

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

Departamento de Cirugía y Especialidades Médico Quirúrgicas

Cambios génicos de los segundos tumores y recidivas en la progresión del  
cáncer escamoso de cabeza y cuello

Tesis doctoral

Autor  
Virginia Franco Gutiérrez

Directores  
César Antonio Álvarez Marcos  
Mario Hermsen  
José Luis Llorente Pendás



Reservados todos los derechos  
© El autor

Edita: Universidad de Oviedo,  
Biblioteca Universitaria, 2011  
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 79  
ISBN: En trámite  
D.L.: AS.00488-2011



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

CAMBIOS GÉNICOS DE LOS SEGUNDOS TUMORES  
Y RECIDIVAS EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER  
ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO



VIRGINIA FRANCO GUTIÉRREZ







## Agradecimientos

Escribir los agradecimientos de esta tesis doctoral significa para mí la conclusión de un intenso esfuerzo realizado junto a otras personas que han compartido sus conocimientos conmigo, sin ellos no hubiera sido posible. Mi agradecimiento y reconocimiento:

A mis tres directores: César Álvarez Marcos, José Luis Llorente Pendás y Mario Hermsen por ofrecerme este desafío y su confianza para llevarlo a cabo, así como su inestimable guía en todos los aspectos científicos del proyecto.

A Francisco Domínguez Iglesias, Patricia Morales del Burgo y Mar González que facilitaron desinteresadamente las muestras histopatológicas.

A Montserrat García Díaz por disipar muchas de mis dudas génicas. Sus consejos han mejorado mucho mis conocimientos.

A Arsenio Coto por su inestimable ayuda técnica en la edición y diseño gráfico.

A los miembros del IUOPA, especialmente a Judith Escudero y a Marta Alonso Guervós por dedicar su tiempo y experiencia en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros de los Servicios de Otorrinolaringología de los Hospitales Central de Asturias y Cabueñes, unos por guiarme en mis primeros pasos, otros por compartir el día a día, renovando la ilusión con la que comencé.

A mis padres que siempre han sido un ejemplo para mí. Ellos me han dado todas las oportunidades a su alcance confiando incondicionalmente en mi trabajo. Tienen el mérito de cada uno de mis logros.

A mi hermano Raúl que en la distancia siempre estuvo cerca con su cariño para apoyarme y alentarme a continuar.



A Luis por su infinita paciencia y comprensión al entender lo importante que este proyecto era para mí. Muchas de las horas dedicadas a este trabajo se las he quitado a él.

# Índice

Abreviaturas	9
Glosario	11
Bases previas	13
1. Presentación	17
2. Definición del problema	21
2.1 Antecedentes	23
2.1.1 Concepto de segundo tumor primario y recidiva tumoral	23
2.1.2 Incidencia	24
2.1.3 Etiología	25
2.1.4 Sexo	26
2.1.5 Cronología	27
2.1.6 Histopatología	27
2.1.7 Localización	27
2.1.8 Estadificación	29
2.1.9 Diagnóstico	29
2.1.10 Tratamiento	32
2.1.11 Pronóstico	36

3. Estado actual	41
3.1 Modelos de progresión	43
3.2 Genética y multicentricidad	46
3.2.1 Progresión genética	46
3.2.2 Campo de cancerización	50
4. Modelo teórico	53
5. Hipótesis	59
6. Objetivos	63
7. Material y métodos	65
7.1 Sujetos de estudio	67
7.2 Estudio clínico-patológico	68
7.3 Estudio genético-molecular	69
7.3.1 Extracción de ADN	69
7.3.2 Técnica de la MLPA	71
7.3.2.1 Tipos de sondas	73
7.3.2.2 Protocolo experimental	77
7.3.2.3 Interpretación	79
7.4. Reactivos empleados	81
7.5. Estudio estadístico y búsqueda bibliográfica	81
7.5.1 Análisis estadístico	81
7.5.2 Búsqueda bibliográfica	82
8. Resultados	85
8.1 Estudio clínico-histopatológico y seguimiento	87
8.1.1 Muestra completa	87

8.1.2 Grupo de STP	90
8.1.3 Grupo de RT	95
8.2. Estudio génico	100
8.2.1. Descripción de las alteraciones génicas	100
8.2.1.1 Alteraciones génicas en los 36 PT	101
8.2.1.2 Alteraciones génicas en los 21 STP	104
8.2.1.3 Alteraciones génicas en las 15 RT	107
8.2.2 Comparación de las alteraciones génicas	110
8.2.2.1 Entre los 36 PT y los 21 STP	110
8.2.2.2 Entre los 36 PT y las 15 RT	112
8.2.2.3 Entre los 21 STP y las 15 RT	115
8.2.2.4 Entre los 15 PT que desarrollaron RT y los 21 PT que desarrollaron STP	117
8.2.3 Concordancias y discordancias entre las alteraciones génicas	119
8.2.3.1 Entre los 36 PT y 21 STP	119
8.2.3.2 Entre los 15 PT y las RT	121
8.2.3.3 Entre cada PT con su correspondiente STP/ RT	123
8.3 Estudio de supervivencia	125
8.3.1 Comparación entre la supervivencia de los pacientes con STP y RT	125
8.3.2 Correlación de las alteraciones génicas de los PT con la supervivencia	125
9. Discusión	129
9.1. Datos clínicos e histopatológicos	131

9.2. Datos génicos	135
9.2.1 Aspectos descriptivos	135
9.2.2 Relación PT y STP	140
9.2.3 Relación PT y RT	141
9.2.4 Relación STP y RT	142
9.2.5 Relación entre PT→STP y PT→RT	144
9.2.6 Concordancias y discordancias	145
9.2.6.1 Entre los PT y STP	145
9.2.6.2 Entre los PT y RT	146
9.2.6.3 Entre los PT con su correspondiente STP/ RT	147
9.2.7 Relación de las alteraciones génicas de los PT con la supervivencia	150
9.2.7.1 En el total de los PT	150
9.2.7.2 En los PT→STP	151
9.2.7.3 En los PT→RT	151
10. Conclusiones	155
11. Perspectivas futuras	161
12. Bibliografía	167
13. Anexos	199

## Abreviaturas

CECC: Cáncer escamoso de cabeza y cuello (Incluye laringe, faringe, cavidad oral, fosa nasal y senos paranasales).

CGH: Hibridación genómica comparativa.

FISH: Hibridación in situ por fluorescencia.

HE: Hematoxilina-eosina.

LOH: Pérdida de heterocigosidad.

MD: Metástasis a distancia.

MLPA: «Multiplex ligation-dependent probe amplification».

PB: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

PT: Primer tumor.

RB: Retinoblastoma.

RT: Recidiva tumoral.

RNM: Resonancia nuclear magnética.

STC: Segundo tumor de campo.

STP: Segundo tumor primario.

VAS: Vía aérea-digestiva superior.

VPH: Virus del papiloma humano.



## Glosario

***Huella génica:*** cambios génicos frecuentes y constantes que definen un tipo de tumor.

***Perfil génico:*** grupo de alteraciones génicas (ganancias, pérdidas) que definen una determinada muestra o grupo.

***Patrón de concordancia/discordancia:*** nivel establecido de similitud y diferencia entre las alteraciones génicas de dos muestras tumorales o grupos.





## Bases previas

Esta tesis doctoral es fruto de la línea de investigación en CECC que el grupo de Oncología de Cabeza y Cuello del Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA) está desarrollando en los últimos años. Sus resultados están apoyados por sucesivas aportaciones científicas que a continuación enumeramos por orden cronológico:

### *Comunicaciones a Congresos:*

C Álvarez Marcos, V Franco, MP Cuesta, M Puente, M Alonso Guervós, JL Llorente, C Suárez. Segundos tumores primarios y metástasis a distancia en los carcinomas de cabeza y cuello. 56 Congreso Nacional de la SEORL y Patología Cérvico-Facial. Madrid, 12-15 de noviembre, 2005. Comunicación oral.

Franco Gutiérrez V, Álvarez Marcos C, Cuesta Albalad MP, Fernández Espina H, Llorente Pendás JL, Hermsen M, Suárez Nieto C. Las recidivas locales en la evolución del cáncer de cabeza y cuello. Aspectos clínicos y perspectivas futuras del estudio. 57 Congreso de la SEORL y Patología Cérvico-Facial. Granada, 30 septiembre-3 de octubre de 2006. Comunicación oral.

Franco Gutiérrez V, Álvarez Marcos C, Cuesta Albalad MP, Llorente Pendás JL, Suárez Nieto C, Hermsen M. Segundos primarios de la vía aéreo-digestiva superior. 57 Congreso de la SEORL y Patología Cérvico-Facial. Granada, 30 septiembre-3 de octubre de 2006. Comunicación póster.

### *Artículos:*

Álvarez Marcos CA, Llorente Pendás JL, Franco Gutiérrez V, Hermsen M, Cuesta Albalad MP, Fernández Espina H, Suárez Nieto C. Metástasis a distancia en el cáncer escamoso de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp 2006; 57: 369-72.

Álvarez Marcos CA, Llorente Pendas JL, Franco Gutiérrez V, Hermsen MA, Cuesta Albalad MP, Fernández Espina H, Suárez Nieto C. Segundos tumores primarios en el cáncer escamoso de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp 2006; 57: 462-6.

Álvarez Marcos CA, Llorente Pendás JL, Franco Gutiérrez V, Hermsen M, Cuesta Albalad MP, Fernández Espina H, Suárez Nieto C. Recidivas en el cáncer escamoso de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp. 2007; 58: 156-63.





# 1. Presentación



El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) es una enfermedad que presenta en nuestro medio una incidencia elevada, con unas cifras para varones de 40-42 casos/100.000h/año y una mortalidad aproximada de 15 casos/100.000h/año<sup>1,2</sup>. Aunque en los últimos años se han realizado importantes avances en los métodos de diagnóstico y tratamiento, que han supuesto un mejor control local de la enfermedad, la supervivencia no sólo no ha mejorado, si no que incluso ha disminuido<sup>3</sup>. Esto se debe en parte a que los pacientes siguen presentándose en la consulta con su enfermedad en estadios avanzados. El número de recidivas tumorales (RT) se ha ido reduciendo al realizar un control local más seguro, con resecciones más amplias, debido a la introducción de nuevas técnicas reconstructivas<sup>4</sup>. Sin embargo, las metástasis a distancia (MD) y los segundos tumores primarios (STP) se han incrementado de forma paulatina, inversamente al descenso de RT. En la actualidad, es muy elevado el número de MD (10%) y STP (12%), constituyendo conjuntamente la principal causa de mortalidad de los pacientes con CECC<sup>2, 5, 6</sup>.





## 2. Definición del problema



Voy a exponer los aspectos clínicos y genéticos conocidos hasta ahora de los STP y de las RT. Muchos de ellos son muy similares en ambas entidades por lo que trataré hacer más hincapié en sus diferencias.

## 2.1 Antecedentes

### 2.1.1 Concepto de segundo tumor primario y recidiva tumoral

Es importante definir desde el principio que entendemos por STP, RT y MD.

Bajo la denominación de RT se entiende el crecimiento de tejido neoplásico desde los bordes tumorales después de un tratamiento con fin curativo del PT. Debe cumplir con ciertos criterios clínicos, como son el ocurrir en un período de tiempo de tres años desde el diagnóstico y a una distancia menor de 2 cm<sup>7</sup>. En general la RT se suele clasificar en local (misma localización que el PT), locorregional (afecta zonas adyacentes, profundas o con extensión cervical) y del traqueostoma o estomal (se exterioriza a ese nivel)<sup>8</sup>.

El concepto de MD expresa la aparición de células tumorales con una extirpe similar al PT, pero en una zona anatómicamente distinta, que habitualmente no tiene ese tipo de tejido<sup>7</sup>.

El STP es diferente a los dos conceptos anteriores. Se trataría de un nuevo tumor que surge en un territorio sometido a similares agentes etiológicos, pero sin tener el mismo origen ni localización. Todos los STP deben cumplir los siguientes criterios: 1) presencia de dos lesiones separadas por tejido sano, 2) confirmación histológica de cada lesión y 3) excluir la posibilidad de MD<sup>9</sup>.

Los STP diagnosticados seis meses después del PT se denominan metacrónicos, mientras que si el período es inferior serían sincrónicos. Dentro de los sincrónicos pueden ser simultáneos si coinciden a la vez<sup>10,11</sup>. En el caso especial de los STP pulmonares necesitamos criterios adicionales como son que la lesión sea única y con histología no idéntica al PT<sup>9</sup>.

Por tanto, un STP sería una o varias lesiones distintas del PT desde el punto de vista espacial y temporal, aunque en este último aspecto pueden coincidir.

### *2.1.2 Incidencia*

La incidencia de STP representa el 5-36% de los pacientes diagnosticados de CECC<sup>8,10,11,12</sup>.

En nuestro medio se diagnostican en torno a 4-6/año, representando el 10-24 % de los diagnósticos oncológicos nuevos, observando cierta tendencia a aumentar ese porcentaje. Por otro lado, la mayoría de los STP se diagnostican en los tres primeros años de seguimiento del PT, si bien sólo el 13% lo hacen en el primer trimestre, acumulándose el resto entre el segundo semestre y los años siguientes<sup>13</sup>.

La mayoría de los estudios demuestran mayor incidencia de los STP metacrónicos<sup>14</sup>, con un 8%<sup>15</sup>, siendo su riesgo anual del 3-7%<sup>10,14,15</sup>, mientras que los sincrónicos oscilan entre 0,8-18% y suelen estar asociados con un PT de laringe<sup>16,17</sup>. El riesgo anual de aparición del tumor metacrónico se mantiene constante durante todo el período, siendo los pacientes con estadios iniciales los más susceptibles de desarrollarlo, debido quizás a su mayor supervivencia<sup>10,16</sup>.

La incidencia de las RT es del 16-32 %, si bien en algunos estudios realizados en CECC con estadios avanzados esa cifra supera el 50%<sup>18,19</sup>. La frecuencia de recidivas tumorales se sitúa en torno al 2- 7,2%, sobre todo en el primer año (64%), reduciéndose de forma progresiva en el segundo año y sólo de forma ocasional a posteriori. En nuestro medio se detectan en torno a 7-10 RT/ año, representando el 13-39% de los diagnósticos oncológicos nuevos, con cierta tendencia a disminuir en los últimos años<sup>20</sup>.

### 2.1.3 Etiología

La conjunción de factores genéticos y ambientales son los causantes del CECC. Los factores de riesgo ambientales o extrínsecos asociados al desarrollo de STP son similares a los del PT, destacando el consumo de tabaco y alcohol, la escasa higiene bucal, así como la extensión y el tratamiento del PT<sup>21,22</sup>. Respecto al papel del tabaco se ha demostrado que, su consumo previo al diagnóstico del PT, es el factor de riesgo más importante para desarrollar un STP<sup>23</sup>. Sin embargo, los estudios que han abordado el abandono del tabaco y el riesgo de STP después del tratamiento del PT son contradictorios, sin que, para algunos autores, el riesgo se vea reducido<sup>24</sup>, aunque otros sí lo constatan<sup>25</sup>. No obstante, hay mayor incidencia de STP en fumadores que en exfumadores<sup>23</sup>. En esta línea podemos concluir que dejar de fumar a consecuencia del diagnóstico de un PT en cabeza y cuello es beneficioso al reducir el riesgo de un STP, mientras que seguir fumando eleva el riesgo tres veces más<sup>26</sup>.

El consumo de alcohol previo a la aparición del PT es también un factor que incrementa el riesgo de aparición de un STP en la VAS hasta tres veces<sup>27</sup>.

Otros factores implicados en el CECC como el reflujo faringolaríngeo, VPH y diversos químicos no tienen rasgos diferentes cuando se desarrolla un STP.

Además de los carcinógenos externos, hay algunos factores genéticos intrínsecos que pueden influir en el riesgo de desarrollar un STP. Estos factores podrían ser relevantes en la aparición del STP en pacientes no fumadores y no bebedores<sup>28</sup>. En el 16% de esta población compuesta mayoritariamente por mujeres de edad avanzada y PT localizados en cavidad oral, se observa la aparición de un STP<sup>28,29</sup>. Los factores genéticos podrían relacionarse con las vías de detoxificación y la susceptibilidad a sustancias mutagénicas<sup>21,30,31,32,33</sup>. Igualmente, se ha observado que la aparición del STP está relacionada de forma significativa con los polimorfismos en los genes *GSTT1* (glutathión S transferasa theta 1), *TNFB* (factor de necrosis tumoral beta)<sup>32,34</sup>.

Se ha comprobado que los pacientes con CECC, que desarrollan un STP, tienen tendencia a poseer ciertos alelos del antígeno de leucocitos humanos (HLA), con menor número de algunos alotipos de inmunoglobulinas. Estos hechos sugieren cierta influencia genética en el desarrollo de los STP<sup>35</sup>.

Los pacientes de mayor edad o que presenten un PT en estadio avanzado desarrollan menos STP, teniendo más riesgo los sujetos jóvenes con estadios precoces de su PT. Este hecho podría deberse a que los pacientes ancianos tienen menor supervivencia global y, por tanto, menos tiempo para desarrollar el STP<sup>16,36</sup>, aunque no todos los autores están de acuerdo con estas observaciones<sup>17,37</sup>.

No está demostrado que el tratamiento del PT con radioterapia radical o complementaria a la cirugía se asocie a mayor incidencia de STP por un posible efecto carcinogénico<sup>16,38</sup>. Por el contrario, el tratamiento con radioterapia en los CECC localizados se asocia a una reducción significativa de STP, sobre todo en los PT de faringe, sugiriendo un potencial efecto terapéutico de la radioterapia al erradicar focos ocultos de STP<sup>39</sup>. Sin embargo, se ha visto que los tumores metacrónicos desarrollados en áreas previamente radiadas tienen peor pronóstico<sup>11</sup>.

En el caso de las RT el consumo de tabaco y el alcohol tras el tratamiento inicial del PT se asocia de forma significativa con su alto riesgo. Otros factores como la diferenciación histológica del tejido tumoral, los cambios genéticos en determinadas regiones cromosómicas y la expresión de ciertas proteínas (metaloproteasas, factores de crecimiento) han sido frecuentemente implicados en su desarrollo<sup>40</sup>. El tamaño del PT y su grado histopatológico se han relacionado también con la aparición de RT precoces; mientras que la expresión de los genes *CCND1* y *TNF BI D5* parecen hacerlo con las RT tardías pasados cinco años<sup>34</sup>. La localización supraglótica del PT y la presencia de metástasis ganglionares son factores de riesgo en la aparición de la RT<sup>41</sup>. Sin embargo, la utilización de radioterapia en el PT no se asocia con el incremento de RT ni influye en la supervivencia global<sup>42</sup>.

#### 2.1.4 Sexo

Al igual que sucede con la mayoría de los CECC, los STP son más frecuentes en varones, aunque también se han visto en mujeres como ocurre en el Síndrome de Lynch. Algo similar ocurre con las RT<sup>41,43,44</sup>.

### 2.1.5 Cronología

No hay una edad bien definida para el desarrollo de los STP, como se ha visto en las distintas localizaciones del CECC. Los STP suelen aparecer unos tres años después del diagnóstico del PT, aunque los de origen pulmonar son más precoces (30 meses) que los de cabeza y cuello (47 meses)<sup>16</sup>. Los pacientes más jóvenes y con mayor supervivencia después haber padecido un CECC tienen mayor riesgo de desarrollarlos<sup>16,36</sup>.

La mayoría de las RT se suelen diagnosticar en el primer año de seguimiento, sobre todo en el primer semestre. El tiempo medio de aparición de la RT en los tumores faríngeos está en torno a los 11 meses, mientras en el caso de los tumores de laringe ese intervalo se amplía a los 15 meses<sup>20</sup>. Los tumores que recidivan antes de ese período de tiempo, después del tratamiento inicial, suelen tener peor pronóstico<sup>44,45</sup>.

