en igual sentido, no encontrando valores significativos de AgSCC en tumores laríngeos<sup>129</sup>. Nuestros resultados tampoco son rentables para predecir la presencia de metástasis ganglionares, como también ha sido anteriormente publicado<sup>130</sup>. Sin embargo, otros autores sí correlacionan la elevación de AgSCC con la presencia de metástasis ganglionares (N0 vs N2 y N1 vs N2)<sup>129</sup>. En recientes estudios de CECC ya se había observado que el SCC no tenía utilidad diagnóstica<sup>129</sup>. A pesar de estos datos negativos, se recomienda disponer de un valor de referencia inicial para compararlo con otro obtenido durante el seguimiento, con vistas a detectar recidivas precoces<sup>131</sup>.

El AgSCC muestra, aunque no sea de manera significativa, una tendencia a aumentar en función del estadio, que se hace más evidente en el estadio IV (figura 27). Este dato ya había sido recogido en la bibliografía, al encontrar mayores concentraciones de AgSCC a medida que aumenta el tamaño tumoral aumentaba y la presencia de metástasis era más frecuente<sup>132</sup>.

La concentración de AgSCC según el grado histológico fue superior en los tumores menos diferenciados, con unos valores próximos a la significación estadística (figura 29). Así, concentraciones séricas elevadas de AgSCC se relacionarían con menor grado de diferenciación y, por lo tanto, con tumores más agresivos. Estudios previos describen resultados en este sentido, relacionando la presencia de valores séricos elevados de SCC en tumores con bajo grado de diferenciación<sup>133</sup>.

La localización del tumor no estuvo relacionada con una variación significativa de los niveles de AgSCC y la información que nos brinda su determinación es nula a este respecto. No encontramos bibliografía que relacione los niveles de AgSCC y el origen tumoral.

En nuestro estudio la supervivencia de los pacientes no registró cambios significativos en relación a la concentración de SCC, como habían demostrado también otros autores en relación con otros marcadores<sup>130</sup>. Es paradójico que el SCC no aporte datos que relacionen el incremento de sus valores con la supervivencia, cuando sí se observa esta tendencia en relación al estadio tumoral (figura 27). No obstante, recordamos que esta variable clínica

tampoco alcanzó diferencias estadísticamente significativas en nuestra serie (figuras 20 y 30).

Un hecho que puede tener cierto interés es que todos los pacientes estudiados con valores inferiores a 1,5 ng/mL tuvieron al menos un período libre de enfermedad de 10 meses (Anexos I y II), dato que puede ser útil para la planificar su seguimiento. También observamos que los pacientes con concentraciones de SCC superiores a 6 ng/mL tuvieron una pésima evolución (Anexos I y II), siendo estos datos concordantes con los de otros autores que afirman su utilidad para detectar recidivas durante el seguimiento del paciente<sup>131,134</sup>.

Podemos resumir que, según nuestros datos y el contraste con lo reflejado en la bibliografía, el SCC no parece que tiene valor diagnóstico en las metástasis ganglionares. Podría tener interés en el seguimiento de los pacientes, cuando se constata un incremento en sus valores, pero nosotros no lo hemos demostrado. Por último, los niveles de SCC tienen tendencia a aumentar en tumores avanzados y poco diferenciados, pero sin alcanzar diferencias significativas.

#### VI.2.2. CIFRA 21.1.

Nuestros resultados muestran la existencia de diferencias significativas para CYFRA 21.1 entre pacientes y controles (Figura32), como también ha sido visto por otros autores en tumores laríngeos o en series más amplias de CECC<sup>135,136</sup>. Por tanto, el aumento de este marcador entre pacientes y controles se puede establecer como un dato bien consolidado en los CECC<sup>137</sup>.

No se observaron diferencias significativas entre los niveles CIFRA 21.1 y la presencia de metástasis ganglionares, siendo un marcador sensible (96%) pero poco específico (35%) para valores superiores a 0,5 ng/ml. El establecer un punto de corte en los marcadores tumorales puede ser especialmente difícil en situaciones como ésta en la que el rango de valores preoperatorios de CYFRA 21.1 es muy amplio. Algunos autores han tratado de analizar el potencial de este marcador sin establecer puntos de corte, objetivando sólo los cambios en su concentración, en el primer diagnóstico y durante el seguimiento, encontrando que los niveles iniciales no se correlacionan con el tamaño tumoral ni con las metástasis ganglionares. Sin embargo, se produjo un claro aumento de los valores séricos durante el seguimiento, precediendo la aparición de recidivas y metástasis<sup>138</sup>.

Otros estudios confirman la utilidad de este marcador para detectar metástasis a distancia durante el seguimiento, determinándolo de manera preoperatoria, observando que el 70% de los pacientes con valores superiores a 3,3 ng/mL las presentaban posteriormente<sup>139</sup>.

Por el contrario otros autores no dan utilidad clínica al marcador durante la monitorización de la respuesta a la radioterapia<sup>140</sup>.

A la luz de nuestros resultados y de publicado pensamos que sería conveniente ampliar el número de casos a estudio para ver si aumenta la capacidad del marcador como predictor de metástasis, sobre todo en el seguimiento de pacientes, evaluando así su utilidad en la monitorización y en el pronóstico.

Los valores del marcador no aumentaron en nuestro estudio de forma escalonada en función del estadio, pero los niveles más elevados aparecieron en el estadio IV (Figura 34). De esta manera CYFRA 21.1 puede orientar sobre el estadio en el que se encuentra en paciente previamente a la cirugía, si tenemos en cuenta que la mayoría de los estadios IV presentan metástasis ganglionares.

No hubo diferencias en la concentración del MT en función de la localización del tumor, no encontrando datos publicados a este respecto que comparen los tumores faríngeos con los laríngeos.

En el grado histológico observamos diferencias significativas entre las concentraciones de tumores con bajo grado de diferenciación frente a los más diferenciados (Figura 37), como también ha sido visto por otros autores<sup>141</sup>. No obstante, otros estudios no encuentran relación entre los valores del marcador y el grado de diferenciación<sup>142,143</sup>. Serían convenientes estudios con series más amplias para confirmar esta relación entre CYFRA 21.1 con los tumores menos diferenciados.

Tampoco encontramos relación entre el marcador y la supervivencia de los pacientes con CECC. No obstante, en nuestro estudio sólo hubo 6 pacientes con valores superiores a 3 ng/mL, en relación a los que tenían valores inferiores, sin que en ellos se observara peor supervivencia (Anexo II) (Figura 38). En estudios recientes con series muy amplias sí demostraron que la supervivencia y el período libre de enfermedad fue significativamente menor cuando los valores de CIFRA 21.1 eran elevados<sup>144</sup>.

Podemos resumir que, según nuestros datos y el contraste con lo reflejado en la bibliografía, CIFRA 21.1 no tiene valor diagnóstico en las metástasis ganglionares. Presenta valores elevados de forma significativa en tumores poco diferenciados y en estadios avanzados. Aunque no hemos observado relación con la supervivencia, es posible que el número de casos de nuestra serie limite esta interpretación y sea necesario establecer su valoración sistemática preoperatoria en los CECC, para determinar cuales son sus capacidades y limitaciones reales.

### VI.2.3. E-cadherina

En nuestro estudio observamos diferencias significativas entre los valores de pacientes y controles (Figuras 38 y 39). Esto también ha sido visto en tumores de próstata, con diferencias significativas entre controles y pacientes, encontrando los valores más elevados en los casos con metástasis<sup>145</sup>. Sin embargo, no se encontraron datos en la literatura previos a nuestro estudio en cuanto a las concentraciones de séricas de E-cadherina en CECC.

El marcador no fue capaz de determinar la presencia de metástasis ganglionares, pues además de presentar un área bajo curva no óptima, no obtuvo buenas cifras de sensibilidad y especificidad (Tabla XXIV). No obstante, otros estudios sí encuentran utilidad en la E-cadherina para identificar a los pacientes con metástasis en cáncer vesical, realizándose así un tratamiento quirúrgico más extenso<sup>146</sup>. También se ha visto su validez en el seguimiento al predecir las recidivas precoces (3-6 meses) del carcinoma gástrico<sup>147</sup>.

A nivel tisular si se ha visto relación entre la E-cadherina y las metástasis ganglionares en CECC, aunque su mayor expresión se relacionaría con su menor número<sup>148</sup>.

Al tratarse de un marcador poco estudiado en el suero de los pacientes con CECC sería necesario aumentar el número de casos para establecer definitivamente su valor diagnóstico y pronóstico.

Los niveles séricos de E-cadherina no variaron de forma significativa en función del estadio, localización y grado histológico, aunque otros autores encontraron mayores niveles séricos de E-cadherina en tumores vesicales poco diferenciados<sup>149</sup>. Tampoco observamos diferencias significativas en la supervivencia, no existiendo estudios previos en CECC. No obstante, la E-cadherina soluble fue un factor predictor independiente de la supervivencia a largo plazo en el carcinoma gástrico<sup>91</sup>.

Podemos resumir que, según lo observado por nosotros y el contraste con lo publicado, E-cadherina muestra diferencias significativas entre controles y pacientes, y aunque no se ha visto relación con ninguna de las variables clínicas estudiadas, esto contrasta con lo observado en otras localizaciones tumorales y a nivel tisular. Todo esto nos sugiere la necesidad de ampliar el estudio con más casos y establecer una comparación con la expresión inmunohistoquímica en el tejido tumoral.

### VI.2.4. Metaloproteasa 2 (MMP-2).

Nuestro estudio mostró que no hay diferencias significativas entre los valores de MMP-2 entre pacientes y controles, como también ha sido observado por otros autores<sup>150,151</sup>. Los valores de sensibilidad y especificidad de la MMP-2 como marcador frente a metástasis ganglionares fueron bajos (Tabla XXIV). Es llamativo que la MMP-2 se asocia más a

metástasis ganglionares cuando sus valores están por debajo del umbral. Aunque el papel de la MMP-2 en el CECC no está bien definido, con nuestros datos podemos adelantar que su valor como marcador de metástasis es bastante limitado. No obstante, antes de desestimar su utilidad debemos contrastar estos resultados iniciales con estudios de mayor tamaño muestral.

Los valores que hemos obtenido de MMP-2 para estadio, localización y grado histológico, no son significativos, coincidiendo con otros autores<sup>150,152</sup>. Se ha visto asociación de sus niveles séricos con el estadio y las metástasis del cáncer gástrico y hepático, pero en CECC esta asociación no ha sido demostrada<sup>153,154</sup>.

En nuestros pacientes la supervivencia era menor cuando los valores de MMP-2 eran inferiores al punto de corte, en relación a la de los pacientes con concentraciones superiores (Figura 54). Este valor discordante podría ser debido a varias circunstancias. Por un lado el número limitado de casos hace que debamos ser prudentes en su interpretación. Además es posible que la MMP-2 tenga en el CECC menor capacidad para alcanzar la circulación sanguínea, o que predomine en el suero en su forma activada. Estos datos deben ser contrastados con estudios más amplios pues se han descrito muchas variaciones de los niveles de MMP-2 en los pacientes con CECC<sup>155,156</sup>.

Podemos resumir que, según lo observado por nosotros y el contraste con lo publicado, hay pocos estudios y con resultados muy dispares para MMP-2 en CECC. Los niveles bajos del marcador, obtenidos en los pacientes con metástasis ganglionares y supervivencia, deben hacernos reflexionar sobre su valor en el proceso de progresión tumoral. Es necesario confirmar estas tendencias ampliando el número de pacientes. También sería recomendable estudiar en suero la forma activada del marcador y relacionarla con la expresión inmunohistoquímica en el tejido tumoral.

#### *VI.2.5. Metaloproteasa 9 (MMP-9).*

Nuestros resultados muestran que los niveles de MMP-9 eran superiores en los pacientes con CECC respecto a los presentados por los controles, con diferencias significativas, como también se observó en otros estudios<sup>150,151,157</sup> (Figuras 52 y 53).

En el diagnóstico de las metástasis ganglionares la MMP-9 mostró alta especificidad pero baja sensibilidad (Figura 54) en el punto de corte establecido. Hay algunos estudios que sugieren cierta tendencia con las metástasis linfáticas cuando se elevan los valores de MMP-9, aunque sin alcanzar valores significativos<sup>150</sup>. No obstante, somos de la opinión

que debería ser tenida en cuenta en el diseño de un perfil múltiple de MTS por su alta especificidad.

En relación al estadio nuestros resultados muestran que no hubo diferencias significativas, si bien la concentración más elevada correspondió al estadio IV (Figura 55).

Tampoco fue útil en relación con la localización tumoral, ni con el grado histológico de diferenciación, pues los valores de MMP-9 no se modificaron de manera significativa en ninguna de estas variables. Resultados similares han sido publicados recientemente que avalan lo observado por nosotros<sup>158</sup>.

La supervivencia de los pacientes tampoco mostró diferencias significativas en función de los niveles de MMP-9. Los datos publicados en este sentido hasta la fecha son dispares. En un reciente estudio se observó que las determinaciones preoperatorias de MMP-9 mostraban valores significativos en la supervivencia a largo plazo en función de su concentración en pacientes con CECC<sup>158</sup>.

Como resumen de los resultados obtenidos y lo publicado hasta ahora, podemos decir que la MMP-9 podría estar implicada en el desarrollo del CECC, siendo reflejo de ello el aumento de sus niveles séricos con respecto a los controles, alcanzando su mayor valor en los estadios más avanzados. El estudio de series más amplias, así como, el establecimiento de valores de referencia en la población sana serían los siguientes pasos para evaluar la utilidad clínica de este marcador. También sería útil realizar estudios en otros cánceres con el fin de evaluar su potencial discriminatorio con respecto al CECC.

#### *VI.2.6. Metaloproteasa 13 activada (MMP-13 activada)*

Nuestros niveles de MMP-13 activada mostraron diferencias significativas entre pacientes con CECC y controles, este dato refleja un aumento sérico de determinados marcadores de degradación de la matriz extracelular en este tipo de tumores (Figuras 59 y 60). No hemos encontrado referencias bibliográficas a este respecto.

Los valores de MMP-13 activada fueron superiores en pacientes con metástasis ganglionares, de forma significativa. La curva ROC para este marcador ofreció los segundos valores más altos de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de metástasis ganglionares en nuestro estudio (Figura 61). Hasta esta fecha no hay publicados estudios que determinen la concentración sérica de MMP-13 activada en pacientes oncológicos y particularmente en CECC. Sí hemos encontrado algunos trabajos que demuestran mayor expresión tisular de esta metaloproteasa los tumores más invasivos<sup>159</sup> y con mayor incidencia de metástasis ganglionares<sup>160</sup>.

Se ha publicado recientemente que los niveles plasmáticos de MMP-2, MMP-9 en su forma activa y de la MMP-13 están elevados en pacientes con cáncer de próstata, sobre todo en el caso de enfermedad metastático<sup>161</sup>. Además, las determinaciones de MMP-13 fueron las que tuvieron mayor valor diagnóstico. También en pacientes con melanoma metastático la MMP-13 predomina en su forma activa frente a los controles<sup>162</sup>.

El nivel de MMP-13 activada no varió de forma significativa según el estadio. En cambio si pudimos observar que los valores medios de MMP-13 aumentan de forma escalonada a medida que progresaba el estadio tumoral (Figura 62).

No encontramos diferencias significativas entre los niveles de MMP-13 activada y la localización y grado histológico. Esto se ha visto refrendado por estudios inmunohistoquímicos en muestras tisulares de CECC, que tampoco observan diferencias en la expresión de MMP-13 según el grado de diferenciación o la localización tumoral<sup>163</sup>.

La supervivencia de los pacientes no mostró diferencias significativas en relación con los niveles de MMP-13. Sólo 4 pacientes presentaron concentraciones por encima del punto de corte, lo que limita bastante la interpretación final de estos resultados. Se ha descrito que la expresión de MMP-13 se asocia a menor supervivencia, la cual no podría predecirse ni por el tamaño tumoral ni por la invasión linfática, considerándola un factor pronóstico independiente<sup>164</sup>. Por todo lo expuesto y con los escasos datos existentes en la actualidad, podemos resumir que nuestros resultados avalan la capacidad de la MMP-13 activada como marcador de metástasis en el CECC, aumentando sus niveles en los pacientes, con respecto a los controles, según progresa el estadio tumoral. Es necesario que estos hallazgos se confirmen en estudios más amplios, así como establecer su correlación con la expresión tisular.

#### *VI.2.7. Anticuerpos anti-p53 (Ac anti-p53).*

Los Ac anti-p53 se determinaron de forma cualitativa, encontrando que aparecen en el 33% de los pacientes, sin que ninguno de los controles fuese positivo, siendo las diferencias significativas (Tabla XV). Estos resultados concuerdan con otros publicados en los que aparecían anticuerpos sólo en el suero de pacientes con CECC y no en el de controles<sup>165</sup>. También se describe que son muy poco frecuentes los falsos positivos, observando que en una serie de 75 CECC y 28 controles, hay sólo un positivo en los controles por 23 positivos en los pacientes con tumor<sup>166</sup>. Este MTS parece tener buena especificidad en el CECC, siendo útil para la detección precoz de la mutación en p53, debido a su correlación con el acúmulo de proteína mutada (Tabla XIII).