Aunque parece existir relación entre la edad de diagnóstico de la RT y el pronóstico, los estudios recopilados muestran resultados contradictorios<sup>46,47</sup>.

### 2.1.6 Histopatología

La mayoría de los STP son carcinomas epidermoides o escamosos y sólo en el 10% se trata de adenocarcinomas. El tipo histológico influye en la supervivencia, siendo mayor en los pacientes con tumores escamosos que en las otras estirpes histopatológicas (33% versus 20% a los tres años)<sup>16</sup>. Se ha visto cierta influencia del grado histológico de PT en el desarrollo posterior de STP, observando mayor riesgo en los pacientes con CECC bien o moderadamente diferenciados<sup>3</sup>.

Las RT como vimos anteriormente al revisar el concepto, deberían compartir la estirpe histológica con el PT<sup>7</sup>.

### 2.1.7 Localización

Los STP se localizan con mayor frecuencia en la región de cabeza y cuello (35-50%), pulmón (25-32%) y esófago (9%), mientras que el 9-31% restante lo hace en otras zonas distintas (Figura 1)<sup>17,48</sup>. La localización del PT condiciona la frecuencia y el asiento del STP, con tendencia a establecer determinadas



asociaciones. Así, la localización del PT que más se asocia con el desarrollo de un STP es la laringe supraglótica, seguida por la cavidad oral y la laringe glótica<sup>17,48,49</sup>. Los STP sincrónicos suelen localizarse en zonas anatómicas próximas al PT, mientras los STP metacrónicos tienden a estar más dispersos, en el eje respiratorio (laringe-pulmón) y digestivo (faringe-esófago). Estas asociaciones sugieren promotores comunes, estando los tumores de la vía respiratoria más relacionados con la exposición al tabaco, y los de la vía digestiva, incluyendo laringe supraglótica, con la asociación de tabaco y alcohol<sup>17,50</sup>. El riesgo relativo de un STP pulmonar en los cánceres de laringe supraglótica es más del doble que en la laringe glótica, siendo esta relación aún superior si el tumor pulmonar era de tipo indiferenciado<sup>49,50</sup>.

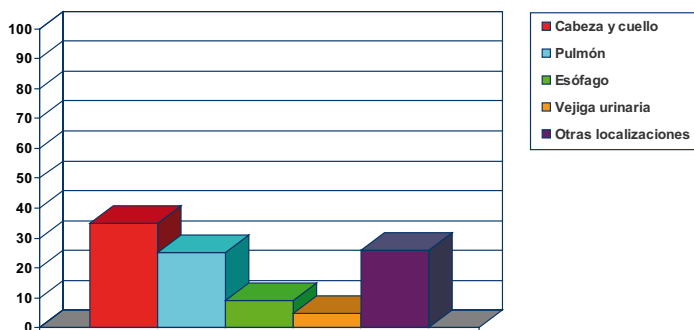


Figura 1. Localizaciones más frecuentes de los STP.

En relación a las RT, son los tumores localizados en oro e hipofaringe los que presentan el porcentaje más alto<sup>20,44</sup>. En algunos estudios predominaban las recidivas locorreccionales (50%)<sup>20</sup>, si bien en otros eran las recidivas locales (20-30%), siendo menor el porcentaje de recidivas locorreccionales (10-15%)<sup>51</sup>. La recidiva local se observa más en tumores glóticos, rinofaringe y cavidad oral<sup>20,44,45</sup>. La recidiva locorrecciona predomina en orofaringe, hipofaringe y supraglotis, sobre todo con ganglios afectados, mientras que la estomacal lo hace en tumores glóticos<sup>20,52</sup>.

### 2.1.8 Estadificación

El STP se clasifica igual que el PT de la zona en la que asienta, pero en la categoría T debe figurar en subíndice y entre paréntesis «m» o bien el número de tumor que ocupa T2(m) o T2(2). Al final para describir toda la patología neoplásica del paciente habría que poner el TNM de todas sus localizaciones tumorales. En el caso de órganos distintos, lógicamente se utilizará la estadificación específica<sup>53</sup>. Los STP tienden a presentarse en estadios más avanzados que los PT que los precedieron, pues en estos PT predominan los estadios precoces<sup>5,6,14,15</sup>.

Al contrario, en el caso de las RT los PT suelen diagnosticarse en estadios avanzados. Este estadio del PT guarda relación con la supervivencia después de la RT, pero el estadio de la RT no, como se ha visto en tumores de la cavidad oral<sup>45</sup>, si bien en este punto también existe discrepancia<sup>20</sup>.

### 2.1.9 Diagnóstico

La búsqueda del STP debe formar parte del protocolo de estudio y valoración del CECC. Este control debe realizarse durante el seguimiento, pues son más frecuentes los tumores metacrónicos que los sincrónicos y simultáneos. Además, en estos últimos, el PT suele ser responsable de la mayoría de los síntomas<sup>22</sup>. Los STP metacrónicos aparecen tres años después del diagnóstico del PT, siendo los originados en cabeza y cuello, como ya hemos señalado, más tardíos que los pulmonares<sup>16</sup>. En la historia clínica se deben constatar síntomas como pérdida de peso, disfagia, disfonía, dolor y hemoptisis, además de otros intestinales y/o urinarios, que deben interrogarse tanto durante la primera visita como en el seguimiento<sup>15</sup>. La exploración completa de toda la VAS, incluyendo estudios de imagen (TAC, RNM, radiografías de tórax) y endoscopia digestiva, nos llevará al diagnóstico del segundo tumor<sup>16,17,54</sup>, aunque su resolución puede verse limitada por las alteraciones anatómicas, el edema y la fibrosis consecuente del tratamiento previo. En los tumores tratados con protocolos de quimio-radioterapia los cambios tisulares secundarios al tratamiento recibido podrían confundirse con una persistencia o RT. Se ha objetivado que los estudios de imagen en el seguimiento de estos pacientes son menos efectivos para detectar la RT que los realizados a los pacientes con

un primer control post tratamiento inmediato<sup>55</sup>. Sin embargo, los cambios tisulares post quimio-radioterapia también progresan a lo largo del seguimiento y en ocasiones no resulta tan sencillo descartar la existencia de RT<sup>56</sup>.

En el caso de las RT, pese al empleo de las técnicas descritas anteriormente en el seguimiento, se observó que éstas no eran eficaces para su diagnóstico precoz<sup>57,58</sup>.

La endoscopia en sus diversas modalidades debe realizarse de forma sistemática, no sólo para el diagnóstico del STP, sino también para su estadificación. No obstante, el empleo rutinario del faringoesofagograma y de la panendoscopia durante el seguimiento de pacientes con CECC obtiene bajo rendimiento en la relación coste/beneficio<sup>10</sup>. Así, la endoscopia y la radiología suelen subestimar en un 50% la verdadera extensión de la lesión<sup>59</sup>.

El estudio de la citología esofágica mediante cepillado durante la endoscopia parece útil en la detección precoz del cáncer de esófago, pero no en la localización de otros STP más frecuentes<sup>60</sup>.

La laringoscopia directa con toma de biopsia en pacientes con un PT tratado con quimio-radioterapia tiene una alta tasa de falsos negativos para descartar una RT<sup>59,61,62</sup>. Esto se debe a errores en la toma de la muestra, al tener las RT un patrón de crecimiento distinto al de los CECC que aparecen de novo. Las RT surgen en múltiples focos dispersos en diferentes regiones, incluso bajo una mucosa aparentemente normal, estando ocultas a la endoscopia<sup>63</sup>.

El valor de la ecografía y de la «eco-doppler» en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con CECC tiene muchas limitaciones, como son las lesiones superficiales de glotis y nasofaringe, además de zonas edematosas, distorsionadas por el tratamiento inicial del PT<sup>14</sup>.

Las radiografías de tórax se realizan habitualmente cada 6-12 meses, durante el seguimiento del paciente, no sólo para diagnosticar el STP, sino también las MD, aunque son poco útiles en el diagnóstico precoz<sup>15,17,60</sup>. Las bronoscopias periódicas tampoco han demostrado beneficios importantes en el seguimiento de los pacientes con CECC.

Los procedimientos endoscópicos de autofluorescencia constituyen, con experiencia, una herramienta útil en el diagnóstico precoz<sup>64</sup>.

La RNM de difusión parece obtener resultados prometedores en la detección de RT, sobre todo en los pacientes sometidos a quimio-radioterapia<sup>65</sup>.

Es importante para el seguimiento el diseño de protocolos específicos para el diagnóstico del STP. Así, los pacientes diagnosticados de un PT en laringe, especialmente los que persisten en el tabaco, tienen riesgo elevado de desarrollar un STP pulmonar y precisarían endoscopias y técnicas de imagen para descartar patología torácica; mientras que los pacientes con PT localizados en la cavidad oral-faringe necesitarían sobre todo endoscopias digestivas, con el fin de detectar el STP en su fase precoz. Se recomienda realizar una revisión anual, pasados los cinco años, que incluya una exploración otorrinolaringológica completa y una radiografía de tórax, sobre todo en los pacientes que continúan fumando<sup>50</sup>.

En el caso de las RT que surgen casi siempre en los PT en estadio avanzado, hay que tener en cuenta que la detección precoz de la recidiva no mejora la supervivencia, que sí estaría condicionada por el tratamiento del PT. Se ha puesto en entredicho la efectividad de los métodos clínicos habituales en el diagnóstico de las RT, especialmente cuando éstas son tardías<sup>66</sup>. Sería más útil hacer el diagnóstico precoz del PT o tratar de forma radical los CECC con estadio avanzado<sup>67</sup>. La supervivencia después de una RT podría atribuirse al tipo de recidiva, ausencia de morbilidad y alternativas terapéuticas, en vez de a la detección precoz durante el seguimiento<sup>68</sup>.

La PET ha obtenido resultados satisfactorios en el diagnóstico de RT en el CECC, pero no parece útil en el diagnóstico de los STP<sup>69</sup>. Hay quien sugiere que ante la sospecha clínica de RT se debe realizar una PET como primer paso diagnóstico, no siendo necesario biopsia en caso de negatividad de dicha prueba<sup>61</sup>. Así, se han propuesto como alternativas en el seguimiento clínico la realización de PET 18 F fluor-desoxiglucosa (FDG) y la determinación seriada de algunos marcadores tumorales, especialmente en los primeros meses, donde el riesgo de recidiva es mayor y es factible el diagnóstico precoz<sup>57, 58</sup>.

La metilación de determinados genes en saliva de pacientes con CECC ha permitido la detección precoz de la RT, como se ha demostrado recientemente. Esta técnica se muestra superior a la PET, si bien su eficacia se reduce al

no haberse identificado una alteración génica común para todos los CECC. La metilación se observa en todas las fases de la progresión tumoral, incluso años antes de la aparición de la RT<sup>70</sup>.

El diagnóstico precoz y el seguimiento exhaustivo han sido señalados como cruciales para mejorar la supervivencia, pero el número de revisiones y su periodicidad no determinan el diagnóstico precoz de la RT, aunque sí suponen un importante coste económico<sup>8,66,71</sup>.

Podemos concluir este apartado diciendo que no existe un protocolo eficaz para hacer el diagnóstico precoz de los STP y RT en los pacientes con CECC. Además, un buen número de STP se diagnostican pasados los 5 años del diagnóstico del PT, por lo que debería recomendarse un seguimiento mínimo de 10 años, sobre todo en los pacientes de alto riesgo que persisten con los hábitos de alcohol y tabaco<sup>14</sup>. Se debe destacar la importancia del primer año de seguimiento, debido a que en ese período ocurren además la mayoría de las RT y MD<sup>1</sup>.

La asociación entre STP y RT es un hecho relativamente frecuente, radicando la confusión principal en los STC que surgen en la misma zona del PT. Muchos de esos STC se etiquetan de RT aunque no son verdaderas recidivas, pues aunque presenten características comunes no son genéticamente idénticos al PT<sup>7,72</sup>.

#### *2.1.10 Tratamiento*

En este apartado se exponen de forma general los aspectos que condicionan la actitud terapéutica en los STP y RT. Esta actitud suele ser quirúrgica, valorando la quimio y/o radioterapia complementaria según el tratamiento previo recibido para su PT. La cirugía obtiene los mejores resultados, tanto en el tratamiento del PT como del STP, pero en estos últimos son peores a igualdad de histopatología y estadio<sup>14,50</sup>.

Es frecuente que el tratamiento del PT limite el uso de la cirugía o de la radioterapia de un STP localizado en la misma zona. En esos casos podría tener interés la terapia fotodinámica y la radioinmunoterapia, pero necesitan más estudios que corroboren sus resultados<sup>73</sup>. En el caso concreto de la terapia

fotodinámica se consiguen 85% de curaciones en STP en estadio I, pero éstas se reducen al 38% en estadios II/III. Aporta como ventajas que puede ser utilizada en múltiples sesiones y no compromete futuras cirugías ni la radioterapia posterior<sup>74</sup>. Además, actúa únicamente sobre el área iluminada y no daña el colágeno subepitelial ni la elastina, por lo que preserva los elementos celulares de sostén, base de la regeneración tisular<sup>75</sup>.

En las RT se suele indicar como tratamiento curativo la cirugía de rescate y la posterior reconstrucción funcional, si bien la indicación dependerá del tipo de recidiva, localización y estado general del paciente<sup>8,45,71,76,77,78</sup>. Aunque la cirugía es técnicamente posible en la mayoría de las RT diagnosticadas en estadio avanzado, la realidad es que dicho tratamiento no suele aportar muchos beneficios desde el punto de vista paliativo y de supervivencia. Se considera que los mejores candidatos para la cirugía de rescate agresiva en las RT son los pacientes no fumadores y con estadios T1 y T2<sup>79</sup>. Hay que tener en cuenta que es una cirugía no exenta de riesgo al incrementar el tiempo quirúrgico en pacientes con mal estado general. Además, tiene un alto coste económico asociado a la morbilidad postoperatoria, al crear una segunda herida quirúrgica en la zona donante del colgajo, precisando mayor vigilancia postoperatoria<sup>79,80</sup>.

En las RT de cavidad oral y orofaringe la supervivencia con la cirugía de rescate es superior a la obtenida con quimio-radioterapia<sup>8,45,81</sup>, siendo considerada en esta localización el tratamiento de elección, especialmente cuando el tratamiento del pT ya incluyó radioterapia<sup>46,82</sup>. Es necesario precisar que tras la radioterapia radical avanzada se reducen mucho los candidatos a cirugía de rescate, por lo que es necesario extremar el diagnóstico precoz e indicarla en un primer momento, cuando la RT es pequeña.

El láser puede ser empleado en las RT o persistencias del cáncer glótico después de la radioterapia con buenos resultados oncológicos y funcionales, pero menos complicaciones que la cirugía abierta, reservando la laringuectomía total para sus fracasos<sup>77</sup>. Se describe que en el 40% de casos es necesaria más de una cirugía láser<sup>83</sup>, pero aún así las tasas de control local son elevadas<sup>77,83,84</sup>. Hay que resaltar en la cirugía láser la importancia de las biopsias intraoperatorias, que han de ser utilizadas de forma rutinaria para

confirmar todos los márgenes quirúrgicos. Después de esta cirugía son necesarias las revisiones periódicas mediante nasofibroscofia y pruebas de imagen para detectar precozmente las RT, pudiendo volver a emplear el láser para el tratamiento de las RT<sup>85</sup>.

La laringuectomía total realizada en RT tras radioterapia o cirugía parcial tiene resultados aceptables, tanto en tumores glóticos como en supraglóticos<sup>71,76,78</sup>. Es posible realizar una cirugía parcial en las RT laríngeas post radioterapia habiéndose descritos buenos resultados oncológicos y funcionales, tanto con la laringuectomía supracricoidea como con la laringuectomía vertical y horizontal supraglótica<sup>86,87</sup>.

La cirugía de rescate en el caso de RT de tumores faríngeos tras quimio-radioterapia tiene muy malos resultados en cuanto a supervivencia y calidad de vida, siendo muchos autores los que la desaconsejan<sup>71,88</sup>.

Se preconiza realizar vaciamientos cervicales en los pacientes con evidencia clínica o citológica de enfermedad metastásica en los ganglios regionales. Sin embargo, no está bien definido el tratamiento del cuello en los pacientes subsidiarios de cirugía de rescate por su RT, pero clínicamente N0<sup>89</sup>. Para algunos autores la realización del vaciamiento estaría condicionada por el estadio T de la RT y la extensión supraglótica, subglótica o extralaríngea de la lesión<sup>90</sup>.

Por tanto, en las RT avanzadas, con escasa supervivencia, se preconiza el uso de la quimio-radioterapia, reirradiación postcirugía de rescate, quimioterapia y terapia biológica<sup>91,92</sup>. El empleo de esta terapia trimodal (cirugía de rescate, quimioterapia y reirradiación) ha sido propuesta en RT y STP con una supervivencia global del 22%, mejorando el control local y las metástasis, pero limitando su uso a ensayos clínicos por sus efectos secundarios (17%), entre los que se incluyen la rotura de carótida (4%)<sup>88,92</sup>. Otros autores observan mayor radiotoxicidad con la reirradiación, pero sin que ésta modifique sustancialmente la calidad de vida<sup>91</sup>. La reirradiación empleando radioterapia convencional logra unos porcentajes del 25-60% en el control de la recidiva locorregional, así como una supervivencia del 15 al 93%. La causa de estas diferencias entre los distintos estudios publicados se debe a la selección del paciente, la histopatología, el empleo de cirugía y/o quimioterapia asociada

a la reirradiación, así como las distintas técnicas de irradiación empleadas. En este sentido, el empleo de la radioterapia de intensidad modulada se ha relacionado con las mayores tasas de supervivencia<sup>91,92,93</sup>.

La quimioterapia con 5 fluorouracilo y cisplatino, aunque no se asocia con curación de la enfermedad a largo plazo, podría ser utilizada con fines paliativos. Las respuestas ocurren en un tercio de los pacientes, pero son parciales y de corta duración. Entre el 30-60% de pacientes tratados con quimioterapia paliativa responden al tratamiento con una supervivencia media de 6 a 9 meses<sup>94,95</sup>.

Los aspectos preventivos con retinoides sintéticos y análogos de la vitamina A también han sido estudiados, sobre todo en lo que respecta a los STP de las vas, siendo su eficacia puesta en entredicho. Lo cierto es que parecen frenar la evolución de las lesiones preinvasivas que surgen en el «campo de cancerización», pero deben ser empleados de forma continua a dosis muy altas, con múltiples efectos secundarios. Su mecanismo de acción se explica al actuar sobre la expresión de genes reguladores del crecimiento y diferenciación celular, sobre todo en etapas precoces de la carcinogénesis<sup>96</sup>.

Los inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) podrían tener también un papel destacado en la quimioprevención. Este enzima parece contribuir a la progresión del cáncer mediante los productos de su acción catalítica, estimulando la proliferación y angiogénesis, modulando la respuesta inmune e inhibiendo la apoptosis. Además, la inhibición de la sobreexpresión de COX-2 podría ser uno de los mecanismos por el que los retinoides inhiben la progresión de la displasia<sup>97</sup>. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha no han confirmado las expectativas iniciales<sup>98</sup>.

Otro grupo de fármacos con interés en la quimioprevención son los antioxidantes como la N-acetil cisteína o el licopeno, pero sólo han demostrado su efectividad en el tratamiento de displasias orales<sup>99</sup>. El empleo del adenovirus ONYX-015 en forma de enjuagues bucales en lesiones premalignas orales ha obtenido resultados prometedores, si bien este estudio se halla en fase de ensayo clínico<sup>100</sup>. Los polifenoles del té verde inducen la apoptosis en muchas líneas celulares tumorales, incluyendo las derivadas de cáncer de



cavidad oral, aunque aún no se han iniciado estudios controlados sobre su empleo en la prevención del cáncer<sup>101</sup>. Al igual sucede con los potenciales efectos anticancerígenos de las frambuesas negras que parecen inhibir la aparición de neoplasias en la cavidad oral<sup>102</sup>.