En nuestro estudio se demuestra que la presencia de Ac anti-p53 se asoció de forma significativa con el desarrollo de metástasis ganglionares, como también han visto otros autores en series más amplias<sup>166,167</sup> (Tabla XVI). No obstante, en el 30% de los pacientes que tenían metástasis no se detectaron anticuerpos, de ahí su utilidad limitada. Podría considerarse como prueba preoperatoria con “cierto valor” para identificar la ausencia de metástasis, pues era negativa en sujetos sanos y en pacientes sin metástasis, aunque no sería útil como prueba de “screening” en el CECC debido a su baja sensibilidad mostrada en pacientes ya diagnosticados. Nosotros hemos encontrado diferencias según la localización del tumor, observando que hay mayor número de pacientes con la prueba positiva en tumores faríngeos (Tabla XVII). Hay estudios que demuestran por inmunohistoquímica mayor expresión de p53 en la localización faríngea frente a la laríngea<sup>84</sup>. Esto podría deberse al desarrollo de mutaciones distintas según el origen tumoral. La frecuencia más elevada de Ac anti p-53 en el suero de pacientes con tumores faríngeos es un punto que debería ser motivo de posteriores estudios.

Observamos que los Ac anti-p53 se asocian de forma significativa con los estadios tumorales más avanzados (III y IV) frente a los precoces (I-II) (Tabla XVIII). Otros estudios concluyen que en el CECC los estadios avanzados y la presencia de Ac anti-p53 se asocian con mayor riesgo de recidiva tumoral<sup>167</sup>. Además, se estima que la determinación de estos anticuerpos establece un buen paralelismo con la detección precoz de alteraciones en p53, pudiendo utilizarse como indicador de la presencia de la proteína p53 mutada<sup>168</sup>.

La expresión mayor de anticuerpos en estadios avanzados se explicaría por la acumulación de alteraciones genéticas que en ellos ocurren, identificando así a los pacientes con un pronóstico más desfavorable.

Existieron diferencias significativas en la presencia de Ac anti-p53 en función del grado de diferenciación histológico. Observamos que los Ac anti-p53 aparecían de forma similar en tumores poco y moderadamente diferenciados, sin embargo solamente hubo un caso de tumor bien diferenciado positivo para Ac anti-p53. Este dato ya ha habido sido recogido en la bibliografía, encontrando correlación entre la presencia de Ac anti-p53, el estadio, y el grado de diferenciación<sup>169</sup>. Sin embargo, otros autores no recogen esta relación con el grado de diferenciación<sup>167</sup>, por lo tanto series más amplias serían de utilidad para contrastar estos resultados.

Respecto a la supervivencia observamos que fue peor en los pacientes que presentaban Ac anti-p53, como también han demostrado otros autores<sup>166,167</sup> (Figura 69). Además en algunos estudios se encuentra asociación entre la presencia de anticuerpos y la respuesta

completa a la quimioterapia adyuvante<sup>168</sup>. Sin embargo, en publicaciones más recientes se obtienen resultados en sentido contrario, afirmando que la presencia de los anticuerpos no se relaciona con la supervivencia<sup>170,171</sup>.

Por los datos obtenidos y el contraste con lo publicado, podemos resumir que los Ac anti-p53 son un marcador útil para detectar metástasis ganglionares y establecer el estadio tumoral y la localización tumoral. También se ha comprobado su implicación respecto a la supervivencia. Son necesarios nuevos estudios para establecer un criterio más firme en esta cuestión, teniendo en cuenta que hay muchos factores que influyen en la supervivencia, estando posiblemente todos ellos relacionados.

#### *VI.2.7. Análisis multimarcador*

En nuestro estudio valoramos diferentes marcadores (SCC, CYFRA 21.1, E-cadherina soluble, MMP-2, MMP-9, MMP-13 activa y anticuerpos anti-p53), aplicados al diagnóstico de las metástasis ganglionares en pacientes con CECC. De todos ellos, sólo MMP-13 y Ac anti-p53 se mostraron como variables capaces de determinar la presencia de metástasis, siendo este último el que presentaba valores más significativos.

El marcador individual con mayor potencial de los estudiados para predecir las metástasis ganglionares son los Ac anti-p53. Con ellos somos capaces de predecir la presencia de metástasis en el 33% (verdaderos positivos), aunque el 30% de los pacientes no positivizaba la prueba y tenían metástasis (falsos negativos). No hubo pacientes sin metástasis y anticuerpos positivos (falsos positivos). Sin embargo, aunque la prueba puede ser útil cuando es positiva al seleccionar los pacientes con un pronóstico más comprometido (metástasis, estadio, supervivencia), no alcanza los valores necesarios para tener relevancia clínica (Tabla XXIV). En este sentido se ha propuesto el uso combinado de marcadores con el objeto de mejorar las limitaciones existentes<sup>172,173</sup>.

Nosotros proponemos el uso combinado de los Ac anti-p53 y la MMP-13 activa (Tabla XXIII). De esta manera conseguimos mejorar nuestros resultados al aumentar los verdaderos positivos, del 33% al 48%, y disminuir los falsos negativos, del 30% al 15%. Cabe desatacar que no hubo ningún falso positivo (Tablas XVI y XXIII).

Como ya hemos señalado al discutir los dos marcadores propuestos, los datos obtenidos en nuestro estudio deben ser contrastados con series más amplias.



## **VII. CONCLUSIONES**

## VII. CONCLUSIONES

- 1) El patrón de marcadores tumorales séricos para el cáncer escamoso de cabeza y cuello se establece con CYFRA 21.1, E-cadherina, metaloproteasa-9, metaloproteasa-13 activa y anticuerpos anti-p53, que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles sanos. (a población control.)
- 2) El estadio tumoral avanzado esta en relación con los niveles elevados de CYFRA 21.1 (valor medio de 28 ng/mL) y la presencia de anticuerpos anti-p53 positivos.
- 3) El menor grado de diferenciación histológico del tumor está relacionado con los niveles elevados de CYFRA 21.1 (valor medio de 39 ng/nL).
- 4) La supervivencia fue menor en los pacientes que tenían niveles de metaloproteasa-2 inferiores a 290,7 ng/mL y en presencia de anticuerpos anti-p53 positivos.
- 5) Las metástasis ganglionares fueron más frecuentes cuando los pacientes tenían anticuerpos anti-p53 positivos o niveles elevados de metaloproteasa-13 activa (585 pg/mL).
- 6) Si asociamos los anticuerpos (marcadores) anti-p53 y la metaloproteasa-13 activa conseguimos mejorar el rendimiento de ambas pruebas, alcanzando una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100% para el diagnóstico de metástasis ganglionares.

## **VIII. PROYECTOS FUTUROS**

## VIII. PROYECTOS FUTUROS

Este estudio no pretende ser un hecho aislado, sino que sigue la línea de investigación determinada por nuestro grupo en el CECC. Sí esperamos que abra algunas vías nuevas que permitan profundizar en aspectos de interés clínico. En un futuro inmediato se podrían aplicar los MTS más eficaces en el diagnóstico y tratamiento de los CECC. Por ejemplo, en la cirugía láser donde sería de mucho interés establecer la capacidad metastática del tumor para indicar los vaciamientos ganglionares, sólo en pacientes de riesgo, evitando procedimientos innecesarios, reduciendo la morbimortalidad y mejorando la calidad de vida. También para el diagnóstico precoz de metástasis a distancia donde el planteamiento terapéutico es muy diferente.

Nuestro estudio demuestra que el diagnóstico de las metástasis ganglionares mediante MTS tiene aún margen de mejora, aunque es una opción con posibilidades reales antes del abordaje quirúrgico del tumor. Aumentar el número de sujetos a estudio y diseñar perfiles con nuevos MT para el CECC serán los siguientes pasos a seguir. Entre estos nuevos marcadores ya estamos pensando en las formas activas de otras MMPs (MMP-2, MMP-9, MMP-14)<sup>174</sup> o en los que intervienen en otras vías relacionadas con el desarrollo tumoral (inflamación, angiogénesis...), como por ejemplo la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS)<sup>175</sup>.

También sería muy interesante contrastar los resultados de los MTS con la expresión inmunohistoquímica en el tejido tumoral para establecer su relación.

Los avances en biología molecular, junto con las nuevas técnicas de proteómica, que se van introduciendo cada día más en la práctica clínica, representan nuevas oportunidades para mejorar nuestro conocimiento de la biología tumoral, constituyendo un campo prometedor para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con cáncer. En este sentido cobra interés la aplicación de la espectrometría de masas con estudios preliminares para identificar lo que se ha llamado “degradoma tumoral”, es decir, el perfil de expresión proteico de cada tumor<sup>176</sup>. Con estas técnicas se abre la posibilidad de perfeccionar nuestro conocimiento en la línea de investigación del CECC, con el fin de identificar nuevos

marcadores tumorales más eficaces que puedan ser aplicados en la clínica de manera eficaz<sup>177</sup>.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

---

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Hoffman H, Karnell LH, Funk GF, Robinson RA, Menk HR. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaringol Head Neck Surg* 1998; 124: 951-962.
- <sup>2</sup> Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 2005; 16:481-488.
- <sup>3</sup> Quer Agusti M, Burgués Vila J. Evaluación clínica y evolución en los tumores de la laringe. En: Carlos Suárez, ed. *Tratado de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*. Madrid. Proyectos Médicos SL, 2000; 3011-3013.
- <sup>4</sup> Atlas de incidencia de cáncer en Asturias 1982-1993: mapas municipales y evolución temporal. Consejería de Salud y Servicios Sanitarios. Principado de Asturias, 2000; 16, 26-29, 54-57.
- <sup>5</sup> Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer Supplement* 1995; 75: 147-153.
- <sup>6</sup> Cooper P, Jovanovic A, Nauta JJP, Braakchuis BJM, De Vries N, Von der Waal I, Snow G. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 157-160.
- <sup>7</sup> Morales M, Llopis A, Moreno E, Martínez M, Vitoria I, Givert V. Hábitos tóxicos en relación con el cáncer de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1997; 44: 45-50.
- <sup>8</sup> Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993;328: 184-94.
- <sup>9</sup> Ward PH, Hanson DG. Reflux as an etiological factor of carcinoma of the laryngopharynx. *Laryngoscope* 1998; 98: 1195-1199.
- <sup>10</sup> Álvarez I, Sánchez Lazo P, Ramos González S, Rodrigo Tapia JP, Llorente Pendás JL, Suarez Nieto C. Detección simultánea del Hpv-6b y 16 en el cáncer faringolaríngeo. *Acta Otorrinolaring Esp* 1996; 47: 93-96.
- <sup>11</sup> Maier H, De Vries N, Snow GB. Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. *Clin Otorrinolaringol* 1991; 16: 406-412.

- 
- <sup>12</sup> Schatz SP, Zhang ZF, Spitz Ms, Sun M, Hsu TC. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope* 1997; 107: 765-781.
- <sup>13</sup> Barona de Guzmán R, Martorell M.A, Basterra J, Armengot M, Álvarez-Valdés R, Garin L. Pronostic value of histopathological parameters in supraglottic squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 1993; 103: 538-540.
- <sup>14</sup> Sasaki CT, Jassin B. Cancer of the pharynx and larynx. *Am J Med* 2001; 111: 1185-1235.
- <sup>15</sup> Nicolai P, Bertoni F, Luca O, Redaelli de Zini L, Tomenzoli D, Barezzani M G, Bignardi M, Antonelli A R. Pronostic determinants in supraglottic carcinoma: univariate and cox regresion analisys. *Head Neck* 1997; 19: 323-334.
- <sup>16</sup> Fergie N, Muty G. Second primary neoplasms in patients with laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 1586-1587.
- <sup>17</sup> Adams J, Heintz P, Gross N. Acid/pepsin promotion of carcinogenesis in the hamster cheek pouch. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126: 405-409.
- <sup>18</sup> Magnano M, Bussi M, De Stefani A, Milan F, Leida W, Ferrero V, Gervasio F, Ragoma R, Gabriele P, Valente G, Cortesina G. Pronostic factors for head and neck tumor recurrence. *Acta Otolalyngol (Stockh)* 1995; 115: 833-838.
- <sup>19</sup> Galioto GB, Mevio E, Benazzo M, Arizzi L, Scelsi M. Prognostic parameters in metastatic spread of laryngeal cancer: clinico-histopathological correlations. *Clin Otolaryngol* 1987; 12: 303-308.
- <sup>20</sup> Lam KH, Low WF, Wei WL. Tumor clearance at resection margins in total laryngectomy: a clinicalpathologic study. *Cancer* 1998; 61: 2260-2272.
- <sup>21</sup> Suárez Nieto C, Herrera Monge F, Díaz Fdez C, Álvarez Álvarez J, Sota Equizabal E, Llorente Pendás JL, Gómez Martínez J. Factores pronósticos clínico-patológicos en tumores laríngeos y faringolaríngeos II. Carcinomas Glóticos. *Acta Otorrinolaring Esp* 1993; 44: 77-83.
- <sup>22</sup> Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: Implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-2492.
- <sup>23</sup> Brady-Kalnay SM, Boghaert ER, Zimmer S, Brckenbury R. Increasing N-CAM-mediated cell-cell adhesion does not reduce invasión of RSV-transformed WC5 rat cerebellar cells. *Clin Exp Metastasis* 1993; 11:313-324.
- <sup>24</sup> Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-767.
- <sup>25</sup> Jonson JP, Rimel MM, Rothbacher U, Serbs C. MUC-18: a cell adhesion molecule with a potencial role in tumor growth and tumor cell dissemination. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 95-105.

- 
- <sup>26</sup> Vleminck K, Vakaet L, Mareel M, Fiers W, Van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 1991; 66: 107-119.
- <sup>27</sup> Pandolfi F, Trentin L, Boyle LA, Stamerkovic I. Expression of cell adhesion molecules in human melanoma cell lines and their role in cytotoxicity mediated by tumor-infiltrating lymphocytes. *Cancer* 1992; 69: 1165-1173.
- <sup>28</sup> Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-239.
- <sup>29</sup> Montuori N, Sobel ME. The 67 k-Da laminin receptor and tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 205-214.
- <sup>30</sup> De Clerk YA, Perez N, Shimada H, Boone TC, Langley KE, Taylor SM. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases. *Cancer Res* 1992; 52: 701-708.
- <sup>31</sup> Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation, and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997; 74: 111-122.
- <sup>32</sup> Habets GGM, Scholtes EHM, Zuydgeest D, Van der Kammen RA. Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho-like proteins. *Cell* 1994; 77: 537-549.
- <sup>33</sup> Keely PJ, Westick JK, Whitehead IP, Der CJ, Parise LV. Cdc42 and Rac 1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 1997; 390: 632-636.
- <sup>34</sup> Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH-F, Toser A, Mercurio A. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the  $\alpha 6 \beta 4$  integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997; 91: 949-960.
- <sup>35</sup> Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Cham AM. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991; 272: 5525- 5532.
- <sup>36</sup> Czubayko F, Liaudet-Coopman ED, Aigner A, Tuveson AT, Bechem GJ, Wellstein A. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nature Med* 1997; 3: 1137-1140.
- <sup>37</sup> Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-364.
- <sup>38</sup> Hu GF, Rordan JF, Vallee BL. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12096-12100.
- <sup>39</sup> Folkman J. Tumor angiogenesis. En: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, eds. *The molecular basis of cancer*. Philadelphia . WB Saunders, 1995; 206-232.