### *2.1.11 Pronóstico*

En general, el pronóstico de los STP es mejor que el de las RT y MD<sup>36,103</sup>.

Los pacientes con STP sincrónicos, PT en estadios avanzados y STP no localizados en cabeza y cuello suelen tener peor pronóstico<sup>37,104</sup>. En la región de cabeza y cuello el tratamiento quirúrgico suele ser posible y el pronóstico es menos sombrío que cuando se localizan en pulmón o esófago<sup>15,36,50</sup>.

Los STP se presentan en general en estadios más avanzados que los PT, sin embargo en los tumores simultáneos, la mayoría de los síntomas se deben al PT, teniendo los sincrónicos peor pronóstico que los metacrónicos (Figura 2)<sup>14,22</sup>. En la actualidad podemos considerar que los STP son la principal causa de mortalidad en los pacientes con CECC en estadios iniciales<sup>10,15,54</sup>.

Respecto al sexo, las mujeres tienen un pronóstico más favorable que los varones<sup>23,105</sup>.

El impacto en la supervivencia del STP es peor que el del PT en la misma localización, sobre todo en laringe glótica y orofaringe (amígdala), pero es similar en cavidad oral (lengua) e hipofaringe<sup>106</sup>. Esta distinta supervivencia para la misma localización depende del tipo de tratamiento recibido en el PT, del estadio del STP y del estado general del paciente, este último determinado por las anteriores circunstancias<sup>106</sup>. Es posible que la radioterapia influya negativamente en la supervivencia, pues con ella los diagnósticos del STP suelen ser más tardíos, además de aumentar la morbimortalidad de la cirugía<sup>107</sup>. No obstante, también podría tener un efecto beneficioso al eliminar de forma precoz tumores simultáneos o sincrónicos. Por tanto, es muy difícil establecer esta relación de forma directa, estando condicionada por otros factores. Los pacientes con STP en la VAS presentan una supervivencia global a los 5 años del 36%, aumentando al 58% si el tumor se desarrolla en cabeza y cuello y reduciéndose si lo hace en pulmón (12%) y esófago (6%) (Figura 2)<sup>22</sup>.

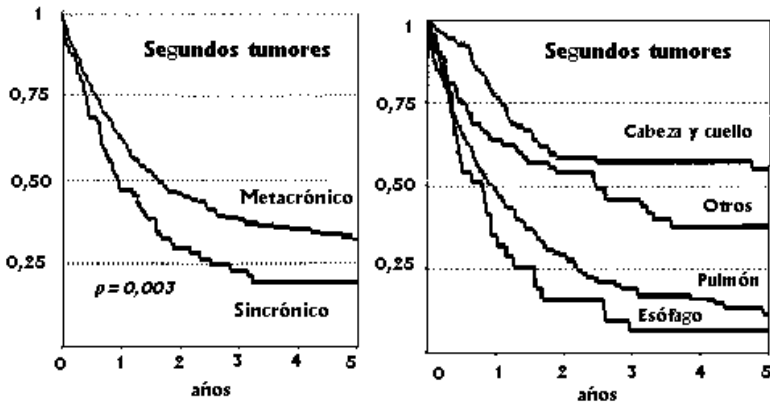


Figura 2. Supervivencia de los STP según el tiempo y el lugar de asiento. Los tumores localizados en pulmón y esófago tienen menor supervivencia (modificado de Leon X<sup>22</sup>).

Las RT suelen ser la principal causa mortalidad en los primeros años del seguimiento del paciente diagnosticado de CECC, sobre todo tumores de estadio avanzado, mientras que los STP lo son a largo plazo y en estadios precoces<sup>37</sup>.

La mayoría de las RT tienen lugar en el primer año de seguimiento, siendo la supervivencia media, en caso de mala evolución, de 6 meses<sup>8</sup>. La supervivencia oscila entre el 22-44%<sup>44,91,92,108</sup>, si bien suelen referirse a localizaciones como la cavidad oral, o son casos tratados de forma radical con radioquimioterapia o reirradiación, excluyendo el tratamiento paliativo<sup>88</sup>.

Los pacientes intervenidos de un CECC que no muestran signos de RT en el primer año de seguimiento tienen un pronóstico favorable<sup>46</sup>. Esto se debe a que un tumor biológicamente agresivo tendría un período de latencia corto hasta la recidiva y un pronóstico desfavorable<sup>43</sup>. La RT se desarrollaría desde células tumorales residuales localizadas en el tejido fibrótico cicatricial post cirugía o radioterapia<sup>108</sup>. La localización del PT influye en la detección precoz de las RT, como se ha visto en carcinomas de orofaringe y cavidad oral. El pronóstico tras el diagnóstico de una RT es mejor en pacientes con más de 60 años, pues la inestabilidad genética de los pacientes condicionaría su peor evolución<sup>81</sup>. Sin embargo, el género no parece ser un factor pronóstico

en las RT del cáncer orofaríngeo<sup>109</sup>, aunque otros autores obtienen resultados discrepantes<sup>1,110</sup>.

Las RT en la nasofaringe tienen mejor pronóstico si se comparan con otros tumores faríngeos y otras localizaciones de la cabeza y cuello<sup>111</sup>.

Otros factores pronósticos relacionados con la supervivencia en los STP y RT, especialmente en el cáncer de laringe, serían: persistencia del tabaco tras el tratamiento del PT, estadio TNM, histopatología, cifra baja de hemoglobina previa al tratamiento, diabetes mellitus, Karnofsky <80, dosis de radioterapia < a 2 Gy/día o total < a 65 Gy y tratamientos prolongados más de 50 días<sup>41,112,113</sup>.





### 3. Estado actual



### 3.1 Modelos de progresión

El término «campo de cancerización» se utilizó por primera vez por Slaughter<sup>14</sup> en el cáncer de la cavidad oral. Se refería a los cambios encontrados en el epitelio «normal» que rodeaba esos tumores. Este autor observó cambios histológicos multicéntricos en el 11% de los casos, sugiriendo que eran debidos a la exposición de la mucosa de las VAS a carcinógenos similares, con mayor susceptibilidad a desarrollar múltiples focos de transformación maligna<sup>14</sup>. El ejemplo clásico sería el desarrollo de múltiples tumores, inducidos por el tabaco, en distintos órganos a nivel de la VAS, pulmón y esófago. Así se producirían múltiples transformaciones genéticas en toda la mucosa que originarían tumores no relacionados genéticamente.

Aunque concretó la definición de «campo de cancerización», planteó algunas cuestiones dentro de ese concepto de transformación en la mucosa que podrían explicar el desarrollo de RT y STP después de la cirugía. Esta teoría fue ampliamente aceptada y constituyó la base de los ensayos de quimioprevención en pacientes con lesiones premalignas y CECC<sup>15</sup>.

Otra teoría sobre el origen de los STP establece que la transformación es excepcional, sugiriendo que los STP se deben a la «diseminación» de células transformadas/mutadas a través de la VAS. Hay dos tipos de diseminación aceptados: 1) La de células tumorales a través de saliva (micrometástasis). 2) La intraepitelial de un clon de células madre inicialmente mutadas.

Este concepto de metástasis «local» es diferente al que se conoce en el CECC. Habitualmente las células metastásicas migran a través del sistema linfático o de la sangre para colonizar ganglios linfáticos y órganos distales (pulmón,



hígado), pero esa ruta no llevaría a las células tumorales a la superficie mucosa que recubre la vas<sup>16,117,118,119</sup>. Esta última teoría podría explicar la aparición de STP en pacientes sin hábitos tóxicos<sup>28</sup>.

En la figura 3 presentamos en esquema las dos teorías y las posibilidades de migración local de las células tumorales.



Figura 3. Esquema de las teorías de campo de cancerización (modificado de van Oijen MG<sup>119</sup>).

Finalmente nos referiremos al último modelo de progresión propuesto hasta la fecha, denominado modelo «parche-campo-carcinoma» («*the patch-field-carcinoma model*»). Se basa en los cambios genéticos ocurridos en el

«campo de cancerización» de los pacientes con CECC y su relación con las RT y STP. En una fase inicial, una célula madre o «*stem cell*» de la zona suprabasal del epitelio adquiere uno o más cambios genéticos, probablemente una mutación en el gen *p53*. Se estima que la transformación de una célula normal a célula maligna necesita al menos cinco alteraciones génicas y, por tanto, sólo las células que permanezcan mucho tiempo en el epitelio pueden acumular este número de alteraciones<sup>120,121</sup>. De esta célula transformada se origina el grupo/parche de células («*patch*»), formado por la célula madre y sus células hijas, con un tamaño aproximado de 200 células de diámetro, que comparten la misma carga genética. Al acumularse los cambios genéticos, la célula madre se escapa del mecanismo de control del crecimiento celular y adquiere una ventaja de crecimiento, expandiéndose las células del «*patch*» hacia los lados con lo que se origina un campo («*field*»). Así, áreas extensas de epitelio normal son remplazadas por poblaciones celulares de origen monoclonal que comparten las mismas alteraciones genéticas. La divergencia clonal, la selección y la expansión son procesos cruciales durante el desarrollo del campo. Se sabe que los campos en expansión están caracterizados por la LOH en 3p12-24, 8p22-23, 9p21 (*p16*), 17p13 (*p53*) y 8q12. Los «campos de cancerización» son una amenaza constante para el paciente, debido a que la selección clonal conduce al desarrollo de un clon maligno dentro del campo con características de invasividad y potencial metastásico<sup>122</sup>. La amplificación de la ciclina D1 (*CCND1*) localizada en 11q13 también interviene en la selección de este clon maligno<sup>123</sup>.

Este modelo tiene importancia clínica debido a que los campos suelen persistir después del tratamiento quirúrgico del PT, desarrollando nuevos tumores denominados segundos tumores de campo (STC) o «*second field tumor*» (SFT). Los STC son una entidad peculiar que no deben considerarse recidivas o STP (Figura 4)<sup>124</sup>. El modelo «parche-campo-carcinoma» se ajusta y explica el fenómeno de la multicentricidad en cabeza y cuello, pero no es convincente para explicar el desarrollo de STP en otras áreas anatómicas como pulmón, colon y vejiga<sup>115</sup>.

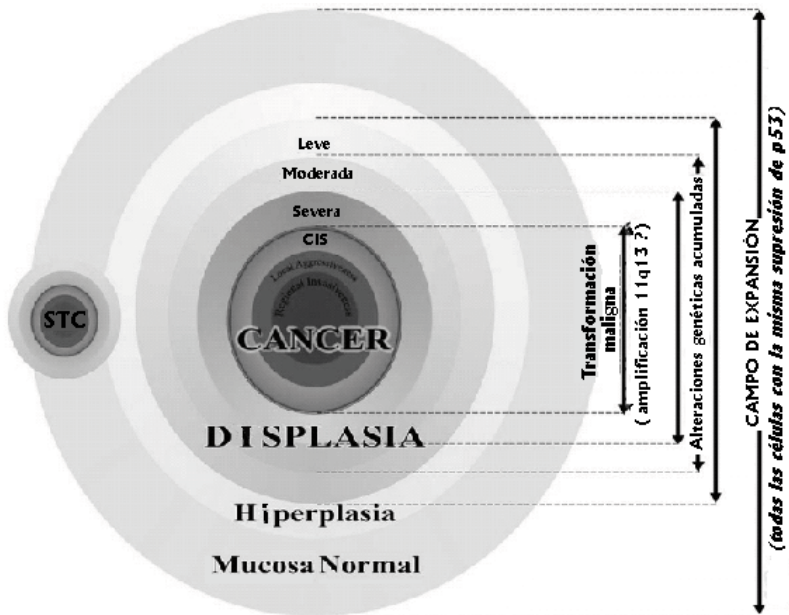


Figura 4. Campo de cancerización. Progresión espacio/temporal y principales cambios genéticos (modificado de Almadori G<sup>115</sup>).

### 3.2 Genética y multicentricidad

#### 3.2.1 Progresión genética

En los últimos años se abordó el estudio de la base molecular en el desarrollo del cáncer y se han propuesto modelos de progresión genética para varios tipos de tumores, incluyendo el CECC<sup>117,125,126</sup>. Se estableció que el acúmulo de alteraciones génicas es la base de la progresión desde la célula normal a la célula cancerígena. Esto es lo que se conoce como proceso de «*multistep carcinogenesis*».

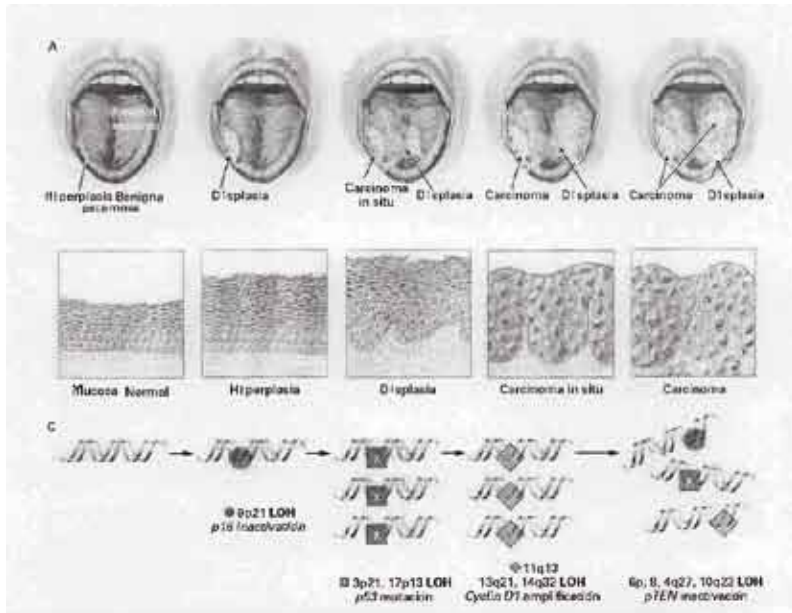


Figura 5. Progresión clínico-patológica y molecular del cáncer oral (modificado de Forastiere A<sup>126</sup>).

El primer modelo genético propuesto en el CECC lo presentó Califano<sup>117</sup>. La pérdida de la región cromosómica 9p21, que contiene el gen *p16*, es el primero de los cambios observados, así como el más habitual y reproducible<sup>127</sup>. La LOH junto con la hipermetilación de promotores en ese locus provoca la inactivación de *p16*, gen supresor de la quinasa dependiente de la ciclina (*CDK*). Esta alteración ocurre antes de la aparición de la atipia histológica y puede encontrarse en la mucosa hiperplásica, poniendo de relieve la limitación de la histología clásica en el diagnóstico precoz. La LOH en 3p es otra alteración temprana en el desarrollo del CECC. Se han descubierto tres regiones distintas en la deleción 3p, cada una con un potencial gen supresor aún no descrito<sup>128</sup>. La LOH en 17p13 con la mutación/inactivación del gen supresor de tumores *p53* tiene lugar en el 50% de los CECC, asociándose la expresión proteica del gen con la progresión de displasia a cáncer (Figura 5)<sup>129</sup>.

Se ha demostrado también que las alteraciones génicas en 4q, 6p, 8p, 11q, 13q y 14q podrían actuar como marcadores de progresión a malignidad. La amplificación y sobreexpresión del gen *CCND1* (11q13), que activa el ciclo celular es, por el contrario, un acontecimiento tardío. Este cambio se observa en el 40-60% de los CECC y se asocia con peor pronóstico al implicar una ventaja en el crecimiento e invasión de ciertos clones celulares<sup>130,131</sup>.

Sin embargo, aunque todos estos datos han ido creando un modelo de progresión que se muestra en la figura 5, este modelo está incompleto y tiene muchos puntos oscuros. Así, mientras algunas alteraciones génicas son bien conocidas (*P16*, *P53* y *CCND1*), la mayoría de los genes implicados son aún desconocidos. Además, este esquema no tiene en cuenta alteraciones génicas bien establecidas, como la del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), sobreexpresado en muchos CECC, que ha sido utilizado con fines terapéuticos en otros tipos de tumores<sup>132,133</sup>.

A nivel cromosómico se han descrito pérdidas en 9p, 3p y 17p, que se corresponden con genes implicados en los primeros pasos del desarrollo de los CECC, siendo marcadores precoces de la carcinogénesis. No obstante, las pérdidas cromosómicas en 13q, 18q y 8p parece que ocurren tardíamente y podrían servir para establecer diferencias entre el campo y el tumor<sup>117</sup>. Las alteraciones cromosómicas implicarían una alteración en la función de los genes y se traducirían en la expresión anormal de la proteína que codifican. Una de las más importantes, ampliamente estudiada, es la proteína *P53*. Su expresión se relaciona con el aumento en el número de RT precoces y STP en el CECC<sup>134</sup>. Otra alteración como la amplificación del protooncogén de la *CCND1* se asocia a mayor incidencia de tumores metacrónicos<sup>135</sup>.

El análisis de microsatélites puede ser útil para distinguir las MD de los STP. Estudios con FISH confirman la existencia de inestabilidad genómica en la mucosa «sana» distante al tumor. Esa inestabilidad se incrementa en los pacientes con sobreexpresión de *P53* y se acompaña de una monosomía selectiva del cromosoma 17, donde se localiza *P53*. De forma conjunta estos dos biomarcadores podrían representar un cambio precoz en el proceso de campo de cancerización<sup>136</sup>.

Por otro lado, los análisis con LOH y CGH han permitido identificar áreas cromosómicas implicadas en el proceso de carcinogénesis, de las que aún se desconocen muchos de los genes que las integran<sup>137</sup>.

Mediante CGH se ha evidenciado que el perfil genético de los CECC es una compleja suma de pérdidas y ganancias de ADN en todo el genoma, incrementando el número de alteraciones desde lesiones preinvasivas a carcinomas con estadios T progresivos y metastáticos<sup>138</sup>. Así, parece confirmarse la teoría del «acúmulo de alteraciones génicas» en la progresión tumoral. Se ha demostrado que los tumores con tendencia a metastatizar tienen más alteraciones génicas que los que no presentan esa evolución<sup>139</sup>. En el primer grupo predominan las pérdidas de ADN, mientras que en el segundo lo hacen las ganancias<sup>40</sup>. Este hecho apunta a que las deleciones son esenciales para adquirir la capacidad metastática.

En el cromosoma 3, la deleción de 3p ha sido detectada tanto en lesiones premalignas como invasivas de cavidad oral, confirmando la afirmación de Califano de que dicha alteración aparece precozmente en el desarrollo del CECC<sup>117</sup>. Otra alteración importante es la ganancia de 3q, como también se ha visto en el cáncer de cavidad oral. Se han demostrado ganancias en 3q26-28 asociadas con estadios superiores a T2 y con la capacidad invasiva del CECC<sup>140</sup>. Los oncogenes implicados que se localizan en 3q26-28 son *LAZ3* ó *BCL-6* (proteína *LAZ 3* ó proteína 6 del linfoma B), *PIK3CA* (alfapolipéptido catalítico fosfoinosiotido 3 quinasa), telomerasa de ARN y *AIS*. Los productos de *AIS* parecen estar amplificados conjuntamente con *PIK3CA* en los CECC<sup>141</sup>, estando su función relacionada con la renovación de las células madre, capacitando su sobreexpresión para el crecimiento neoplásico<sup>142</sup>. Las mutaciones en *AIS* y *P53* suelen darse juntas, sugiriendo una vía de progresión tumoral específica que aún no ha sido confirmada por estudios genotípicos<sup>143</sup>. La sobreexpresión de *PIK3CA* se ha visto en la fase inicial del desarrollo tumoral en el CECC. Así, la ganancia en 3q26 se relaciona con el desarrollo de displasias de alto grado y el pronóstico del CECC en estadios iniciales<sup>141,144</sup>.