- 
- <sup>40</sup> Koop S, MacDonald IC, Luzzi K, Schmidt EE. Fate of melanoma cells entering the microcirculation: over 80% survive and extravasate. *Cancer Res* 1995; 55:2520-2523.
- <sup>41</sup> Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2129-2137.
- <sup>42</sup> Black MH, Diamandis EP. The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 59:1-14.
- <sup>43</sup> Wells SA, Franz C. Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World J Surg* 2000; 24: 952-956.
- <sup>44</sup> Ishikawa O, Ohigashi H, Imaoka S, Nakaizumi A, Uehara H, Kitamura T. Minute carcinoma of the pancreas measuring 1 cm or less in diameter--collective review of Japanese case reports. *Hepatogastroenterology* 1999; 46: 8-15.
- <sup>45</sup> Stearns V, Yamauchi H, Hayes DF. Circulating tumor markers in breast cancer: accepted utilities and novel prospects. *Breast Cancer Res Treat* 1998; 52: 239-259
- <sup>46</sup> Bidart JM, Thuillier F, Augereau C, Chalas J, Daver A, Jacob N. Kinetics of serum tumor marker concentrations and usefulness in clinical monitoring. *Clin Chem* 1999; 45: 1695-1707.
- <sup>47</sup> Lin JD. Diagnosis of papillary and follicular thyroid cancers. *Changgeng.Yi Xue Za Zhi.* 1999; 22: 348-361.
- <sup>48</sup> Diez B, Balmaceda C, Matsutani M, Weiner HL. Germ cell tumors of the CNS in children: recent advances in therapy. *Childs Nerv Syst* 1999; 15:578-585.
- <sup>49</sup> Hammond ME, Fitzgibbons PL, Compton CC, Grignon DJ, Page DL, Fielding LP. College of American Pathologists Conference XXXV: solid tumor prognostic factors--which, how and so what? Summary document and recommendations for implementation. Cancer Committee and Conference Participants. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124:958-965.
- <sup>50</sup> Crawford ED. The utility of prostate-specific antigen as a surrogate marker for identification of high-risk cohorts and assessing response in chemoprevention trials. *Eur Urol* 1999; 35:511-514.
- <sup>51</sup> Meden H, Fattahi-Meibodi A. CA125 in benign gynecological conditions. *Int J Biol Markers* 1998; 13:231-237.
- <sup>52</sup> Polascik TJ, Oesterling JE, Partin AW. Prostate specific antigen: a decade of discovery--what we have learned and where we are going. *J Urol* 1999; 162:293-306.
- <sup>53</sup> Leewansangtong S, Soontrapa S, Tantiwong A. Is prostate-specific antigen still the best tumor marker for prostate cancer? *J Med Assoc Thai.* 1999; 82:1034-1040.
- <sup>54</sup> Bartsch C, Bartsch H. Melatonin in cancer patients and in tumor-bearing animals. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 247-264.

- 
- <sup>55</sup> Camera A, Villa MR, Rocco S, De-Novellis T, Costantini S, Pezzullo L. Increased CA 125 serum levels in patients with advanced acute leukemia with serosal involvement. *Cancer* 2000; 88: 75-78.
- <sup>56</sup> Brawer MK. Prostate-specific antigen. *Semin Surg Oncol* 2000;18: 3-9.
- <sup>57</sup> Raymond E, Soria JC, Izbicka E, Boussin F, Hurley L, Von-Hoff DD. DNA G-quadruplexes, telomere-specific proteins and telomere-associated enzymes as potential targets for new anticancer drugs. *Invest New Drugs* 2000; 18:123-137.
- <sup>58</sup> Ferrari L, Seregini E, Martinetti A, Van-Graafeiland B, Nerini-Molteni S, Botti C, et al. Chromogranin A measurement in neuroendocrine tumors. *Int J Biol Markers* 1998;13:3-9.
- <sup>59</sup> Marth C, Zeimet AG, Widschwendter M, Daxenbichler G. Regulation of CA125 expression in cultured human carcinoma cells. *Int J Biol Markers* 1998;13: 207-209.
- <sup>60</sup> Ng MH, Wong IH, Lo KW. DNA methylation changes and multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 463-472.
- <sup>61</sup> Kirollos MM, McDermott S, Bradbrook RA. Bladder tumor markers: need, nature and application. 1. Nucleus-based markers. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 1998; 9: 221-227.
- <sup>62</sup> Yu H, Berkel H. Prostate-specific antigen (PSA) in women. *J La State Med Soc* 1999; 151: 209-213.
- <sup>63</sup> Kuban DA, El-Mahdi AM, Schellhammer PF. PSA for outcome prediction and posttreatment evaluation following radiation for prostate cancer: do we know how to use it? *Semin Radiat Oncol.* 1998; 8:72-80.
- <sup>64</sup> Gertz MA, Fonseca R, Rajkumar SV. Waldenstrom's macroglobulinemia. *Oncologist.* 2000;5: 63-67.
- <sup>65</sup> Raj GV, Moreno JG, Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998; 82: 1419-1442.
- <sup>66</sup> Stoelben E, Koch M, Hanke S, Lossnitzer A, Gaertner HJ, Schentke KU. Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma confirmed by surgical specimen: report of two cases and review of the literature. *Langenbecks. Arch Surg* 1998; 383: 447-452.
- <sup>67</sup> Oberg K. State of the art and future prospects in the management of neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med* 2000; 44: 3-12.
- <sup>68</sup> Sugiyama H. Wilms tumor gene (WT1) as a new marker for the detection of minimal residual disease in leukemia. *Leuk Lymphoma* 1998; 30:55-61.
- <sup>69</sup> Yu H. Clinical implications of prostate-specific antigen in men and women. *J Gend Specif Med* 2000; 3: 45-53.

- 
- <sup>70</sup> Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987; 235: 305-311.
- <sup>71</sup> Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* 2000; 21:461-467.
- <sup>72</sup> Hockenbery DM. The bcl-2 oncogene and apoptosis. *Semin Immunol* 1992; 4: 413-420.
- <sup>73</sup> Heaney AP, Melmed S. New pituitary oncogenes. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7:3-15.
- <sup>74</sup> Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001; 23: 147-59.
- <sup>75</sup> Kaganoi J, Shimada Y, kano M, Okumura T, Watanabe G, Inamur. Detection of circulating oesophageal cancer cells in peripheral blood and its impact on prognosis. *Br J Surg* 2004; 91: 1055-60.
- <sup>76</sup> Kato H, Miyauchi F, Fujino T, Torigoe T. Tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1979; 43 : 585-90.
- <sup>77</sup> Yamanaka N Himi T, Harabuchi Y, Hoki K, Kataura A. Soluble immune complexes and squamous cell carcinoma –related antigens in patients with head and neck cancer. *Cancer* 1988;62: 1932-8.
- <sup>78</sup> Eibling D, Johnson J, Wagner R. Radioimmunoassay for SCC antigen in the diagnosis of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1989; 99:117-24.
- <sup>79</sup> Fuchs E. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu Rev Genet* 1996; 30:197-231.
- <sup>80</sup> Moll R Cytokeratins as markers of differentiation in the diagnosis of epithelial tumors. *SubcellBiochem* 1998; 31: 205-62.
- <sup>81</sup> Doweck I, Barak M, Greenberg E, Uri N, Kellner J, Lurie M, Gruener N. Cyfra 21.1: a new potential tumor marker for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121: 177-81.
- <sup>82</sup> Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutheland DJ, Kellen JA, Buting PS. Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 1994; 58: 480-487.
- <sup>83</sup> Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscidny S. Analysis of p53 serum antibodies in patients with squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1228-1233.
- <sup>84</sup> Lavieille J, Lubin R, Soussi T, Reyt E, Brambilla C. Analysis of p53 antibody response in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 1996; 16: 2385-2388.
- <sup>85</sup> Bracke M, Van Roy F, Mareel M. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 123-161.

- 
- <sup>86</sup> Mbalaviele G, Dustan CR, Susaki A, Williams PJ, Mundy GR, Yoneda T. E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastasis in an experimental metastasis model. *Cancer Res* 1996; 56: 4063-4070.
- <sup>87</sup> Schipper JH, Frixen UH, Behrens J, Unger A. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor differentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 1991; 51: 6328-6337.
- <sup>88</sup> Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suárez C. Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002; 38:1059-64.
- <sup>89</sup> Wheelock MJ, Buck CA, Bechtol KB, Damsky CH. Soluble 80-kd fragment of cell-CAM 120/80 disrupts cell-cell adhesion. *J Cell Biochem* 1987; 34: 187-202.
- <sup>90</sup> Katayama M, Hirai S, Kamihagi K, Nakagawa K, Yasumoto M, Kato I. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* 1994; 69: 580-5.
- <sup>91</sup> Griffiths TR, Brothrick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, Shenton BK, Neal DE, Mellon JK. Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence. *Br J Cancer* 1996; 74: 579-84.
- <sup>92</sup> Maguire TM, Shering SG, McDermott EW, O'Higgins N, Fennelly JJ, Crown J, Duffy MJ. Assay of E-cadherin by ELISA in human breast cancers. *Eur J Cancer* 1997; 33: 404-8.
- <sup>93</sup> Powel W, Matrisian LM. Complex roles of matrix metalloproteinases in tumor progression. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 1-21.
- <sup>94</sup> Chambers AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinase in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1262-1270.
- <sup>95</sup> Freije JP, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, López-Otín C. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J Biol Chem* 1994; 269: 16766-16773.
- <sup>96</sup> Puente XS, Pendás AM, Llano E, Velasco G, López-Otín C. Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from human breast carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 944-949.
- <sup>97</sup> Cazorla M, Hernández L, Nadal A, Balbín M, López JM, Vizoso F, Fernandez P, Iwata I, Cardesa A, Lopez-Otín C, Campo E. Collagenase-3 expression is associated with advanced local invasion in human squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1998; 186: 144-150.
- <sup>98</sup> Sparano A, Lathers DMR, Achille N, Petruzzelli GJ, Young MRI. Modulation of Th1 and Th2 cytokine profiles and their association with advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 131: 573-6.
- <sup>99</sup> Kato H, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1997; 40: 1621-8.

- 
- <sup>100</sup> Kato H, Morioka H, Aramaki S, Torigoe T. Radioimmunoassay for tumor-antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cell Mol Biol* 1979; 25: 51-6.
- <sup>101</sup> Broers JLV, Ramaekers FCS, Klein Rot M.. Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies. *Cancer Res* 1988; 48: 3221-9.
- <sup>102</sup> Pujol J, Greiner J, Daures JP, Daver A, Pujol H, Michel FB. Serum fragments of cytokeratin subunit 19 measured by CYFRA 21-1 immunoradiometric assay as a marker of lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 1-6.
- <sup>103</sup> Karsten U, Papsdorf G, Roloff G. Monoclonal anti-cytokeratin antibody from an hybridoma clone generated by electrofusion. *Eur J Clin Oncol* 1985; 21: 733-40.
- <sup>104</sup> Kasper M, Stosiek P, Typlt H, Karsten U. Histological evaluation of three monoclonal antibodies. 1. Normal tissues. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23: 137-47.
- <sup>105</sup> Damsky CH, Richa J, Solter D, Knudsen K, Buck CA. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* 1983; 34: 455-66.
- <sup>106</sup> Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 1988; 102: 639-55.
- <sup>107</sup> Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991; 251: 1451-5.
- <sup>108</sup> Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; 12: 1075-95.
- <sup>109</sup> Borden P, Heller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7: 159-78.
- <sup>110</sup> Yu AE, Hewitt RE, Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Molecular regulation of cellular invasion--role of gelatinase A and TIMP-2. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 823-31.
- <sup>111</sup> Yu AE, Hewitt RE, Connor EW, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases. Novel targets for directed cancer therapy. *Drugs Aging* 1997; 11: 229-44.
- <sup>112</sup> Knauper V, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G. Activation of progelatinase B (proMMP-9) by active collagenase-3 (MMP-13). *Eur J Biochem* 1997; 248: 369-73.
- <sup>113</sup> Xie B, Laouar A, Huberman E. Fibronectin-mediated cell adhesion is required for induction of 92-kDa type IV collagenase/gelatinase (MMP-9) gene expression during macrophage differentiation. The signaling role of protein kinase C-beta. *J Biol Chem* 1998; 273: 11576-82.
- <sup>114</sup> Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997; 389: 77-81.

- 
- <sup>115</sup> Knauper V, Will H, Lopez-Otin C, Smith B, Atkinson SJ, Stanton H, Hembry RM, Murphy G. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J Biol Chem* 1996; 271: 17124-31.
- <sup>116</sup> Bluteau G, Conrozier T, Mathieu P, Vignon E, Herbage D, Mallein-Gerin F. Matrix metalloproteinase-1, -3, -13 and aggrecanase-1 and -2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1526:147-58.
- <sup>117</sup> Suarez-Alvarez B, Garcia Suarez MM, Arguelles ME, Sampedro A, Alvarez Marcos C, Mira E, Van den Brul FA, Liu FT, Chowdhury PS, de los Toyos JR. Circulating IgG response to stromelysin-3, collagenase-3, galectin-3 and mesothelin in patients with pharynx/larynx squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2001; 21:3677-84.
- <sup>118</sup> Westhoff CS, Freudiger D, Petrow P, Seyfert C, Zacher J, Kriegsmann J, Pap T, Gay S, Stiehl P, Gromnica-Ihle E, Wernicke D. Characterization of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) messenger RNA expression in the synovial membrane and synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1517-27.
- <sup>119</sup> Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253-53.
- <sup>120</sup> Burkart C. Das tumors suppressorprotein p53. *Deutsches Arzteblatt* 1994;91: 679-684.
- <sup>121</sup> Soussi T. The humoral immune response to the tumor suppressor gene product p53 in human cancer implications for diagnosis and therapy. *Immunology Today* 1996; 17: 354-356.
- <sup>122</sup> Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p 53 in sera from patients with breast cancer. *Int J Cancer* 1982; 30: 403-408.
- <sup>123</sup> von Kleist S. What's new in tumor markers and their measurements? *Pathol Res Pract* 1988; 183: 95-9.
- <sup>124</sup> Shidara Y, Karube A, Watanabe M, Satou E, Uesaka Y, Matsuura T. A case report: verrucous carcinoma of the endometrium--the difficulty of diagnosis, and a review of the literature. *J Obstet Gynaecol Res* 2000; 26: 189-192.
- <sup>125</sup> Sell S. Cancer markers of the 1990s. Comparison of the new generation of markers defined by monoclonal antibodies and oncogene probes to prototypic markers. *Clin Lab Med* 1990; 10:1-37.
- <sup>126</sup> McNeil BJ, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Decis Making* 1984; 4:137-50.
- <sup>127</sup> Magnano M, Bongioannini G, Lerda W, Canale G, Tondolo E, Bona M, Viora L, Gabini A, Gabriele P. Lymph node metastasis in head and neck squamous cells carcinoma: multivariate analysis of prognostic variables. *J Exp Clin Cancer Res* 1999; 18: 79-83.

- 
- <sup>128</sup> Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101:973-8.
- <sup>129</sup> Polberg K, Stepulak A, Stryjecka-Zimmer M, Kupisz K, Zawislak J. Squamous cell carcinoma antigen levels in patients with larynx cancer. *Pol Merkuriusz Lek* 2005; 19: 375-6.
- <sup>130</sup> Banal A, Hacene K, Berthelot-Ruff E, Mahe E, Fontana X, Pichon MF. Comparison of Cyfra 21-1 and SCC assays in head and neck tumours. *Tumour Biol.* 2001; 22:1-3.
- <sup>131</sup> Arlt A, Luckhaupt H, Hildmann H. Diagnosis of recurrences of head and neck carcinoma with the tumor marker SSC-antigen. *Laryngorhinootologie* 2000; 79: 207-12.
- <sup>132</sup> Adamiak G, Ligezinski A, Jurkiewicz D, Hermanowski M, Konieczna M, Rapiejko P. Squamous cell carcinoma antigen (ScC-Ag): diagnostic utility in squamous cell carcinoma antigen of the head and neck with metastasis to lymph nodes. *Otolaryngol Pol* 2000; 54: 203-5.
- <sup>133</sup> Nagumo K, Okada N, Takagi M, Yamamoto H, Amagasa T, Fujibayashi T. Squamous cell carcinoma antigen in oral squamous cell carcinomas. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1990; 37: 27-34.
- <sup>134</sup> Inal E, Lacin M, Asal K, Ceylan A, Koybasioglu A, Ileri F, Uslu SS. The significance of ferritin, lipid-associated sialic acid, CEA, squamous cell carcinoma (SCC) antigen, and CYFRA 21-1 levels in SCC of the head and neck. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2004; 12: 23-30.
- <sup>135</sup> Deng YF, Chen P, Lin YZ, Le JZ, Wu XL, Yu MQ, Zhuang PY, Gao MH. Analytical and clinical evaluation of CYFRA 21-1 by electrochemiluminescent immunoassay in head and neck squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2003; 117:190-4.
- <sup>136</sup> Luo R, Li G, Zhu C. Detection and clinical significance of CYFRA21-1 in serum of laryngeal carcinoma patients. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2002; 16:289-91.
- <sup>137</sup> Bongers V, Braakhuis BJ, Snow GB. Circulating fragments of cytokeratin 19 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995; 20: 479-82.
- <sup>138</sup> Kuropkat C, Lippert BM, Werner JA. Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 2002; 63: 280-5.
- <sup>139</sup> Maass JD, Hoffmann-Fazel A, Goeroegh T, Hoffmann M, Meyer JE, Gottschlich S, Rudert H, Maune S. Cyfra 21-1: a serological help for detection of distant metastases in head and neck cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 2241-3.
- <sup>140</sup> Pradier O, Hille A, Schmißberger H, Hess CF. Monitoring of therapy in head and neck patients during the radiotherapy by measurement of Cyfra 21-1. *Cancer Radiother* 2002; 6: 15-21.