En el cromosoma 5 destacan las ganancias en 5p, siendo una alteración común en los CECC, sugiriendo su interés en la progresión tumoral<sup>145</sup>. La deleción de 5q, junto con la ganancia de 3q y las deleciones de 3p y 9q, se

asocian a tumores bien diferenciados. A este nivel se han localizado los genes *APC* (gen supresor de la poliposis adenomatosa colónica) y *RAS* (familia *RAS*), este último implicado en la vía de transmisión de señales de proliferación y diferenciación tisular<sup>146</sup>.

En el cromosoma 7 destaca la ganancia en 7p, hallazgo común en los CECC<sup>147</sup>, estando asociada con los tumores N0, aunque hay discrepancia en los estudios realizados acerca de su relación con mal pronóstico<sup>40,148</sup>. En este brazo cromosómico están localizados los genes *EGFR*, *IGFB1* (factor inhibidor del crecimiento beta 1) e *IGFB2* (factor inhibidor del crecimiento beta 2)<sup>142</sup>. La ganancia en 7q se ha demostrado en los tumores faríngeos<sup>145</sup>, observando ganancias en las metástasis con respecto al pT<sup>140,149</sup>. Este dato explicaría el comportamiento agresivo y el mal pronóstico de estos tumores.

En el cromosoma 8 se ha visto que la delección 8p se asocia con tumores de alto grado y pobre diferenciación<sup>147</sup>. Sin embargo, la ganancia 8q sería una observación frecuente en el CECC, encontrando a ese nivel los genes *C-MYC* (homólogo del oncogén de la mielocitomatosis viral), *PTK2* (proteína tirosin quinasa 2) y *LYN* («*Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog*»)<sup>142</sup>. La sobreexpresión de *C-MYC* conduce a la transformación maligna<sup>137</sup> y se asocia con baja supervivencia, mientras que la sobreexpresión de *PTK2* facilita el crecimiento<sup>150</sup>.

En el cromosoma 9 la pérdida de 9p acontece de forma precoz en la carcinogénesis y se asocia al paso de displasia a CECC<sup>151</sup>.

En el cromosoma 11 están descritas ganancias en 11q13, mientras que las pérdidas se producen en 11q23<sup>141</sup>. Las ganancias parecen representar una fase inicial en el proceso de carcinogénesis en algunas localizaciones específicas como laringe y cavidad oral<sup>145</sup>. La delección en 11q14 se relaciona con la progresión metastática del tumor y la de 11q23 con las recidivas<sup>152</sup>.

### 3.2.2 Campo de cancerización

Los estudios genéticos también se han dirigido al estudio del «campo de cancerización», sobre todo en cavidad oral, para explicar el desarrollo de los STP. Se comprobó mediante LOH de *p53* que en el 36% de los casos había alteraciones génicas en tejido «normal» adyacente al tumor, afectando la mayoría de las veces a los márgenes quirúrgicos (Figura 6). Estas alteraciones génicas, que permiten el diagnóstico precoz molecular, son similares en el campo y

en el tumor, indicando su origen clonal común<sup>153</sup>. De esta manera, se estimó que el tamaño del campo de cancerización podía alcanzar más de 7 cm de longitud. Los campos de cancerización tan amplios pueden presentar alteraciones génicas similares, pero a nivel fenotípico se expresan como tumor, tejido «sano» o lesiones leucoeritroplásicas, dependiendo de su grado de progresión espacio/temporal. Este hecho también se apoya en que muchos pacientes con cáncer oral presentan en el momento de su diagnóstico áreas leucoplásicas adyacentes al tumor, la mayoría con displasia moderada-severa, apareciendo incluso en los lechos quirúrgicos de resecciones previas<sup>154</sup>. Desde el punto de vista clínico sólo es posible hacer el diagnóstico precoz en las lesiones leucoplásicas que ocurren únicamente en el 0,1-0,2% de la población, presentando progresión a carcinoma invasivo el 2-3% por año<sup>155</sup>.

La leucoeritroplasia oral puede alcanzar un tamaño de más de 10 cm de diámetro y es por tanto una manifestación fenotípica del campo de cancerización<sup>156</sup>. En estas lesiones preinvasivas también se han visto las mismas alteraciones génicas encontradas en el CECC, como pérdidas en 3p, 9p y 17p, junto a mutaciones en el gen *p53*<sup>157</sup>.

La extensión del campo de cancerización es una situación clínica de gran importancia y complejidad en la que además de los cambios génicos en los tejidos circundantes (por ejemplo *p53*), podría valorarse la actividad proliferativa determinada por el marcador *ki-67*<sup>158</sup>.

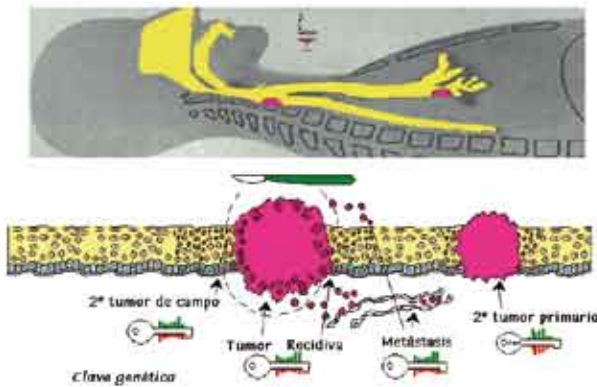


Figura 6. Campo de cancerización.





## 4. Modelo teórico



Las células epiteliales de la mucosa de la vas se ven sometidas a similares agentes carcinogénicos (tabaco y alcohol) que actúan sobre el ADN de las células madre. El ADN nuclear alterado se perpetúa en forma de clones celulares que se expanden formando un campo. El campo de cancerización presenta cambios génicos similares, que se van acumulando, aunque no con la misma intensidad, en zonas amplias de la mucosa epitelial. La manifestación concreta de un campo estaría determinada por la intensidad de acción de los agentes carcinógenos, la capacidad de reparación del daño y la velocidad de progresión espacio/temporal de la alteración. El acúmulo de cambios génicos sería responsable de la expresión fenotípica, histológica y clínica del tumor, en zonas epiteliales limitadas, pudiendo estar presentes de forma precoz en tejidos aparentemente normales. La manifestación fenotípica al final de la progresión sería el desarrollo de múltiples tumores. El cambio génico de un mismo campo tumoral es similar y establecería una huella genética específica que se observaría en su progresión (STC, RT, MD). En los STP de campos diferentes cada tumor sería distinto genéticamente y así se podría establecer su diferencia (Figura 6).



## 5. Hipótesis



-Los STP y las RT representan en la actualidad un problema clínico no resuelto y son responsables en gran medida de la mortalidad y del estancamiento en la supervivencia de los pacientes con CECC.

-Los cambios génicos propios de cada tumor establecen su huella génica que probablemente condiciona su comportamiento clínico.

-El mapa genético específico de cada tumor podría establecer las diferencias entre RT y STP.





## 6. Objetivos



1. El objetivo principal es:

-Describir los cambios génicos de la muestra seleccionada por medio del estudio genético-molecular con MLPA, estableciendo similitudes y diferencias entre los grupos establecidos (PT,STP y RT).

2. Los objetivos secundarios son:

-Describir los aspectos clínico-histopatológicos y evolutivos de nuestros pacientes.

-Relacionar los cambios génicos con la supervivencia.



## 7. Material y métodos



### 7.1 Sujetos de estudio

Se realizó un estudio retrospectivo de pacientes con CECC que posteriormente desarrollaron un STP o una RT en la VAS. Los pacientes fueron diagnosticados en los Hospitales Universitario Central de Asturias (Oviedo) y Valle del Nalón (Langreo) en el período 1983-2005. Se obtuvo una muestra inicial formada por 70 sujetos diagnosticados de STP y 134 de RT. El seguimiento clínico se cerró en Junio de 2007. Para el estudio de biología molecular se seleccionaron, entre los anteriores, aquellos pacientes que cumplían los siguientes criterios:

- 1) Diagnóstico clínico e histopatológico de CECC con posterior desarrollo de STP o RT.
- 2) Disponibilidad de material tisular parafinado y/o fresco.
- 3) Ausencia de tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia previas al diagnóstico de STP y RT.

La muestra final seleccionada consistió en 36 sujetos, 21 con STP y 15 con RT (Figura 7). De cada uno de estos pacientes se obtuvieron dos muestras. En el caso de los 21 que desarrollaron un STP se obtuvo una primera muestra tisular del PT y otra del STP. En los que desarrollaron una RT, una de las muestras procedía también del PT y otra de la RT.



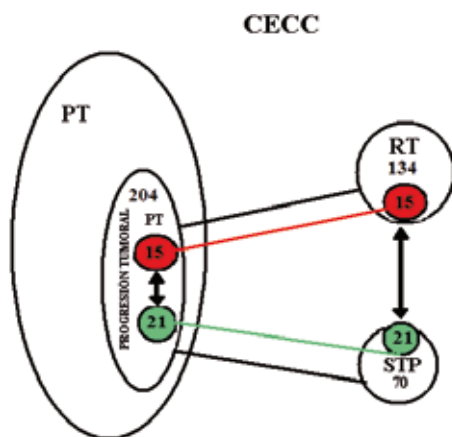


Figura 7. Esquema representativo de la distribución de la muestra a partir del grupo inicial de pacientes diagnosticados de CECC.

Como controles para los experimentos de MLPA se emplearon muestras tisulares de ganglios linfáticos histológicamente normales.

Los distintos tipos de muestras tisulares se exponen en la tabla I.

Tabla I. Muestras tisulares utilizadas.

	Origen de la muestra		
	Fresco	Parafina	Total
<b>Control</b>		5 (100%)	5 (100%)
<b>PT</b>	5 (14%)	31 (86%)	36 (100%)
<b>STP</b>	7 (33%)	14 (67%)	21 (100%)
<b>RT</b>		15 (100%)	15 (100%)
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>65</b>	<b>77</b>

## 7.2 Estudio clínico-patológico

En la muestra completa de pacientes se estudiaron las siguientes variables clínico-patológicas: edad (años). Sexo (hombre o mujer). Factores de riesgo previos y posteriores al diagnóstico (alcohol, tabaco, otros). Localización tumoral (faringe, laringe o agrupados en cabeza y cuello, otras...). Grado

histológico (bien, moderado y poco diferenciado). Estadio tumoral (pTNM): I, II, III, IV o agrupados en precoces (I-II) y avanzados (III-IV). Ganglios linfáticos cervicales: N0 (sin metástasis) y N+ (con metástasis). Márgenes quirúrgicos (con y sin infiltración, infiltración microscópica y macroscópica). Tratamiento realizado en el PT, STP y RT (tipo de cirugía, radioterapia, quimioterapia, otros). Período de latencia entre las lesiones (meses). Evolución de los PT, STP y RT. Supervivencia desde el tratamiento del PT, STP y RT (meses).

Situación del paciente (vivo, muerto por tumor (RT, STP o MD) o enfermedad intercurrente).

### 7.3 Estudio genético-molecular

Se realizó en el laboratorio de ORL del IUOPA.

En cada uno de los 36 pacientes seleccionados se obtuvieron dos muestras en fresco y/o parafinadas, una del PT y otra del STP o RT correspondiente, como se expuso en la tabla I.

De cada **muestra parafinada**, una vez procesada para su estudio histopatológico, se realizaron tres cortes de 50  $\mu\text{m}$  y uno de 5  $\mu\text{m}$ , tiñendo este último con hematoxilina-esosina (HE). Se observó el corte teñido al microscopio óptico para confirmar el diagnóstico y marcar en el porta la zona tumoral, con el fin de evitar la necrosis y los tejidos sanos.

Cada **muestra en fresco** se dividió en dos partes, una se utilizó para extraer el ADN y otra para confirmar el diagnóstico histopatológico. El tamaño mínimo de la muestra era de 3 mm y procedía de una zona tumoral sin necrosis, evitando los tejidos sanos de los bordes, con el fin de alcanzar más del 70% de pureza en células tumorales. Un vez extraída la muestra se sumergía en tampón salino fosfatado (PBS) y se congelaba a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta que era procesada.

#### 7.3.1 Extracción de ADN

Los protocolos de extracción del ADN para todas las muestras se realizaron en base al uso de columnas de afinidad (Qi amp).

En las **muestras parafinadas**, una vez hechos los cortes de 50  $\mu\text{m}$ , se procede a la extracción del ADN. Para ello se examina al microscopio el corte teñido con HE y se selecciona la zona tumoral, evitando contaminaciones por zonas necróticas o tejido sano peritumoral. El primer día, con ayuda de un bisturí se realiza la disección de los cortes de 50  $\mu\text{m}$ . A continuación se lleva a cabo el desparafinado del tejido, depositando el material en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml al que se añade 1 ml de xileno, permaneciendo la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante. Se añade al tubo 1 ml de MeOH (metanol), agitando bien para favorecer la mezcla. Centrifugamos de nuevo a 14.000 rpm durante 10 minutos, volviendo a retirar el sobrenadante. Se añade 1 ml de PBS y agitamos el contenido del tubo, volviendo a centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos, retirando el sobrenadante. Por último, se añade 1 ml de NaSCN (tiocianato sódico) 1M y tras mezclar bien en un agitador se deja incubando durante una noche a 37° C en una placa térmica de agitación.

El segundo día se centrifuga a 14.000 rpm durante 10 minutos, retirando el sobrenadante con ayuda de una pipeta. Se añade en cada tubo 1 ml de PBS, para lavar y eliminar los restos de NaSCN de los tubos, favoreciendo la mezcla mediante agitación. Se vuelve a centrifugar a 14.000 rpm durante 10 minutos retirando el sobrenadante con una pipeta. A continuación, se realiza la fase del lisado añadiendo 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis ATL y 20  $\mu\text{l}$  de proteínaasa  $\kappa$  (concentración de almacenamiento: 20 mg/ ml) en cada tubo. Se mezcla bien la solución en un agitador para posteriormente incubarla a 56° C en un termoagitador durante tres noches.

Durante el tercer y cuarto día del protocolo se añadirán 20  $\mu\text{l}$  de proteínaasa  $\kappa$  cada 12 horas (20  $\mu\text{l}$ /5veces en total).

El quinto día del protocolo de extracción de ADN se comenzará pipeteando en el tubo 200  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis AL. Se incubará durante 10 minutos a 70° C y se añaden 200  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, agitando el contenido para favorecer la mezcla. Se aplica el contenido del tubo de microcentrífuga a una columna de afinidad («Qi Aamp spin column») que se coloca en un tubo de recolección de 2 ml. Las columnas y los tubos de recolección se centrifugan

durante 1 minuto a 8.000 rpm y se elimina el filtrado. Posteriormente, se procede a la purificación del ADN añadiendo sobre las columnas 500  $\mu$ l de solución AW1, centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto. Tras eliminar el filtrado se continúa con un segundo lavado añadiendo a las columnas 500  $\mu$ l del tampón AW2, centrifugando a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se coloca cada columna de afinidad en un nuevo tubo de microcentrífuga y se añaden 70  $\mu$ l de tampón AE, dejando a temperatura ambiente durante 5 minutos para terminar el proceso centrifugando a 8.000 rpm durante 1 minuto.

Las **muestras en fresco** se descongelan a temperatura ambiente en una placa de Petri. Con la ayuda de dos bisturís se disgrega mecánicamente la pieza, dividiéndola en fragmentos más pequeños, que introducimos en un tubo de microcentrífuga hasta situarlos en el fondo. A continuación, se realiza el lisado, añadiendo 200  $\mu$ l de tampón de lisis ATL y 20  $\mu$ l de proteínaasa K en cada recipiente, mezclando bien el contenido del tubo en un agitador, dejando incubar a 56° C toda la noche en un termoagitador. Posteriormente, se continuará la extracción del ADN siguiendo los pasos indicados en el quinto día del protocolo de extracción de ADN expuesto para las muestras parafinadas.

La concentración y la pureza del ADN obtenido se determinan midiendo su absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración de ADN que tenemos en nuestra muestra y la relación A280/A260 el grado de pureza de la muestra. Se consideran aceptables purezas con valores mayores de 1,5.

### 7.3.2 Técnica de la MLPA

La MLPA es una técnica de biología molecular que permite amplificar en un único experimento más de 40 secuencias distintas de ADN o ARN. Para su realización es necesario disponer de una cantidad mínima del ácido nucleico de al menos 20 ng. Se necesita un «kit» de oligonucleótidos complementarios a las secuencias diana del ADN problema, un termociclador para amplificar mediante PCR las sondas hibridadas y un método de electroforesis en gel o capilar, para separar e identificar los productos amplificados en función de sus diferentes tamaños.

Al igual que otras técnicas genético-moleculares como la FISH, la MLPA está basada en la hibridación, si bien en ella destacan algunas características que le confieren ciertas ventajas:

1. La cantidad de ADN necesaria para su realización (>20 ng), es muy inferior a la que requieren otras técnicas (100-1000 veces superior para el southern-blot o microarrays).
2. Reconoce secuencias de ADN de pequeño tamaño (60 pb), porque permite no sólo estudiar tejidos frescos o congelados, sino también muestras incluidas en parafina, con material genético parcialmente degradado.
3. Diferencia secuencias que se distinguen únicamente en un nucleótido.
4. Sus resultados tienen alta reproducibilidad pues todos los elementos amplificados proceden de una misma reacción y se han obtenido en las mismas condiciones.
5. Es rápida y sencilla con un protocolo de cinco pasos que se realizan en 48 horas.
6. Es relativamente barata. Cada reacción cuesta aproximadamente 10 € y el equipamiento necesario es habitual en cualquier laboratorio de biología molecular.

Desde que se describió en el año 2002<sup>159</sup>, la MLPA se ha empleado para detectar amplificaciones y/o deleciones de fragmentos de ADN de distinto tamaño, tanto en cromosomas completos (21, 18, 13...) <sup>160</sup>, como en exones de genes implicados en determinadas enfermedades (distrofia muscular de Duchenne<sup>161</sup>, síndrome de Rett<sup>162</sup>...) y cánceres de mama (*BRCA 1*)<sup>163</sup> y colon (*MSH2/MSH1*)<sup>164</sup>.

Para los experimentos de MLPA se utilizó ADN problema de los PT, STP y RT y ADN control de muestras parafinadas de ganglios linfáticos normales procedentes de vaciamientos cervicales N0. Los ADN fueron extraídos según los protocolos citados en el apartado 7.3.1.

En cada experimento se prepararon un mínimo de ocho muestras incluyendo siempre una muestra con ADN control. Todas las muestras se realizaron al menos 2 veces y en distintos experimentos.

## 7.3.2.1 Tipos de sondas

Se empleó la mezcla de sondas «*SALSA P084 HNSCC-1*», junto con sus correspondientes tampones y enzimas (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda. [www.MLPA.com](http://www.MLPA.com)). Esta «*SALSA P084*» incluye 42 sondas de genes descritos en la bibliografía como genes implicados en el desarrollo del CECC (Tabla II).

Tabla II. Componentes de la salsa «*SALSA P084 HNSCC-1 probe mix*». En la tabla se expone la longitud del gen expresada en nucleótidos y la localización cromosómica.