- 
- <sup>141</sup> Costey M, Mora J, León X, López M, Orús C, Vergés J, Gañán L, Quer M. Estudio de CEA y CYFRA 21.1 pre-tratamiento en 252 pacientes con carcinoma de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2004; 55: 338-42.
- <sup>142</sup> González Sánchez E, López-Ríos Velasco J, Calvo Boizas E, García-Talavera Fernández JR, Martín Rodríguez M, Muñoz Herrera A, Del Cañizo Álvarez A. Estudio de Cyfra 21-1 como nuevo marcador tumoral para el diagnóstico del carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1999; 50: 85-9.
- <sup>143</sup> Inal E, Lacin M, Asal K, Ceylan A, Koybasioglu A, Ileri F, Uslu SS. The significance of ferritin, lipid-associated sialic acid, CEA, squamous cell carcinoma (SCC) antigen, and CYFRA 21-1 levels in SCC of the head and neck. *Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg* 2004; 12: 23-30.
- <sup>144</sup> Ceruse P, Rabilloud M, Charrie A, Dubreuil C, Disant F. Study of cyfra 21-1, a tumor marker, in head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005; 114: 768-76.
- <sup>145</sup> Kuefer R, Hofer MD, Zorn CS, Engel O, Volkmer BG, Juarez-Brito MA, Eggel M, Gschwend JE, Rubin MA, Day ML. Assessment of a fragment of e-cadherin as a serum biomarker with predictive value for prostate cancer. *Br J Cancer* 2005; 92:2018-23.
- <sup>146</sup> Matsumoto K, Shariat SF, Casella R, Wheeler TM, Slawin KM, Lerner SP. Preoperative plasma soluble E-cadherin predicts metastases to lymph nodes and prognosis in patients undergoing radical cystectomy. *J Urol* 2003; 170: 2248-52.
- <sup>147</sup> Chan AO, Chu KM, Lam SK, Cheung KL, Law S, Kwok KF, Wong WM, Yuen MF, Wong BC. Early prediction of tumor recurrence after curative resection of gastric carcinoma by measuring soluble E-cadherin. *Cancer* 2005; 104 :740-6.
- <sup>148</sup> Rodrigo JP, Domínguez F, Alvarez C, Suarez C. Expresión de E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features. *Eur J Cancer* 2002; 38:1059-1064.
- <sup>150</sup> Kurokat C, Plehn S, Herz U, Dunne AA, Renz H, Werner JA. Tumor marker potential of serum matrix metalloproteinases in patients with head and neck cancer. *Anticancer Res* 2002; 22: 2221-7.
- <sup>151</sup> Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Hormann K. Serum levels of matrix metalloproteinase-2 and -9 in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 3045-9.
- <sup>152</sup> Dietz A, Rudat V, Vanselow B, Conradt C, Mohler T. Predictive value of serum levels of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 in advanced carcinomas of the head and neck HNO. 1999; 47: 695-701.
- <sup>153</sup> Hayasaka A, Suzuki N, Fujimoto N, Iwama S, Fukuyama E, Kanda Y, Saisho H. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1996; 24: 1058-62.

- 
- <sup>154</sup> Endo K, Maehara Y, Baba H, Yamamoto M, Tomisaki S, Watanabe A, Kakeji Y, Sugimachi K. Elevated levels of serum and plasma metalloproteinases in patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 2253-8.
- <sup>155</sup> Gorogh T, Beier UH, Baumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune S. Metalloproteinases and their inhibitors: Influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28:31-9.
- <sup>156</sup> Xu YP, Zhao XQ, Sommer K, Moubayed P. Correlation of matrix metalloproteinase-2, -9, tissue inhibitor-1 of matrix metalloproteinase and CD44 variant 6 in head and neck cancer metastasis. *J Zhejiang Univ Sci* 2003; 4: 491-501.
- <sup>157</sup> Kurokat C, Duenne AA, Herz U, Renz H, Werner JA. Significant correlation of matrix metalloproteinase and macrophage colony-stimulating factor serum concentrations in patients with head and neck cancer. *Neoplasma* 2004; 51: 375-8.
- <sup>158</sup> Ruokolainen H, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. *Int J Cancer* 2005; 116: 422-7.
- <sup>159</sup> Johansson N, Airola K, Grenman R, Kariniemi AL, Saarialho-Kere U, Kahari VM. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Am J Pathol* 1997; 151: 499-508.
- <sup>160</sup> O-charoenrat P, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127: 813-820.
- <sup>161</sup> Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, Madonia M, Indelicato M, Travali S, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer. *Urol Res* 2005; 33:44-50
- <sup>162</sup> Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kahari VM, Pyrhonen S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5158-66.
- <sup>163</sup> Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E. Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. *BMC Cancer* 2004; 4: 42.
- <sup>164</sup> Luukkaa M, Vihinen P, Kronqvist P, Vahlberg T, Pyrhonen S, Kahari VM, Grenman R. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28: 225-34.
- <sup>165</sup> Hofele C, Schwager-Schmitt M, Volkmann M. Prognostic value of antibodies against p53 in patients with oral squamous cell carcinoma--five years survival rate *Laryngorhinootologie* 2002; 81: 342-5.

- 
- <sup>166</sup> Chow V, Yuen AP, Lam KY, Ho WK, Wei WI. Prognostic significance of serum p53 protein and p53 antibody in patients with surgical treatment for head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 286-91.
- <sup>167</sup> Bourhis J, Lubin R, Roche B, Koscielny S, Bosq J, Dubois I, Talbot M, Marandas P, Schwaab G, Wibault P, Luboinski B, Eschwege F, Soussi T. Analysis of p53 serum antibodies in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1228-33.
- <sup>168</sup> Lavielle Jp, Righini C, Reyt E, Brambilla C. Implications of p53 alterations and p53-antibody response in patients with squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34: 84-92.
- <sup>169</sup> Ralhan R, Nath N, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Shukla NK. Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: correlation with p53 alterations. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 2147-52.
- <sup>170</sup> Wollenberg B, Jan NV, Pitzke P, Reiter W, Stieber P. Anti-p53 antibodies in serum of smokers and head and neck cancer patients. *Anticancer Res* 1997; 17: 413-8.
- <sup>171</sup> Maass JD, Gottschlich S, Goeroegh T, Lippert BM, Werner JA. Head and neck cancer and p53-immunogenicity. *Anticancer Res* 1997; 17: 2873-4.
- <sup>172</sup> Ayude D, Gacio G, Paez de la Cadena M, Pallas E, Martinez-Zorzano VS, de Carlos A, Rodriguez-Berrocal FJ. Combined use of established and novel tumour markers in the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2003; 10: 1345-50.
- <sup>173</sup> Kim J, Shin DM. Biomarkers of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Histol Histopathol* 1997; 12: 205-18.
- <sup>174</sup> Gorogh T, Beier UH, Baumken J, Meyer JE, Hoffmann M, Gottschlich S, Maune S. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2006; 28: 31-9.
- <sup>175</sup> Franchi A, Massi D, Santucci M, Masini E, Degl'Innocenti DR, Magnelli L, Fanti E, Naldini A, Ardinghi C, Carraro F, Gallo O. Inducible nitric oxide synthase activity correlates with lymphangiogenesis and vascular endothelial growth factor-C expression in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2006; 208: 439-45.
- <sup>176</sup> Wadsworth JT, Somers KD, Cazares LH, Malik G, Adam BL, Stack BC Jr, Wright GL Jr, Semmes OJ. Serum protein profiles to identify head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1625-32.
- <sup>177</sup> Wadsworth JT, Somers KD, Stack BC Jr, Cazares L, Malik G, Adam BL, Wright GL Jr, Semmes OJ. Identification of patients with head and neck cancer using serum protein profiles. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130: 98-104.



## **X. ANEXOS**

Anexo I  
 Variables clínico-patológicas de los pacientes con CECC.