Longitud	Gen	Kb	Cromosoma
472	<i>NRAS</i>	01-114.1	01p13.2
283	<i>LMNA</i>	01-151.9	01q21.2
256	<i>IL1A</i>	02-111.4	02q14
220	<i>TANK</i>	02-160.6	02q24
154	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
337	<i>MLH1</i>	03-036.3	03p22.1
454	<i>CTNNB1</i>	03-040.5	03p22
166	<i>CASP6</i>	04-110.9	04q25
373	<i>IL2</i>	04-123.7	04q26
481	<i>MFHAS1</i>	08-008.7	08p23.1
130	<i>CTSB</i>	08-011.7	08p22
184	<i>N33</i>	08-015.5	08p22
445	<i>PTP4A3</i>	08-142.4	08q24.3
418	<i>RECQL4</i>	08-145.8	08q24.3
202	<i>CDKN2A</i>	09-022.2	09p21
211	<i>CDKN2B</i>	09-022.2	09p21
364	<i>A1651963</i>	10-010.9	10p14
463	<i>RENT2</i>	10-012.0	10p14
136	<i>CREM</i>	10-035.2	10p12.1
292	<i>CCND1</i>	11-071.1	11q13
229	<i>EMS1</i>	11-071.8	11q13
310	<i>IL18</i>	11-113.5	11q23.1
238	<i>IGSF4</i>	11-116.7	11q23
355	<i>BRCA2</i>	13-026.9	13q12.3
328	<i>RB1</i>	13-043.0	13q14.2

continúa en la página siguiente

Longitud	Gen	Kb	Cromosoma
148	<i>DLEU1</i>	13-044.9	13q14.3
382	<i>BLM</i>	15-085.2	15q26.1
400	<i>IGF1R</i>	15-093.2	15q26
409	<i>TP53</i>	17-008.3	17p13.1
193	<i>TP53</i>	17-008.3	17p13.1
301	<i>TP53</i>	17-008.3	17p13.1
391	<i>TP53</i>	17-008.3	17p13.1
346	<i>TP53</i>	17-008.3	17p13.1
142	<i>ERBB2</i>	17-039.9	17q21.1
319	<i>CDH2</i>	18-025.4	18q11.2
436	<i>MADH2</i>	18-045.3	18q21.1
274	<i>BCL2</i>	18-060.9	18q21.2
247	<i>STK11</i>	19-001.1	19p13.3
265	<i>CDKN2D</i>	19-010.9	19p13
160	<i>BCL2L1</i>	20-030.0	20q11.1
175	<i>MYBL2</i>	20-042.0	20q12
427	<i>PTPN1</i>	20-048.9	20q13.1

En la figura 8 podemos observar también los genes que componen el kit. Entre ellos se encuentran *TP53* (17p13.1), *CDKN2A* (9p21) y otros localizados en 2q14, 3p22, 4q, 8p22, 8q24, 11q, 13q, 18q, 19p y 20q, que como hemos visto al comentar los modelos de progresión están frecuentemente implicados en la carcinogénesis de la VAS (apartado 3.2.1).



Figura 8. Localización cromosómica de los genes estudiados en la «SALSA P084 HNSCC-1 probe mix».

Cada una de las 42 sondas está formada por dos oligonucleótidos, uno sintético y otro derivado del vector M13. El oligonucleótido sintético está formado a su vez por un «primer Y» en el extremo 5' de 19 nucleótidos y por una secuencia de hibridación de 21-30 nucleótidos que se unirá a la muestra de ADN problema. El oligonucleótido derivado del vector M13 tiene un tamaño diferente en cada sonda. Este diferente tamaño se consigue gracias a la secuencia de relleno («*stuffer sequence*») de tamaño variable que se intercala con el otro «primer X» de 36 nucleótidos, situado en el extremo 3' y la secuencia de hibridación de 25-43 nucleótidos, que se unirá también a la muestra de ADN (Figura 9).

La mezcla de sondas de «SALSA P 084» contiene también sondas de control interno. En la amplificación por PCR estas sondas control generan productos más pequeños que los amplificados por las 42 sondas de genes. El control interno determina si la calidad y la concentración del ADN de la muestra son suficientes para obtener un resultado de MLPA fiable. El control interno tiene dos tipos de sondas:



1- Cuatro fragmentos de ADN que generan productos amplificados de 64, 70, 76 y 82 PB, incluso si se omite el proceso de ligación.

2- Un producto de amplificación de 94 PB dependiente del proceso de ligación y del ADN de la muestra.

El tamaño de los cuatro picos del control interno (64-82 PB), una vez amplificados por PCR, depende de la cantidad y calidad de ADN de la muestra. Serán difícilmente visibles si el ADN es >100 ng y tendrán un tamaño menor que el fragmento amplificado de 94 PB si la cantidad de ADN es de 50 ng aproximadamente. Si estos 4 fragmentos tienen un tamaño similar o mayor que el fragmento de 94 PB y los productos de PCR de 130-472 PB, significa que la reacción de ligación ha fallado o la cantidad de ADN es <20 ng, no siendo válido el experimento. El tamaño del pico de 94 PB debe ser similar al obtenido en los productos amplificados de las sondas de genes, siendo control de que el experimento ha sido satisfactorio (Figura 10).

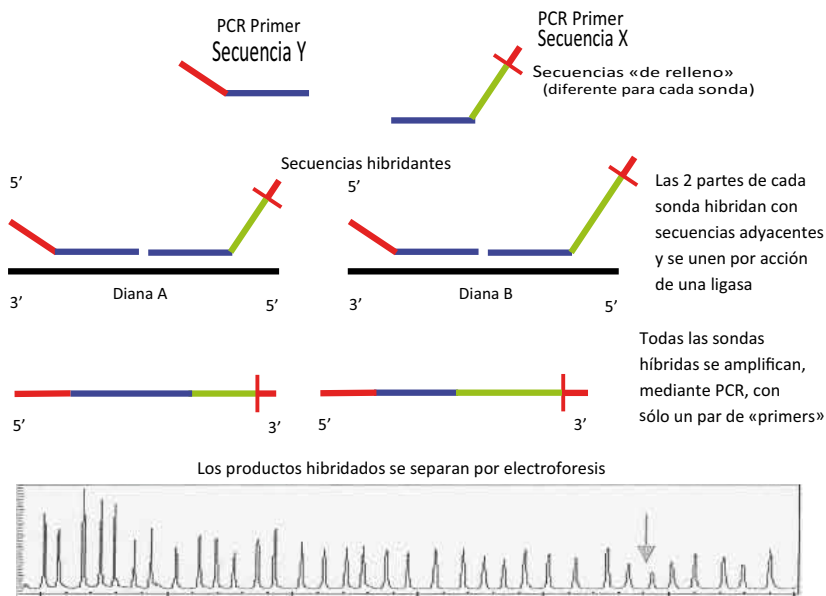


Figura 9. Bases moleculares de la MLPA. En la parte superior del esquema se aprecian los dos fragmentos que forman la sonda de MLPA. Se van representando los pasos de la técnica y los productos finales de hibridación.

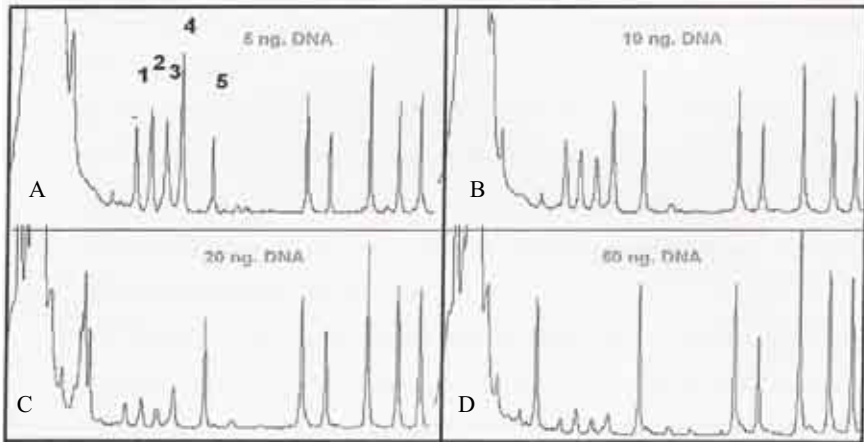


Figura 10. "DNA quality". Si los cuatro primeros picos 1, 2, 3, 4 -de control- son más altos que los picos del producto de MLPA indica que el ADN de la muestra es insuficiente o bien que fracasó la reacción de ligación (A). Se puede observar como a la vez que sube la concentración de ADN (B<C<D) disminuye el tamaño relativo de las sondas control.

### 7.3.2.2 Protocolo experimental

El protocolo de la MLPA se completa en 48 horas. El primer día se lleva a cabo la **desnaturalización del ADN y la hibridación de las sondas**, para ello se pipetea 5  $\mu$ l del ADN, extraído previamente, en un tubo de 0,2 ml perteneciente a una tira de 8 tubos. Se deposita dicha tira en el termociclador donde se someterá a 95° C durante 5 minutos, para posteriormente enfriar a 25° C. Mientras ese proceso tiene lugar, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se mezclan 13,5  $\mu$ l de *SALSA P084* con 13,5  $\mu$ l de tampón de hibridación. Se prepara una nueva tira de 8 tubos de 0,2 ml y se pipetea en cada uno de ellos 3  $\mu$ l de la mezcla descrita previamente. Retiramos la tira inicial de 8 tubos del termociclador, pipeteamos de cada tubo 5  $\mu$ l, y los añadimos al tubo correspondiente de la nueva tira que contiene las sondas y su tampón de hibridación. Colocamos la nueva tira en el termociclador donde permanecerá 1 minuto a 95° C y 16 horas a 60° C, con el fin de que las sondas hibriden sobre el ADN de la muestra.

El segundo día tienen lugar los procesos de **ligamiento y PCR**. Se prepara la mezcla de ligación en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml con 27  $\mu$ l de tampón de ligasa-65 A, 27  $\mu$ l de tampón de ligasa-65 B, 225  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y 9  $\mu$ l del enzima ligasa 65. Se retira la tira de tubos del termociclador y se pipetea en cada uno 32  $\mu$ l de la mezcla de ligación. Se vuelve a llevar la tira de tubos al termociclador y se programa 15 minutos a 54° C, seguido de 5 minutos a 98° C y posteriormente se enfría a 25° C. A partir de este momento, una vez ligados los moldes de las 42 regiones, comienza la PCR. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se pipetea mezclando 234  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y 36  $\mu$ l de tampón PCR. Se introducen 30  $\mu$ l de esa mezcla en cada uno de los 8 tubos de una nueva tira y se colocan en el termociclador una vez retirada la tira anterior. De esta última, se extraen 10  $\mu$ l por tubo que se introducen en el tubo correspondiente de la nueva tira, favoreciendo la mezcla de su contenido. Se programa la termocicladora a 60° C. Se realiza la mezcla de la polimerasa en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml mezclando 18  $\mu$ l de cebadores PCR, 18  $\mu$ l de tampón de dilución, 49,5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada y 4,5  $\mu$ l de polimerasa para realizar la amplificación de las 42 sondas. Las sondas ligadas poseen las mismas secuencias en sus extremos, permitiendo su amplificación simultánea por PCR con sólo un par de «*primers*». Los oligonucleótidos que no se ligan al ADN de la muestra no se amplifican por PCR y, por tanto, no precisan ser eliminados. Se añaden 10  $\mu$ l de dicha mezcla a los 40  $\mu$ l existentes en cada tubo de la tira, mezclando bien el contenido con ayuda de la pipeta.

Por último, se llevan al termociclador donde serán sometidos al siguiente programa: 1 minuto a 60° C, 33 ciclos con tres pasos cada ciclo de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C y 60 segundos a 72° C. A continuación, estarán a 72° C durante 20 minutos, para posteriormente enfriar a 4° C. Las muestras serán almacenadas a 4° C hasta realizar el **análisis de fragmentos**.

Cada sonda da lugar a un producto de amplificación de tamaño único entre 130 y 480 pb debido a la diferencia de tamaño en la secuencia de relleno. Los productos amplificados de las 42 sondas se analizan mediante **electroforesis capilar** (Figura 11). Para ello se mezclan 2  $\mu$ l del producto de amplificación con 10  $\mu$ l de formamida y 0,5  $\mu$ l de marcador interno. La mezcla se

desnaturaliza por calor y se somete a electroforesis capilar (ABI prism 3100, Applied Biosystems). Los capilares están rellenos de un polímero que ofrece dificultad a la migración permitiendo separar los fragmentos por su tamaño. Al final del recorrido existe un láser y un sistema de captura de datos de fluorescencia para detectar los distintos productos de PCR. Estos productos finales son analizados con el software genescan v3.7 (Applied Biosystems) que determina su tamaño, interpolando con distintos fragmentos de tamaño conocido del marcador interno, cuantificando cada sonda por un pico en la intensidad de fluorescencia. La **señal relativa de cada sonda** se define dividiendo el área de cada pico entre la suma de las áreas de todos los picos de la muestra.

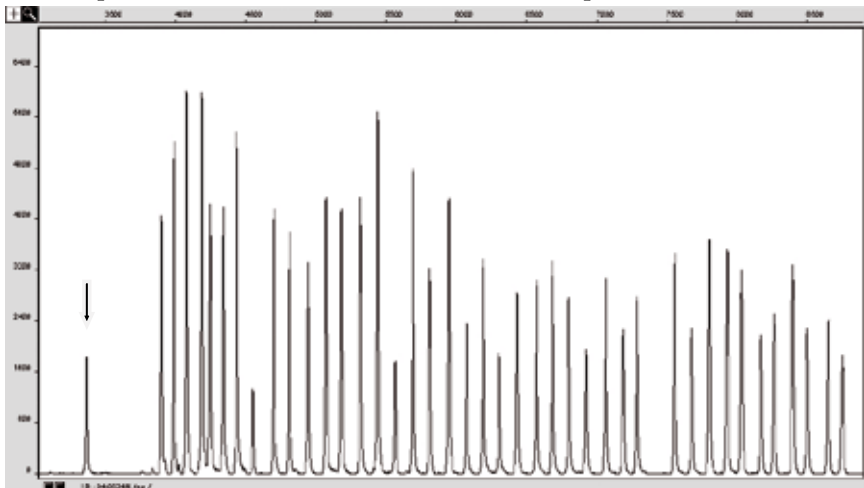


Figura 11. Representación de la electroforesis capilar de 42 productos amplificados por PCR en una muestra. El primer pico de la izquierda (flecha) representa el control interno de 94 PB. A su izquierda aparecen los 4 picos de control interno (mínimos) de 64, 70, 76 y 82 PB que confirman la alta calidad del ADN de la muestra y del experimento.

### 7.3.2.3 Interpretación

Para definir la existencia de una ganancia o pérdida de material génico en cada sonda de la muestra hay que **normalizar** los datos obtenidos. Para ello se calcula la mediana, desviación estándar y valor mínimo y máximo de todas las muestras en los controles, PT, STP y RT. La relación entre el valor del tumor y el control se calcula aplicando las siguientes fórmulas:

1. Relación mínima: cociente entre el valor mínimo del tumor y el valor máximo del control.
2. Relación máxima: cociente entre el valor máximo del tumor y el valor mínimo del control.
3. Relación tumor/control: media de la relación mínima y la relación máxima.
4. Desviación estándar de la relación tumor/control: diferencia entre la relación tumor/control y la relación mínima.

Con este análisis normalizado se obtiene un diagrama de barras de las 42 sondas estudiadas en el ADN tumoral (Figura 12).

Las variables genético-moleculares obtenidas al final del estudio con MLPA son las siguientes. Cuando la relación tumor/control es mayor de 1,2 y la desviación estándar es  $>1$  se **interpreta** como ganancia, si es menor de 0,8 y la desviación estándar es  $<1$  se interpreta como pérdida. Por último, si es mayor de 2,2 y la desviación estándar es  $>2$  se interpreta como amplificación.

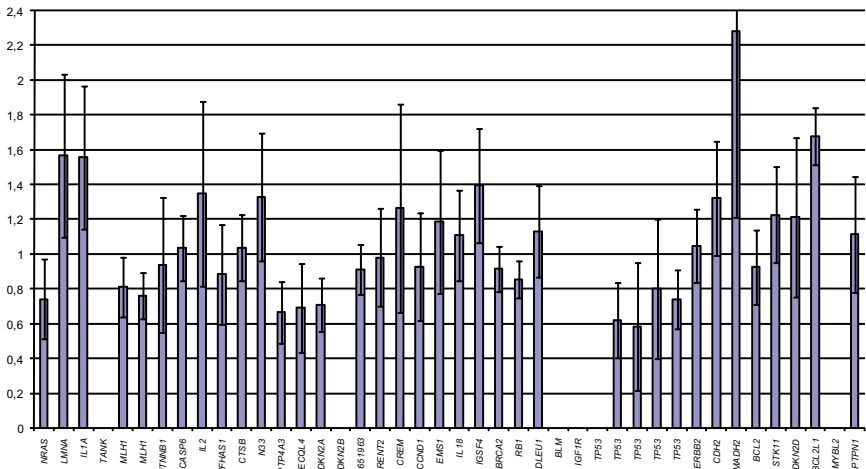


Figura 12. Diagrama de barras del resultado final obtenido por MLPA para la muestra tumoral. Las barras en gris representan la relación tumor/control normalizada para cada sonda. Las líneas en negro sobre cada barra representan la desviación estándar. La pérdida de una sonda presenta un valor  $<0,8$ , la ganancia  $>1,2$  y la amplificación  $>2$ .

## 7.4. Reactivos empleados

En la tabla III se describen los reactivos utilizados en el protocolo experimental según su orden de aparición.

Tabla III. Reactivos empleados en las técnicas de laboratorio.

Producto	Técnica -Paso	Concentración	Casa comercial	Referencias
Xileno	Extracción ADN-parafina	NA	Merck	www.qiagen.com
MeOH	Extracción ADN-parafina	NA	Merck	www.qiagen.com
Proteinasa K	Extracción ADN	200 µg	Roche	www.qiagen.com
Etanol absoluto	Extracción ADN	NA	Merck	www.qiagen.com
"SALSA p084 HNSCC-1",	MLPA	NA	MRC-Holland	www.MLPA.com

(NA: no aplicable)

## 7.5. Estudio estadístico y búsqueda bibliográfica

### 7.5.1 Análisis estadístico

Todos los resultados de las variables descriptivas y numéricas fueron tratadas mediante el paquete informático *Statistical Package for the Social Science*, SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS© Inc. Illinois, EE.UU).

La asociación de caracteres cualitativos se llevó a cabo mediante la prueba del estadístico exacto de Fisher. El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0,05$ . Las diferencias de caracteres cualitativos se calcularon comparando las medias, aplicando la prueba t de Student para muestras independientes y el test de cambios de McNemar con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ .

La evaluación de la supervivencia se hizo mediante las Curvas de Kaplan-Meier, comparando las distribuciones de supervivencia mediante la Prueba del Logaritmo del Rango (*Log-Rank Test*). El nivel de significación se fijó para una  $p \leq 0,05$ .

### 7.5.2 Búsqueda bibliográfica

La búsqueda bibliográfica general sobre CECC, STP y RT se realizó en la base de datos *Medline* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?DB=pubmed)), mientras que las bases de datos *Entrez gene* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene)) y *Entrez nucleotide* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide)) se emplearon en la búsqueda de genes y nucleótidos que se alteran en los CECC.







## 8. Resultados



## 8.1 Estudio clínico-histopatológico y seguimiento

### 8.1.1 Muestra completa

Estudiamos una muestra de 36 pacientes que cumplieron los criterios de inclusión establecidos. En cuanto al sexo 34 eran varones (94%) y 2 mujeres (6%). La **edad** media de todos los pacientes al diagnóstico del PT era 58 años, con un rango de 39 a 76 años, desglosándose por localizaciones en la tabla iv. Entre los **factores de riesgo** destaca el tabaco con 35 fumadores (97%) y sólo 1 no fumador (3%). Respecto al alcohol 28 pacientes lo consumían habitualmente (78%) y 8 no eran bebedores (22%). En 28 pacientes (78%) había exposición conjunta al alcohol y tabaco, 7 fumaban pero no bebían (19%) y 1 (3%) no fumaba ni bebía. En el seguimiento se constató que 34 pacientes abandonaron o seguían sin tener hábitos tóxicos (94%), pero dos continuaron fumando y bebiendo (6%).

La **localización** del PT se muestra en la tabla iv, con ligero predominio de los tumores de laringe y dentro de ellos de los supraglóticos.

Tabla iv. Localización tumoral y edad en la muestra de los 36 pacientes estudiados.

	Localización	Número (%)	Edad media (rango)
Laringe (N= 20)	Supraglotis	13 (36)	57 (39- 71)
	Glotis	7 (20)	63 (52- 76)
Faringe (N=16)	Orofaringe	8 (22)	56 (40- 69)
	Hipofaringe	8 (22)	59 (47-69)
		36	58 (39-76)

Todos los pacientes tenían el diagnóstico de carcinoma epidermoide, siendo el **grado histopatológico** más frecuente el bien diferenciado (20 casos; 56%), seguido del moderadamente diferenciado (12 casos; 33%) y el pobremente diferenciado (4 casos; 11%).

El **estadio tumoral** (pTNM) presentó ligero predominio de estadios precoces (I-II) (19 pacientes, 53%) frente a los avanzados (III-IV) (17 pacientes, 47%), como se puede observar en la tabla v.

Los **ganglios linfáticos** cervicales fueron positivos para metástasis (pN+) en 10 pacientes (28%), de los cuales 6 eran estadio III y 4 estadio IV. Ningún paciente presentó metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

Los **bordes** de la pieza quirúrgica estaban libres de tumor en 32 pacientes (89%), mientras que 4 tenían infiltración tumoral, 3 microscópica y 1 macroscópica.

Los datos clínicos-patológicos de la muestra completa se exponen detalladamente en la tabla v.

Tabla v. Estadificación, grado histológico, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos según la localización tumoral en los 36 PT de la muestra estudiada.

	Laringe (N=20)			Faringe (N=16)			N= 36
	Supraglotis	Glotis	Total (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total (%)	Total (%)
<b>Estadio</b>							
I	4	2	6 (30)	2	1	3 (19)	9 (25)
II	4	1	5 (25)	4	1	5 (31)	10 (28)
III	4	4	8 (40)	2	2	4 (25)	12 (33)
IV	1		1 (5)		4	4 (25)	5 (14)
<b>Grado histológico</b>							
Bien	5	7	12 (60)	7	1	8 (50)	20 (56)
Moderado	5		5 (25)	1	6	7 (44)	12 (33)
Pobre	3		3 (15)		1	1 (6)	4 (11)
<b>Ganglios</b>							
(N0)	9	6	15 (75)	7	4	11 (69)	26 (72)
(N+)	4	1	5 (25)	1	4	5 (31)	10 (28)
<b>Bordes</b>							
Libres	11	7	18 (90)	8	6	14 (88)	32 (89)
Micro +	2		2 (10)		1	1 (6)	3 (8)
Macro +					1	1 (6)	1 (3)

El **tratamiento** inicial de todos los pacientes fue quirúrgico, no habiendo realizado tratamientos con quimio y/o radioterapia antes de la obtención de las muestras tisulares. En la figura 13 se recogen las técnicas quirúrgicas llevadas a cabo en los 36 PT de la muestra estudiada.

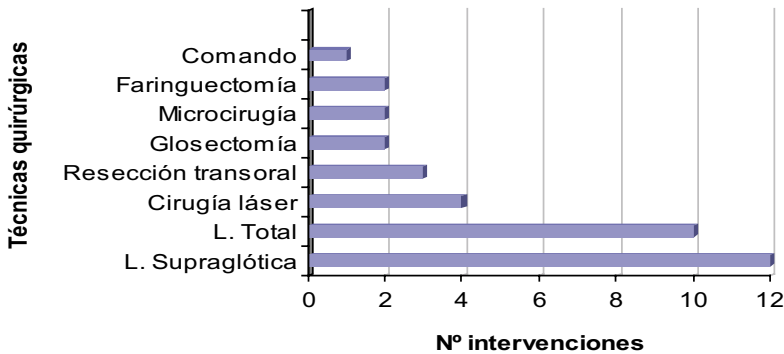


Figura 13. Tipo y número de técnicas quirúrgicas realizadas como tratamiento inicial en los 36 PT de la muestra estudiada.

Todos los pacientes de la muestra fueron controlados y no se registraron pérdidas durante el seguimiento posterior, como figura en los criterios de selección. La evolución de estos 36 pacientes constató que 21 (58%) tuvieron un STP y 15 (42%) una RT.

El tiempo transcurrido entre el tratamiento quirúrgico del PT y la aparición de la nueva lesión relacionada con el proceso tumoral (RT o STP) era de 29 meses, con un rango de 0 a 121 meses.

La **supervivencia** media desde el tratamiento del PT fue de 59 meses (2-146 meses), destacando que 16 pacientes (44%) sobrevivieron más de 5 años después de ese primer tratamiento. La supervivencia tras el diagnóstico del STP/RT se reduce claramente y se encuentra en torno a 29 meses (0-115 meses), con sólo 6 pacientes (17%) que sobrevivieron más de 5 años desde el diagnóstico/tratamiento de la segunda lesión.

Las causas de muerte de los 19 pacientes fallecidos (53%) tras el tratamiento inicial del PT fueron la RT (9 casos, 25%), los STP (7 casos, 19%) y las MD (1 caso, 3%). Los dos pacientes restantes fallecieron por enfermedad intercurrente (Tabla VI).

Tabla vi. Evolución de la enfermedad y situación de los 36 pacientes de la muestra estudiada.

	Laringe (N=20)			Faringe (N=16)			N=36
	Supraglotis	Glotis	Total %	Orofaringe	Hipofaringe	Total %	Total %
<b>Evolución enfermedad</b>							
RT	6	2	8 (40)	1	6	7 (44)	15 (42)
STP	7	5	12 (60)	7	2	9 (56)	21(58)
<b>Situación paciente</b>							
Vivo	6	4	10 (50)	5	2	7 (44)	17 (47)
†RT	2	2	4 (20)		5	5 (31)	9 (25)
†MD	1		1 (5)				1 (3)
†STP	2	2	4 (20)	3		3 (19)	7 (19)
Enfermedad intercurrente	1		1 (5)		1	1 (6)	2 (6)

†: fallecido

### Resumen

En la muestra completa de PT predominaban los varones de 58 años de edad, fumadores y bebedores. Los tumores más frecuentes eran los supraglóticos con estadios precoces. Todos los PT eran carcinomas epidermoides y a todos se les realizó tratamiento quirúrgico con fin curativo, estando los bordes de resección libres en el 89% y presentando metástasis ganglionares en el 28%. La supervivencia global fue del 47%, falleciendo otro 47% por causa tumoral.

#### 8.1.2 Grupo de STP

En la muestra completa de pacientes hubo 21 casos (58%) que desarrollaron durante el seguimiento un STP, presentando este grupo las siguientes características clínico-histopatológicas. Respecto al sexo 19 eran varones (90%) y 2 mujeres (10%). La **edad** media cuando se diagnosticó el PT era de 57 años, con un rango de 39 a 76 años. Entre los **factores de riesgo** también destacaba el hábito tabáquico, siendo 20 (95%) fumadores y sólo 1 no fumador. El consumo de alcohol era habitual en 16 (76%), mientras que los cinco restantes (24%) no eran bebedores o ese dato no constaba en la historia clínica. La exposición conjunta al alcohol y tabaco era también habitual en 16 casos (76%), mientras que 4 (19%) eran sólo fumadores y 1 (5%) no fumaba ni

bebía. Durante el seguimiento, desde el tratamiento inicial del PT, se constató que 19 casos (90%) habían abandonado o seguían sin consumir tabaco y alcohol, mientras que 2 (10%) persistían en esos hábitos.

La **localización** del PT que más se asociaba al desarrollo de un STP era la laringe supraglótica y la orofaringe, cada una con 7 casos (33%) como se detalla en la tabla VII. Cuando analizamos la localización de los STP, destaca el origen en la orofaringe con 5 casos (23,5%), hipofaringe y supraglótis, cada una con 4 casos (19%).

Tabla VII. Localización de los PT en relación con los STP en el grupo que los desarrolló (N=21).

PT \ STP	Glottis	Supraglótis	Orofaringe	Hipofaringe	Total (%)
Fosa nasal	1				1 (5)
Cavidad oral		1	1		2 (9,5)
Hipofaringe		2	1	1	4 (19)
Glottis	1	1	1		3 (14)
Esófago		1			1 (5)
Supraglótis	2		1	1	4 (19)
Orofaringe		2	3		5 (23,5)
Pulmón	1				1 (5)
<b>Total (%)</b>	5 (23,8)	7 (33,3)	7 (33,3)	2 (9,5)	21 (100)

Si comparamos agrupando la localización laríngea y faríngea del PT, observamos un ligero predominio de la primera (12 pacientes, 57%) respecto a la segunda (9 pacientes, 43%). Los STP con origen en la región de cabeza y cuello representaban la gran mayoría (19 pacientes, 90%) respecto a las otras localizaciones (2 pacientes, 10%).

Todos los PT eran carcinomas epidermoides con distinto **grado histopatológico** de diferenciación (14 casos, 67% bien diferenciados; 4 casos, 19% moderadamente diferenciados y 3 casos, 14% pobremente diferenciados). En los STP había 17 casos con histopatología de carcinoma epidermoide invasivo (81%) y distintos grados de diferenciación (5 pacientes, 29% bien



diferenciados; 9 pacientes, 53% moderadamente diferenciados y 3 pacientes, 18% pobremente diferenciados), aunque también se observaron 3 carcinomas in situ (14%) y 1 carcinoma papilar en la orofaringe (5%).

La **estadificación** de los PT en este grupo se muestra en la figura 14, con mayoría de estadios precoces I-II (14 pacientes, 66%) respecto a los avanzados III-IV (7 pacientes, 34%).

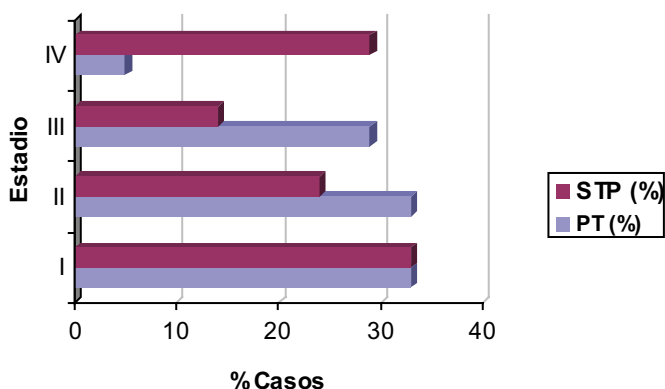


Figura 14. Estadificación del PT y STP en este grupo (N=21).

En los STP también había predominio, aunque menor, de los estadios I-II (12 pacientes, 56%), y por tanto aumentaron los diagnósticos en estadios III-IV (9 pacientes, 44%).

Los **ganglios linfáticos** cervicales fueron positivos para metástasis (pN+) en 4 casos (19%) de los PT, de los cuales 3 eran estadio III y 1 estadio IV. En los STP se comprobó que 5 casos (24%) eran pN+, perteneciendo todos al estadio IV.

Los **bordes** de la pieza quirúrgica estaban libres de infiltración tumoral en 20 casos (95%) de los PT, mientras que 1 presentaba infiltración tumoral microscópica.

En los STP había 16 casos (76%) que no tenían infiltración tumoral, mientras que 5 casos (24%) sí la tenían, 2 microscópica y 3 macroscópica.

En la tabla VIII se detallan los datos clínico-patológicos de este grupo que desarrolló un STP.

Tabla VIII. Estadificación, grado histológico, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos según la localización tumoral de los PT en el grupo que desarrolló un STP (N=21).

	Laringe (N=12)			Faringe (N= 9)			N= 21
	Supraglotis	Glotis	Total (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total (%)	Total (%)
<b>Estadio</b>							
I	2	2	4 (33)	2	1	3 (33)	7 (33)
II	3	1	4 (33)	3		3 (33)	7 (33)
III	1	2	3 (25)	2	1	3 (33)	6 (29)
IV	1		1 (8)				1 (5)
<b>Grado histológico</b>							
Bien	3	5	8 (67)	6		6 (67)	14 (67)
Moderado	2		2 (16)	1	1	2 (22)	4 (19)
Pobre	2		2 (16)		1	1 (11)	3 (14)
<b>Ganglios</b>							
(N0)	6	3	9 (75)	6	2	8 (89)	17 (81)
(N+)	1	2	3 (25)	1		1 (11)	4 (19)
<b>Bordes</b>							
Libres	6	5	11 (92)	7	2	9 (100)	20 (95)
Micro +	1		1 (8)				1 (5)
Macro +							

En la tabla IX se hace referencia a la localización agrupada de los STP, estadio, grado de diferenciación, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos.

Tabla IX. Estadificación, grado histológico, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos según la localización tumoral de los STP en ese grupo de pacientes (N=21).

	Cabeza y cuello	Otras localizaciones	Total (%)
<b>Estadio</b>			
I	6	1	7 (33)
II	4	1	5 (24)
III	3		3 (14)
IV	6		6 (29)
<b>Grado histológico</b>			
Bien	5		5 (24)
Moderado	7	2	9 (43)
Pobre	3		3 (14)
Otro tipo	4		4 (19)
<b>Ganglios</b>			
(N0)	14	2	16 (76)
(N+)	5		5 (24)
<b>Bordes</b>			
Libres	15	1	16 (76)
Micro +.	2		2 (10)
Macro +.	2	1	3 (14)

El **tratamiento** inicial fue quirúrgico en todos los PT de este grupo (21 casos, 100%), y en 19 (90%) de los STP (Figura 15). En estos últimos, además de la cirugía, se realizó tratamiento complementario posterior con radioterapia en 9 pacientes (43%). Los 2 (10%) STP restantes fueron tratados con quimio-radioterapia concomitante.

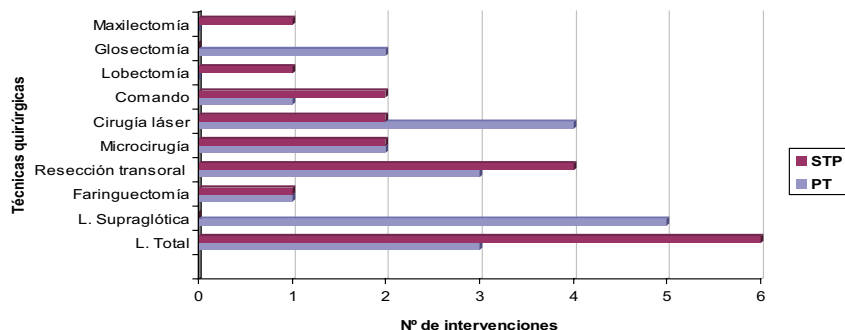


Figura 15. Técnicas quirúrgicas realizadas como tratamiento inicial en el grupo que desarrolló un STP (N=21).

En la **evolución** se observó que el tiempo transcurrido entre el PT y el STP fue 41 meses, con un rango de 0 a 121 meses. Esto permitió clasificar a 16 STP (76%) como metacrónicos, siendo los 5 restantes sincrónicos simultáneos (24%).

La **supervivencia** media desde el tratamiento del STP fue de 28 meses (0-104 meses), destacando que 14 pacientes (67%) seguían vivos, mientras que los 7 restantes (33%) habían fallecido. Hasta el momento sólo 3 pacientes (14%) han sobrevivido más de 5 años desde el STP. La causa de la muerte en los 7 pacientes fallecidos fue en todos ellos la progresión tumoral.

### Resumen

En el grupo de STP predominaban los varones de 57 años de edad, fumadores y bebedores. Los PT más frecuentes eran de laringe supraglótica y orofaringe con estadios precoces. Los STP se localizaban en su mayoría en la zona de cabeza y cuello (oro, hipofaringe y supraglotis) y aumentaban ligeramente los estadios avanzados. Todos los PT eran carcinomas epidermoides al igual que

la mayoría de STP. A todos los PT se les realizó tratamiento quirúrgico con fin curativo, estando los bordes de resección libres en el 95% y presentando metástasis ganglionares en el 19%. En el 10% de los STP se empleó quimioradioterapia. El tiempo transcurrido hasta el STP fue de 41 meses. La supervivencia del 67%, falleciendo el 33% por causa tumoral.

### 8.1.3 Grupo de RT

En la muestra completa de pacientes hubo 15 casos (42%) que desarrollaron durante el seguimiento una RT, presentando las siguientes características clínico-histopatológicas. Respecto al sexo todos eran varones (100%). La **edad** media cuando se diagnosticó el PT era de 61 años, con un rango de 41 a 71 años. Entre los **factores de riesgo** también destacaba el hábito tabáquico, siendo todos fumadores (15 casos, 100%). El consumo de alcohol era habitual en 12 casos (80%), mientras que los 3 restantes (20%) no eran bebedores o ese dato no constaba en la historia clínica. La exposición conjunta al alcohol y tabaco era también habitual en 12 pacientes (80%), mientras que 3 (20%) no bebían. Durante el seguimiento, desde el tratamiento inicial del PT, se constató que los 15 pacientes (100%) habían abandonado sus hábitos tóxicos.

Las **localizaciones** del PT que más se asociaban a RT eran la laringe supraglótica y la hipofaringe, cada una con 6 casos (40%), siendo menor el resto, como se detalla en la tabla x.

Tabla x. Localización de PT en relación al tipo de RT en el grupo que la desarrolló (N=15).

RT \ PT	Supraglotis	Glottis	Hipofaringe	Orofaringe	Total (%)
Local	3	0	1	1	5 (33)
Locorregional	3	0	5	0	8 (53)
Estomal	0	2	0	0	2 (13)
Total (%)	6 (40)	2 (13)	6 (40)	1 (7)	15 (100)

Si comparamos agrupando la localización laríngea y faríngea del PT, observamos una distribución similar con 8 casos (53%) para la primera, respecto a la segunda con 7 (47%). Las RT locorregionales representaban la mayoría

(8 casos, 53%) respecto a las locales (5 casos, 33%) y a las estomales (2 casos, 13%). Los PT que en su evolución desarrollaron recidivas estomales eran todos de localización glótica.

Los PT eran en su totalidad carcinomas epidermoides con distinto **grado histopatológico** de diferenciación (6 casos, 40% bien diferenciados; 8 casos, 53% moderadamente diferenciados y 1 caso, 7% pobremente diferenciado). En las RT los 15 casos tenían histopatología de carcinoma epidermoide invasivo con distinto grado de diferenciación (6 casos, 40% bien diferenciados; 6 casos, 40% moderadamente diferenciados; 1 caso, 7% pobremente diferenciado), aunque en los 2 casos restantes (13%) no fue posible establecer dicho grado.

La **estadificación** de los PT de este grupo que desarrollaron una RT se muestra en la figura 16, con mayoría de estadios avanzados III-IV (10 casos, 67%), respecto a los precoces I-II (5 casos, 33%).

En las RT no se pudo realizar adecuadamente la estadificación, sobre todo cuando se trataba de una recidiva locorregional, por la dificultad para valorar la extensión después de la cirugía previa, y por no estar esa información bien reflejada en la historia clínica.

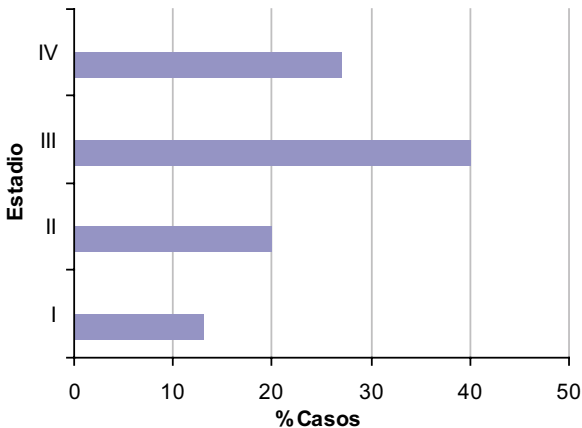


Figura 16. Estadificación del PT en el grupo que desarrolló una RT (N=15).

Los **ganglios linfáticos** cervicales fueron positivos para metástasis (pN+) en 6 pacientes (40%) de los PT, de los cuales 3 eran estadio III y 3 estadio IV. En las RT se comprobó que 7 pacientes (47%) eran pN+, si bien el hecho de no poder realizar una adecuada estadificación de la recidiva impidió determinar en que estadio tumoral se encontraban.