Nº paciente	Edad	Localización	N	Estadio	Tipo histológico	Estado	Supervivencia (meses)	Radioterapia
CASO 1	76	Transglótico	N0	III	mod/difer	M*	36*	No
CASO 2	68	Hipofaringe	N2B	IV	poco/difer	M	24	Sí
CASO 3	80	Hipofaringe	NI	IV	poco difer	M	10	Sí
CASO 4	68	Supraglótico	N2b	IV	poco difer	V	31	Sí
CASO 5	46	Glottis	N0	II	bien difer	V	41	No
CASO 6	34	Supraglótico	N0	II	bien difer	V	13	No
CASO 7	51	Supraglótico	NI	III	poco difer	V	41	Sí
CASO 8	77	Supraglótico	N0	II	mod/difer	M*	1*	No
CASO 9	80	Supraglótico	N0	I	poco difer	M*	4*	Sí
CASO 10	60	Cavidad oral	N0	IV	bien difer	M	35	Sí
CASO 11	52	Mesofaringe	N2b	IV	mod/difer	M	22	Sí
CASO 12	53	Hipofaringe	N0	II	mod/difer	M	18	Sí
CASO 13	51	Transglótico	N2b	IV	bien/difer	V	32	Sí
CASO 14	55	Transglótico	N2c	IV	mod/difer	V	34	Sí
CASO 15	74	Supraglótico	NIII	IV	poco difer	M*	5*	No
CASO 16	64	Cavidad oral	N0	II	bien difer	V	12	No
CASO 17	75	Supraglótico	N2b	IV	poco/difer	M*	0*	No
CASO 18	49	Mesofaringe	N1	III	mod/difer	M	24	Sí
CASO 19	49	Supraglótico	N0	II	mod/difer	V	28	No
CASO 20	65	Glottis	N0	III	mod/difer	M*	22	No
CASO 21	50	Mesofaringe	N2b	IV	mod/difer	M*	1	No
CASO 22	79	Cavidad oral	N2b	IV	mod/difer	V	22	Sí
CASO 23	53	Mesofaringe	N2c	IV	mod/difer	M	18	Sí
CASO 24	56	Cavidad oral	N2b	IV	poco difer	M*	1*	No
CASO 25	49	Transglótico	N3	IV	poco difer	M	16	Sí
CASO 26	57	Hipofaringe	N2c	IV	poco difer	M	13	Sí
CASO 27	72	Hipofaringe	N2b	IV	mod/difer	M	9	Sí
CASO 28	62	Supraglótico	N1	III	poco difer	V	17	Sí
CASO 29	63	Transglótico	N0	III	bien difer	M	3	No
CASO 30	76	Mesofaringe	N0	II	biendifer	V	13	No
CASO 31	73	Orofaringe	NIII	IV	mod/difer	M	4	No
CASO 32	56	Supraglótico	NI	III	poco difer	V	10	No
CASO 33	70	Supraglótico	N0	I	bien difer	M	13	No

CASO 34	76	Mesofaringe	NI	III	mod/difer	M*	3*	No
CASO 35	72	Glottis	N0	III	bien /difer	V*	9*	Sí
CASO 36	52	Mesofaringe	N1	III	mod/difer	M*	31*	Sí
CASO 37	48	Transglótico	N1	III	mod/difer	V	10	No
CASO 38	57	Transglótico	N2b	IV	mod/difer	V	6	Sí
CASO 39	50	Supraglótico	NI	III	poco difer	V	5	No

Clave: Poco/difer = tumores poco diferenciados, mod/difer = tumores moderadamente diferenciados, bien/difer = tumores bien diferenciados. M\* = pacientes fallecidos por otra causa no relacionada con el tumor. V\* = paciente excluido a efectos de la supervivencia al no volver a revisión, considerándole perdido.

## Anexo II

Resultados analíticos de cada marcador tumoral en pacientes con CECC.

Nº paciente	AgSCC (ng/mL)	CYFRA 21.1 (ng/mL)	E-cadherina (µg/mL)	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)	MMP-13 activa (pg/mL)	Ac anti- p53
CASO 1	2,7	1,3	1,806	273	105,6	530,62	N
CASO 2	2,3	1,6	4,934	263,4	336,8	595,15	N
CASO 3	1,1	2,6	1,641	455,4	116	616,65	P
CASO 4	1,3	1,4	2,860	366,6	458	593,43	N
CASO 5	1,4	0,5	7,461	451,5	148,8	616,65	N
CASO 6	1,1	0,4	2,527	299,4	297,6	522,15	N
CASO 7	5,5	1,6	4,950	561,6	608,8	585,15	N
CASO 8	2	1,7	3,055	485,7	598	490,65	N
CASO 9	2,1	0,4	1,747	346,5	119,2	543,38	N
CASO 10	1,8	4,9	2,503	577,8	473,6	648,12	N
CASO 11	1,6	0,7	1,974	543,9	727,2	711,12	P
CASO 12	2	1,5	7,232	450	218,4	689,76	N
CASO 13	1,2	2	1,639	319,2	653	679,63	P
CASO 14	1,7	1,6	2,157	305,1	151,2	805,59	N
CASO 15	1,1	1,7	1,102	306,3	270,4	742,62	P
CASO 16	2,5	1,4	1,547	340,8	260,8	436,77	N
CASO 17	15,2	406	2,980	216,6	245,6	634,15	P
CASO 18	1,8	1,9	3,034	500	574,4	616,65	P
CASO 19	1,1	0,1	1,604	907,2	367,2	585,15	N
CASO 20	1,5	5,9	3,531	311,7	207,2	459,18	N
CASO 21	1,7	3,3	2,753	342,3	784	625,15	P
CASO 22	1,4	0,9	1,773	495	176,8	653,65	N
CASO 23	0,6	0,8	2,016	225,3	84,8	648,12	P
CASO 24	2,3	1,6	3,596	282,3	243,2	648,12	P
CASO 25	11,6	52,2	3,872	288,3	541	711,12	P
CASO 26	57,8	25,3	2,350	269,4	717,6	716,65	P
CASO 27	0,9	1,2	3,199	240,9	187,2	673,67	N
CASO 28	3,4	3,7	1,441	256,5	38,4	732,52	N
CASO 29	1,2	0,9	2,565	298,8	241,6	468,12	N
CASO 30	0,7	18,2	1,663	249,6	88,8	679,63	N
CASO 31	1,5	0,4	3,578	227,4	250,4	1089,03	P
CASO 32	0,7	9,9	1,327	290,7	144,8	784,72	N
CASO 33	1,2	0,2	1,644	221,4	237,6	436,65	N
CASO 34	1,2	2,4	7,852	441,6	632	742,62	P
CASO 35	1,5	2,5	1,707	405,6	88,8	542,65	N
CASO 36	1,1	0,7	2,607	119,7	264	616,65	N
CASO 37	1,8	2,5	5,704	334,5	142,4	711,12	N

<b>CASO 38</b>	<b>1,9</b>	<b>1,2</b>	<b>3,508</b>	<b>319,5</b>	<b>85,6</b>	<b>2096,85</b>	<b>N</b>
<b>CASO 39</b>	<b>1,8</b>	<b>1,9</b>	<b>2,331</b>	<b>279,3</b>	<b>191,2</b>	<b>805,59</b>	<b>N</b>

Anexo III

Resultados analíticos de cada marcador tumoral en controles.

<b>N° control</b>	<b>AgSCC (ng/mL)</b>	<b>CYFRA 21.1 (ng/mL)</b>	<b>E-cadherina (µg/mL)</b>	<b>MMP-2 (ng/mL)</b>	<b>MMP-9 (ng/mL)</b>	<b>MMP-13 activa (pg/mL)</b>	<b>Ac anti- p53</b>
<b>CONTROL 1</b>	<b>1,2</b>	<b>0,1</b>	<b>1,780</b>	<b>596,3</b>	<b>145,2</b>	<b>546,65</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 2</b>	<b>1,3</b>	<b>0,6</b>	<b>2,131</b>	<b>321,2</b>	<b>235,7</b>	<b>677,47</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 3</b>	<b>1,6</b>	<b>0,1</b>	<b>2,110</b>	<b>280,6</b>	<b>167,5</b>	<b>454,42</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 4</b>	<b>1,2</b>	<b>1,8</b>	<b>1,735</b>	<b>468,7</b>	<b>241,8</b>	<b>522,33</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 5</b>	<b>1,1</b>	<b>0,1</b>	<b>2,014</b>	<b>651,4</b>	<b>160,6</b>	<b>557,76</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 6</b>	<b>1,2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,950</b>	<b>353,6</b>	<b>159,3</b>	<b>624,33</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 7</b>	<b>1,7</b>	<b>0,1</b>	<b>1,850</b>	<b>556,3</b>	<b>205,2</b>	<b>345,54</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 8</b>	<b>1,3</b>	<b>0,3</b>	<b>2,098</b>	<b>456,6</b>	<b>147,5</b>	<b>349,5</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 9</b>	<b>1,4</b>	<b>0,1</b>	<b>1,875</b>	<b>257,9</b>	<b>36,8</b>	<b>691,2</b>	<b>N</b>
<b>CONTROL 10</b>	<b>1,5</b>	<b>0,2</b>	<b>1,154</b>	<b>358,1</b>	<b>118,1</b>	<b>467,55</b>	<b>N</b>