Los **bordes** de la pieza quirúrgica estaban libres de infiltración tumoral en 12 casos (80%) de los PT, mientras que dos casos (13,3%) presentaban infiltración microscópica y 1 (6,6%) macroscópica. En las RT había 4 casos (26,6%) que no presentaban infiltración tumoral, mientras que en 8 casos (53,3%) sí la tenían, 5 microscópica y 3 macroscópica. No se pudo determinar este dato con seguridad en 3 casos (20%).

En la tabla XI se detallan los datos clínico-patológicos en el grupo que desarrolló una RT.

Tabla XI. Estadificación, grado histológico, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos según la localización tumoral de los PT en el grupo que desarrolló una RT (N=15).

	Laringe (N=8)			Faringe (N= 7)			N=15
	Supraglotis	Glottis	Total (%)	Orofaringe	Hipofaringe	Total (%)	Total (%)
<b>Estadio</b>							
I	2		2 (25)				2 (13)
II	1		1 (12,5)	1	1	2 (29)	3 (20)
III	3	2	5 (62,5)		1	1 (14)	6 (40)
IV					4	4 (57)	4 (27)
<b>Grado histológico</b>							
Bien	2	2	4 (50)	1	1	2 (29)	6 (40)
Moderado	3		3 (37,5)		5	5 (71)	8 (53)
Pobre	1		1 (12,5)				1 (7)
<b>Ganglios</b>							
(N0)	3	2	5 (62,5)	1	3	4 (57)	9 (60)
(N+)	3		3 (37,5)		3	3 (43)	6 (40)
<b>Bordes</b>							
Libres	5	2	7 (87,5)	1	4	5 (71)	12 (80)
Micro. +	1		1 (12,5)		1	1 (14)	2 (13,3)
Macro. +					1	1 (14)	1(6,6)

En la tabla XII se hace referencia al tipo de RT, estadio, grado de diferenciación, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos.

Tabla XII. Grado histológico, ganglios linfáticos y bordes quirúrgicos del PT según el tipo de RT en el grupo que la desarrolló (N=15).

	Recidiva local	Recidiva locorregional	Recidiva estomal	Total (%)
<b>Grado histológico</b>				
Bien	3	3		6 (40)
Moderado	1	5		6 (40)
Pobre	1			1 (7)
No determinado			2	2 (13)
<b>Ganglios</b>				
(N0)	4			4 (26,6)
(N+)	1	6		7 (46,6)
No determinado		2	2	4 (26,6)
<b>Bordes</b>				
Libres	3	1		4 (26,6)
Micro. +	2	3		5 (33,3)
Macro. +		3		3 (20)
No determinado		1	2	3 (20)

El **tratamiento** inicial fue quirúrgico en todos los PT de este grupo (15 casos, 100%), y en 12 (80%) de las RT (Figura 17). En estas últimas, además de la cirugía, se realizó tratamiento complementario posterior con radioterapia, sola o asociada a quimioterapia en 10 pacientes (66,6%). En las 3 RT restantes (20%) se optó por un tratamiento paliativo.

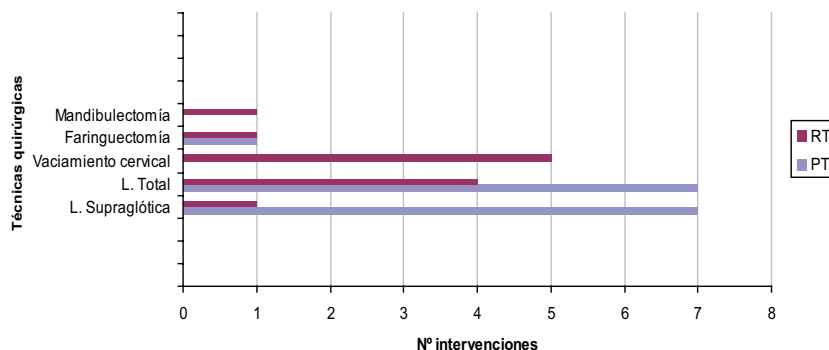


Figura 17. Técnicas quirúrgicas realizadas como tratamiento en el grupo que desarrolló una RT (N=15).

En la **evolución** de estos pacientes se observó que el tiempo transcurrido entre el PT y la RT fue de 12 meses, con un rango de 1 a 37 meses. Durante el seguimiento no se registró ninguna pérdida.

La **supervivencia** media desde el diagnóstico/tratamiento de la RT fue de 31 meses (0-115 meses). Hasta el momento sólo 3 pacientes (20%) han sobrevivido más de 5 años desde la RT. La causa de muerte de los 12 pacientes fallecidos (80%) fue la progresión tumoral (11 casos), mientras que en el caso restante se debió a una enfermedad intercurrente.

### *Resumen*

En el grupo de RT eran todos varones de 61 años de edad, fumadores y bebedores. Los PT más frecuentes eran de hipofaringe y laringe supraglótica en estadios avanzados. Las RT predominaban del tipo locorregional seguidas por las locales y estomales. Todos los PT eran carcinomas epidermoides al igual que las RT. A todos los PT se les realizó tratamiento quirúrgico con fin curativo, estando los bordes de resección libres en el 80% y presentando metástasis ganglionares en el 40%. En el 20% de los RT se optó por tratamiento paliativo. El tiempo transcurrido hasta la RT fue de 12 meses. La supervivencia fue del 20%, falleciendo el 73% por causa tumoral.



## 8.2. Estudio génico

Se procedió a estudiar mediante MLPA las alteraciones génicas presentes en los 36 PT, así como en los 21 STP y en las 15 RT. De las 42 sondas estudiadas 6 fueron descartadas por su mal funcionamiento. Se trataba de los genes *TANK*, *CDKN2B*, *BLM*, *TP 53* (193 PB), *IGF1R* y *MYBL2*, por lo que finalmente se consideraron las 36 sondas restantes.

Con el fin de ordenar los resultados se procederá a su descripción según el guión que se expone a continuación. Al final de cada apartado se hará un breve resumen de los datos más importantes.

El esquema que se seguirá es el siguiente:

- Descripción de las alteraciones génicas observadas en los PT, STP y RT.
- Comparación entre los distintos grupos: 36 PT y 21 STP, 36 PT y 15 RT, 21 PT → STP y 15 PT → RT, 21 STP y 15 RT.
- Análisis de las concordancias y discordancias de dichas alteraciones génicas entre los PT y STP, así como entre PT y RT.
- Análisis de las concordancias y discordancias entre cada PT con su correspondiente STP o RT.
- Comparación de la supervivencia de los pacientes que desarrollaron un STP (N=21) y una RT (N=15).
- Correlación de las alteraciones génicas con la supervivencia, tanto en los 36 PT de la muestra total, como en los que desarrollaron un STP (21 PT → STP) y una RT (15 PT → RT).

### 8.2.1. Descripción de las alteraciones génicas

En la tabla XIII se expone de forma general el número medio de alteraciones génicas (ganancias, pérdidas, amplificaciones) por caso correspondientes a los PT (N=36), STP (N=21) y RT (N=15), así como los datos desglosados para los PT → STP (n=21) y PT → RT (N=15).

Tabla XIII. Número de alteraciones génicas por caso.

Alteración génica	36 PT	21PT→STP	15 PT→RT	21 STP	15 RT
Pérdidas	5,25	5	5,6	4,04	4,73
Ganancias	4,41	3,85	5,2	5,04	6,66
Amplificaciones	0,97	0,71	1,2	0,66	1,13
<b>Total</b>	10,63	9,56	12	9,74	12,52

### 8.2.1.1 Alteraciones génicas en los 36 PT

En la tabla XIV se presentan el total de las alteraciones génicas detectadas en los 36 PT.

Tabla XIV. Alteraciones génicas en los 36 PT. En negrita se resaltan los valores más destacados.

Gen	Cromosoma	Nº Pérdidas	%	Nº Ganancias	%	Nº Amplificaciones	%
NRAS	01p13.2	3	8,33	1	2,78	0	0,00
LMNA	01q21.2	3	8,33	11	<b>30,56</b>	1	2,78
IL1A	02q14	2	5,56	5	13,89	0	0,00
MLH1	03p22.1	9	<b>25,00</b>	3	8,33	1	2,78
MLH1	03p22.1	6	16,67	0	0,00	0	0,00
CTNNB1	03p22	8	<b>22,22</b>	0	0,00	0	0,00
CASP6	04q25	8	<b>22,22</b>	2	5,56	0	0,00
IL2	04q26	4	11,11	1	2,78	0	0,00
MFHAS1	08p23.1	8	<b>22,22</b>	6	16,67	1	2,78
CTSB	08p22	4	11,11	7	19,44	1	2,78
N33	08p22	0	0,00	6	16,67	1	2,78
PTP4A3	08q24.3	2	5,56	6	16,67	1	2,78
RECQL4	08q24.3	2	5,56	4	11,11	1	2,78
CDKN2A	09p21	17	<b>47,22</b>	1	2,78	0	0,00
AI651963	10p14	13	<b>36,11</b>	1	2,78	0	0,00
RENT2	10p14	5	13,89	1	2,78	0	0,00
CREM	10p12.1	1	2,78	6	16,67	0	0,00
CCND1	11q13	1	2,78	15	<b>41,67</b>	10	<b>27,78</b>
EMS1	11q13	1	2,78	15	<b>41,67</b>	12	<b>33,33</b>
IL18	11q23.1	10	<b>27,78</b>	2	5,56	0	0,00
IGSF4	11q23	4	11,11	2	5,56	0	0,00
BRCA2	13q12.3	7	19,44	0	0,00	0	0,00

continúa en la página siguiente

Gen	Cromosoma	Nº Pérdidas	%	Nº Ganancias	%	Nº Amplificaciones	%
<i>RB1</i>	13q14.2	7	19,44	1	2,78	0	0,00
<i>DLEU1</i>	13q14.3	4	11,11	1	2,78	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	6	16,67	5	13,89	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	8	<b>22,22</b>	2	5,56	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	7	19,44	4	11,11	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	7	19,44	2	5,56	0	0,00
<i>ERBB2</i>	17q21.1	1	2,78	3	8,33	1	2,78
<i>CDH2</i>	18q11.2	9	<b>25,00</b>	3	8,33	0	0,00
<i>MADH2</i>	18q21.1	1	2,78	5	13,89	0	0,00
<i>BCL2</i>	18q21.2	6	16,67	3	8,33	0	0,00
<i>STK11</i>	19p13.3	6	16,67	4	11,11	0	0,00
<i>CDKN2D</i>	19p13	7	19,44	8	<b>22,22</b>	1	2,78
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	0	0,00	17	<b>47,22</b>	3	8,33
<i>PTPN1</i>	20q13.1	2	5,56	6	16,67	1	2,78

En la figura 18 se representan las **pérdidas** génicas más importantes observadas en el total de los PT.

Destacan por orden de frecuencia los genes *CDKN2A*, *A1651963*, *IL18*, *MLH1* y *CDH2*, que presentan pérdidas en al menos el 25 % de las muestras analizadas.

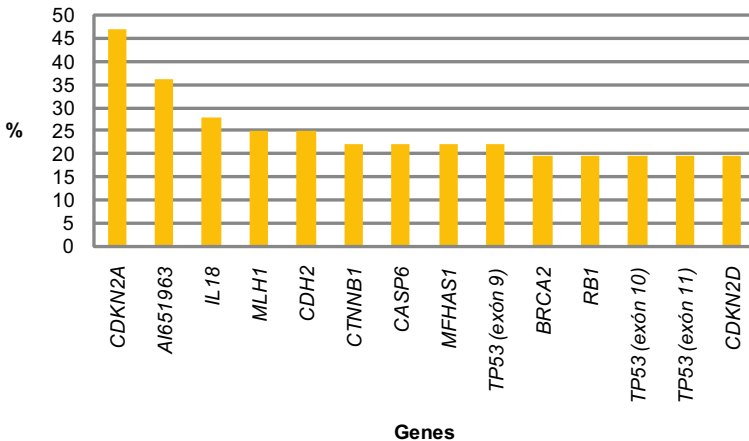


Figura 18. Pérdidas génicas en los 36 PT.

La figura 19 muestra las **ganancias** génicas más importantes observadas en el total de los PT. Destacan por orden de frecuencia los genes *BCL2L1*, *CCND1*, *EMSI*, *LMNA* y, que presentan ganancias en más del 30% de las muestras analizadas.

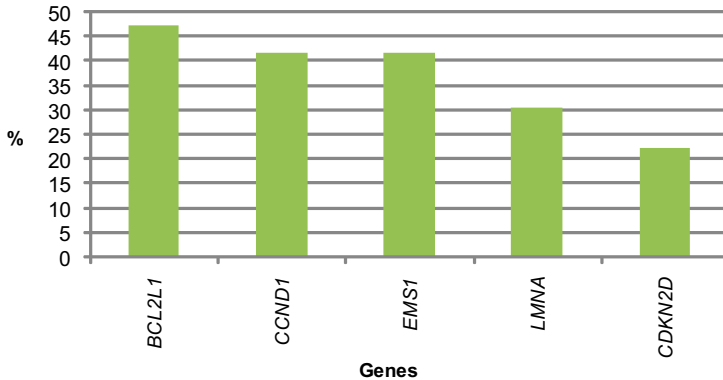


Figura 19. Ganancias génicas en los 36 PT.

La figura 20 muestra las **amplificaciones** génicas más importantes observadas en el total de los 36 PT. Destacan por orden de frecuencia las de los genes *EMSI* y *CCND1*, que presentan amplificaciones en más del 27% de las muestras analizadas.

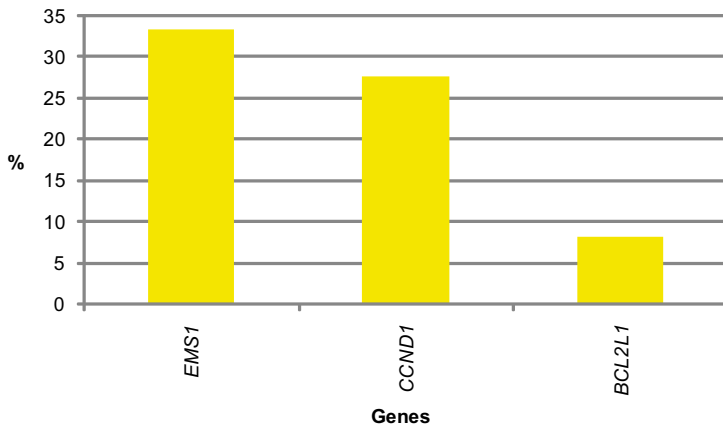


Figura 20. Amplificaciones génicas en los 36 PT.

## Resumen

Las alteraciones génicas más frecuentes en los PT son las pérdidas en *CDKN2A* y *A1651963*, las ganancias en *BCL2L1*, *CCND1* y *EMS1*, junto a las amplificaciones en estos dos últimos genes.

### 8.2.1.2 Alteraciones génicas en los 21 STP

En la tabla xv se presentan el total de las alteraciones génicas detectadas en los 21 STP.

Tabla xv. Alteraciones génicas en los 21 STP. En negrita se resaltan los valores más destacados.

Gen	Cromosoma	N° Pérdidas	%	N°		N° Amplificaciones	%
				Ganancias	%		
<i>NRAS</i>	01p13.2	3	14,29	1	4,76	0	0,00
<i>LMNA</i>	01q21.2	2	9,52	4	19,05	0	0,00
<i>IL1A</i>	02q14	0	0,00	5	<b>23,81</b>	1	4,76
<i>MLH1</i>	03p22.1	5	<b>23,81</b>	2	9,52	0	0,00
<i>MLH1</i>	03p22.1	3	14,29	1	4,76	0	0,00
<i>CTNNB1</i>	03p22	2	9,52	1	4,76	0	0,00
<i>CASP6</i>	04q25	3	14,29	1	4,76	0	0,00
<i>IL2</i>	04q26	0	0,00	2	9,52	0	0,00
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	2	9,52	1	4,76	0	0,00
<i>CTSB</i>	08p22	2	9,52	1	4,76	1	4,76
<i>N33</i>	08p22	1	4,76	7	<b>33,33</b>	0	0,00
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	3	14,29	3	14,29	0	0,00
<i>RECQL4</i>	08q24.3	3	14,29	4	19,05	0	0,00
<i>CDKN2A</i>	09p21	14	<b>66,67</b>	1	4,76	1	4,76
<i>A1651963</i>	10p14	1	4,76	3	14,29	0	0,00
<i>RENT2</i>	10p14	1	4,76	3	14,29	0	0,00
<i>CREM</i>	10p12.1	0	0,00	2	9,52	0	0,00
<i>CCND1</i>	11q13	0	0,00	9	<b>42,86</b>	5	<b>23,81</b>
<i>EMS1</i>	11q13	0	0,00	9	<b>42,86</b>	5	<b>23,81</b>
<i>IL18</i>	11q23.1	0	0,00	4	19,05	0	0,00
<i>IGSF4</i>	11q23	1	4,76	2	9,52	0	0,00
<i>BRCA2</i>	13q12.3	0	0,00	2	9,52	0	0,00
<i>RB1</i>	13q14.2	2	9,52	2	9,52	0	0,00

Gen	Cromosoma	N° Pérdidas	%	N° Ganancias	%	N° Amplificaciones	%
<i>DLEU1</i>	13q14.3	0	0,00	2	9,52	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	5	<b>23,81</b>	2	9,52	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	6	<b>28,57</b>	1	4,76	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	4	19,05	3	14,29	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	6	<b>28,57</b>	2	9,52	0	0,00
<i>ERBB2</i>	17q21.1	2	9,52	2	9,52	1	4,76
<i>CDH2</i>	18q11.2	1	4,76	6	<b>28,57</b>	0	0,00
<i>MADH2</i>	18q21.1	1	4,76	6	<b>28,57</b>	0	0,00
<i>BCL2</i>	18q21.2	2	9,52	0	0,00	0	0,00
<i>STK11</i>	19p13.3	5	<b>23,81</b>	2	9,52	0	0,00
<i>CDKN2D</i>	19p13	5	<b>23,81</b>	1	4,76	0	0,00
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	0	0,00	8	<b>38,10</b>	0	0,00
<i>PTPN1</i>	20q13.1	0	0,00	1	4,76	0	0,00

En la figura 21 se representan las **pérdidas** génicas más importantes observadas en los STP. Destaca por orden de frecuencia el gen *CDKN2A*, que presenta pérdidas en más del 60 %, mientras que las de los genes *TP53* (exón 9) y *TP53* (exón 11) se observan en al más del 28 % de las muestras analizadas.

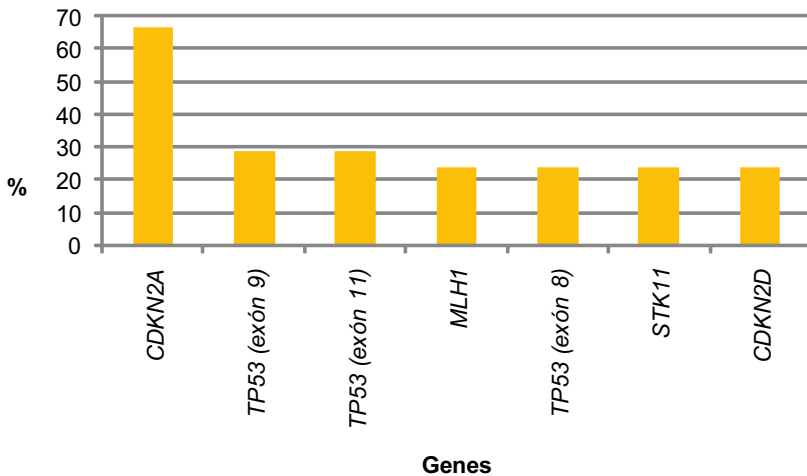


Figura 21. Pérdidas génicas en los 21 STP.

En la figura 22 se representan las **ganancias** génicas más importantes observadas en los STP. Destacan por orden de frecuencia los genes *CCND1*, *EMS1*, *BCL2L1* y *N33* que presentan ganancias en más del 33% de las muestras analizadas.

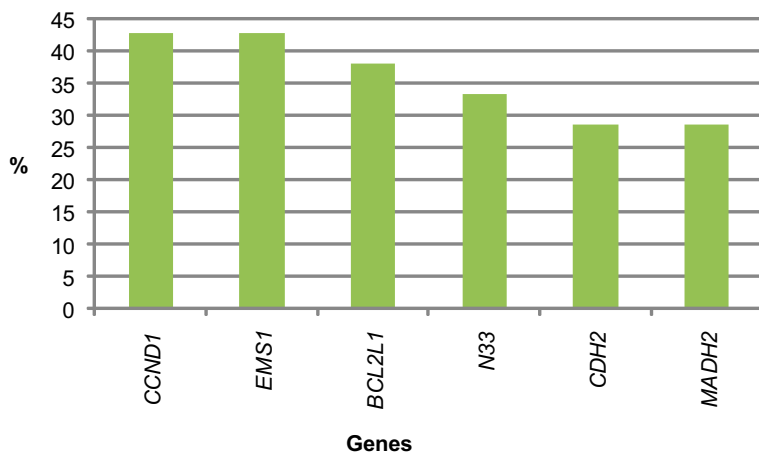


Figura 22. Ganancias génicas en los 21 STP.

En la figura 23 se representan las **amplificaciones** génicas más importantes observadas en los STP. Destacan los genes *CCND1* y *EMS1* que están amplificados en más del 23% de las muestras analizadas.

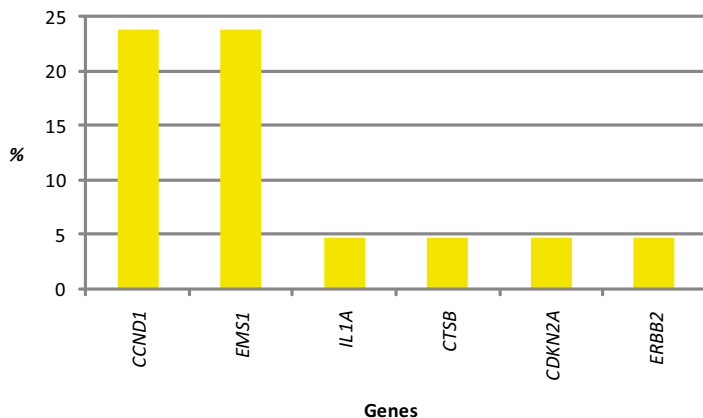


Figura 23. Amplificaciones génicas en los 21 STP.

*Resumen*

Las alteraciones génicas más frecuentes en los STP son las pérdidas en *CDKN2A* y *TP53*, las ganancias en *BCL2L1*, *CCND1* y *EMS1*, junto a las amplificaciones en estos dos últimos genes.

## 8.2.1.3 Alteraciones génicas en las 15 RT

En la tabla XVI se presentan todas las alteraciones génicas detectadas en las 15 RT.

Tabla XVI. Alteraciones génicas en las 15 RT. En negrita se resaltan los valores más destacados.

Gen	Cromosoma	Nº Pérdidas	%	Nº Ganancias	%	Nº Amplificaciones	%
<i>NRAS</i>	01p13.2	1	6,67	2	13,33	0	0,00
<i>LMNA</i>	01q21.2	0	0,00	11	<b>73,33</b>	1	6,67
<i>IL1A</i>	02q14	0	0,00	3	20,00	0	0,00
<i>MLH1</i>	03p22.1	4	<b>26,67</b>	0	0,00	0	0,00
<i>MLH1</i>	03p22.1	3	20,00	0	0,00	0	0,00
<i>CTNNB1</i>	03p22	3	20,00	0	0,00	0	0,00
<i>CASP6</i>	04q25	5	<b>33,33</b>	0	0,00	0	0,00
<i>IL2</i>	04q26	1	6,67	0	0,00	0	0,00
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	4	<b>26,67</b>	5	<b>33,33</b>	0	0,00
<i>CTSB</i>	08p22	3	20,00	5	<b>33,33</b>	2	13,33
<i>N33</i>	08p22	2	13,33	1	6,67	0	0,00
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	0	0,00	4	<b>26,67</b>	0	0,00
<i>RECQL4</i>	08q24.3	2	13,33	3	20,00	0	0,00
<i>CDKN2A</i>	09p21	3	20,00	1	6,67	0	0,00
<i>A1651963</i>	10p14	6	<b>40,00</b>	1	6,67	0	0,00
<i>RENT2</i>	10p14	5	<b>33,33</b>	1	6,67	0	0,00
<i>CREM</i>	10p12.1	0	0,00	4	<b>26,67</b>	0	0,00
<i>CCND1</i>	11q13	0	0,00	8	<b>53,33</b>	6	<b>40,00</b>
<i>EMS1</i>	11q13	0	0,00	9	<b>60,00</b>	6	<b>40,00</b>
<i>IL18</i>	11q23.1	7	<b>46,67</b>	0	0,00	0	0,00
<i>IGSF4</i>	11q23	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>BRCA2</i>	13q12.3	2	13,33	1	6,67	0	0,00

*continúa en la página siguiente*



Gen	Posición en cromosoma	Nº Pérdidas	%	Nº Ganancias	%	Nº Amplif.	%
<i>RB1</i>	13q14.2	4	26,67	0	0,00	0	0,00
<i>DLEU1</i>	13q14.3	1	6,67	0	0,00	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	2	13,33	4	26,67	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	2	13,33	2	13,33	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	0	0,00	2	13,33	0	0,00
<i>TP53</i>	17p13.1	0	0,00	2	13,33	0	0,00
<i>ERBB2</i>	17q21.1	2	13,33	5	33,33	2	13,33
<i>CDH2</i>	18q11.2	3	20,00	1	6,67	0	0,00
<i>MADH2</i>	18q21.1	0	0,00	0	0,00	0	0,00
<i>BCL2</i>	18q21.2	2	13,33	1	6,67	0	0,00
<i>STK11</i>	19p13.3	1	6,67	3	20,00	0	0,00
<i>CDKN2D</i>	19p13	3	20,00	4	26,67	0	0,00
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	0	0,00	9	60,00	0	0,00
<i>PTPN1</i>	20q13.1	0	0,00	8	53,33	0	0,00

En la figura 24 se representan las **pérdidas** génicas más importantes observadas en las RT. Destacan por orden de frecuencia los genes *IL18*, *A1651963*, *CASP6* y *RENT2*, que presentan pérdidas en más del 33 % de las muestras analizadas.

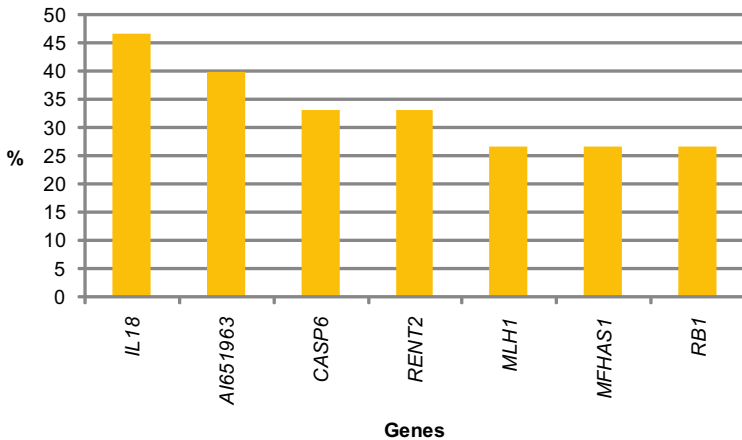


Figura 24. Pérdidas génicas en las 15 RT.

En la figura 25 se representan las **ganancias** génicas más importantes observadas en las RT. Destacan por orden de frecuencia los genes *LMNA*, *BCL2L1*, *EMS1*, *CCND1* y *PTPN1*, que presentan ganancias en más del 50% de las muestras analizadas.

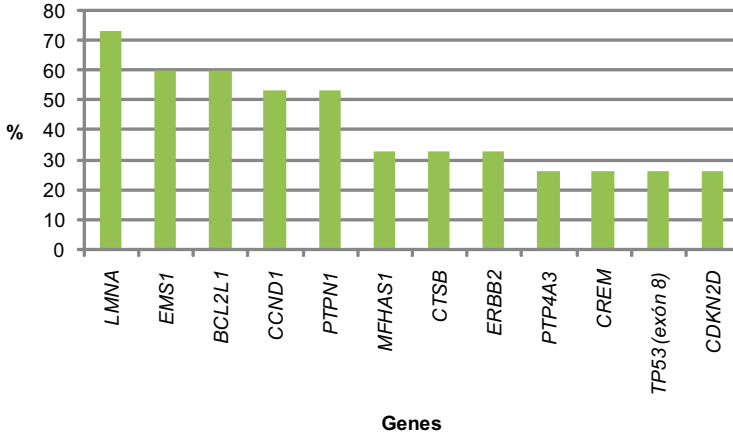


Figura 25. Ganancias génicas en las 15 RT.

En la figura 26 se representan las **amplificaciones** génicas más importantes observadas en las RT. Destacan los genes *CCND1* y *EMS1*, que presentan amplificaciones en más del 40% de las muestras analizadas.

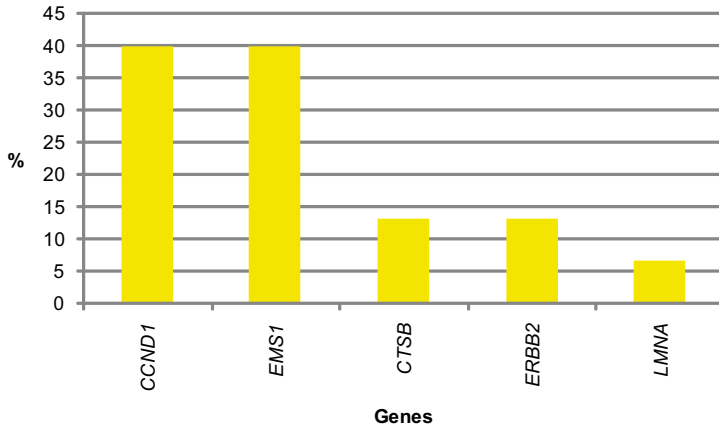


Figura 26. Amplificaciones génicas en las 15 RT.

## Resumen

Las alteraciones génicas más frecuentes en las RT son las pérdidas en *IL18*, *A1651963*, *CASP6*, *RENT2*, las ganancias en *LMNA*, *BCL2L1*, *EMS1*, *CCND1*, junto a las amplificaciones en estos dos últimos genes.

### 8.2.2 Comparación de las alteraciones génicas

Para facilitar la comprensión de las distintas comparaciones puede ser útil acudir a la figura 7.

#### 8.2.2.1 Entre los 36 PT y los 21 STP

En la tabla XVII se muestran los valores estadísticamente significativos.

Las **pérdidas** de los genes *IL2*, *A1651963*, *IL18*, *BRCA2*, *DLEU1*, *CDH2* y la **ganancia** de *CDKN2D* se correlacionaron de forma significativa al comparar los PT y los STP con la t de Student.

Tabla XVII. Comparación entre las alteraciones génicas de los PT y STP.

Gen	Nº PT	Nº STP	p (t-Student)
<i>IL2</i> -	4/36	0/21	<b>0,044</b>
<i>A1651963</i> -	13/36	1/21	<b>0,002</b>
<i>IL18</i> -	10/36	0/21	<b>0,001</b>
<i>BRCA2</i> -	7/36	0/21	<b>0,006</b>
<i>DLEU1</i> -	4/36	0/21	<b>0,044</b>
<i>CDH2</i> -	9/36	1/21	<b>0,024</b>
<i>CDKN2D</i> +	8/36	1/21	<b>0,045</b>

(-: pérdida; +: ganancia)

En las figuras 27, 28 y 29 se representan las pérdidas, ganancias y amplificaciones génicas más importantes comparando los PT con los STP.

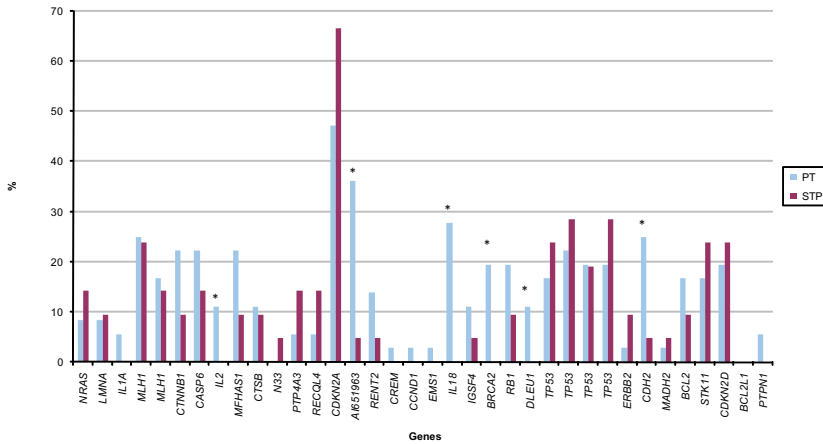


Figura 27. Comparación de las pérdidas génicas entre los PT (N=36) y STP (N=21). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

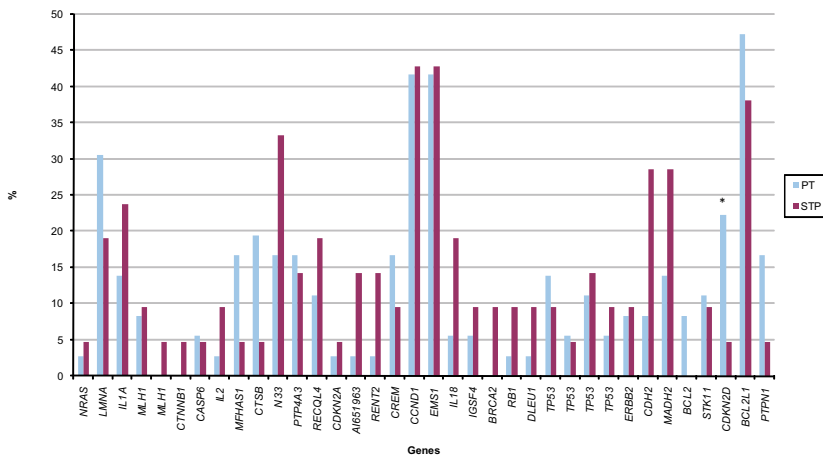


Figura 28. Comparación de las ganancias génicas entre los PT (N=36) y STP (N=21). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

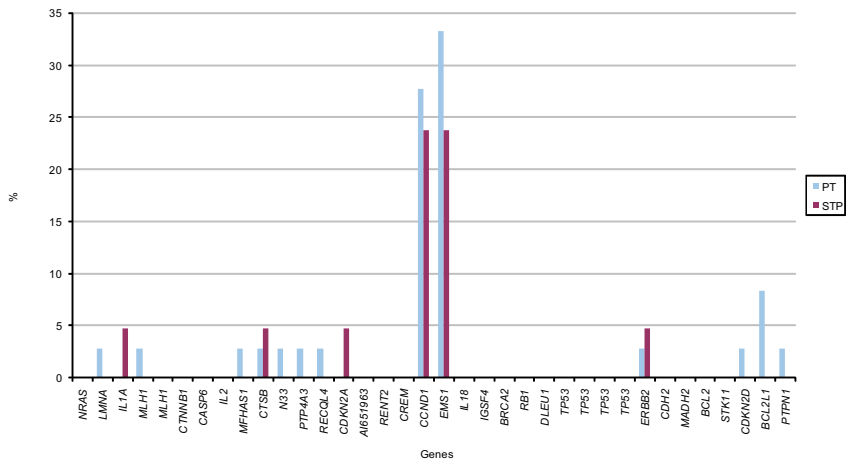


Figura 29. Comparación de las amplificaciones génicas entre los PT (N=36) y STP(N=21).

### Resumen

Las alteraciones génicas que diferencian los PT y los STP de forma significativa son las pérdidas en *IL2*, *A1651963*, *IL18*, *BRCA2*, *DLEU1*, *CDH2* y la ganancia de *CDKN2D*.

#### 8.2.2.2 Entre los 36 PT y las 15 RT

En la tabla XVIII se muestran los valores estadísticamente significativos.

Las **pérdidas** de los genes *IGSF4* y *TP53* (exones 10 y 11) y las **ganancias** de *LMNA* y *PTPN1* se correlacionaron de forma significativa al comparar los PT y las RT con la t de Student.

Tabla XVIII. Comparación entre las alteraciones génicas de los PT y RT.

Gen	Nº PT	Nº RT	p (t-Student)
<i>N33</i> -	0/36	2/15	0,164
<i>CDKN2A</i> -	17/36	3/15	0,054
<i>IGSF4</i> -	4/36	0/15	<b>0,044</b>
<i>TP53</i> (exón 10) -	7/36	0/15	<b>0,006</b>
<i>TP53</i> (exón 11) -	7/36	0/15	<b>0,006</b>
<i>LMNA</i> +	11/36	11/15	<b>0,005</b>
<i>ERBB2</i> +	3/36	5/15	0,079
<i>PTPN1</i> +	6/36	8/15	<b>0,022</b>

(-: pérdida; +: ganancia)

En las figuras 30, 31 y 32 se representan las pérdidas, ganancias y ampli-ficaciones génicas más importantes comparando los PT con las RT.

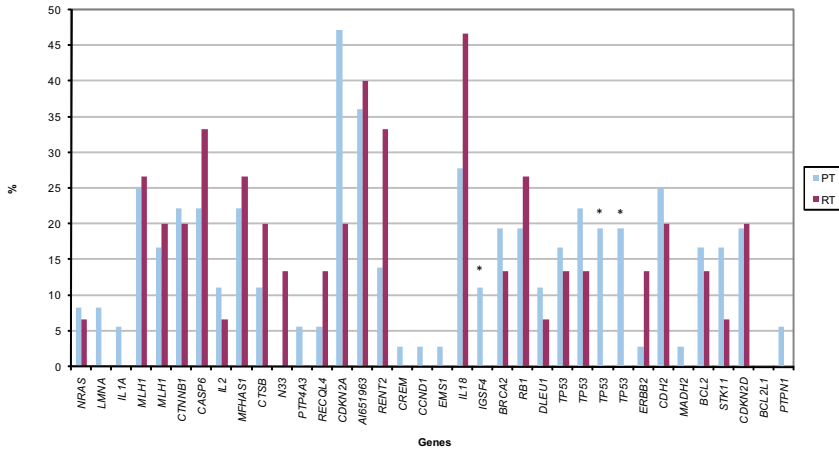


Figura 30. Comparación de las pérdidas génicas entre los PT (N=36) y RT (N=15). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

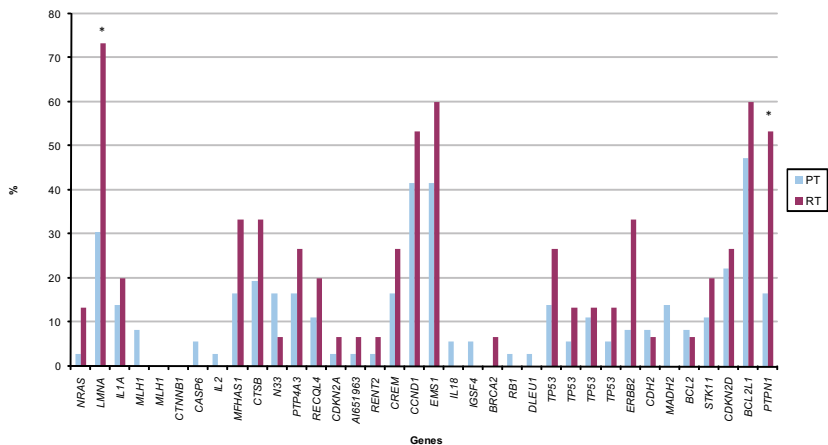


Figura 31. Comparación de las ganancias génicas entre los PT (N=36) y RT (N=15). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

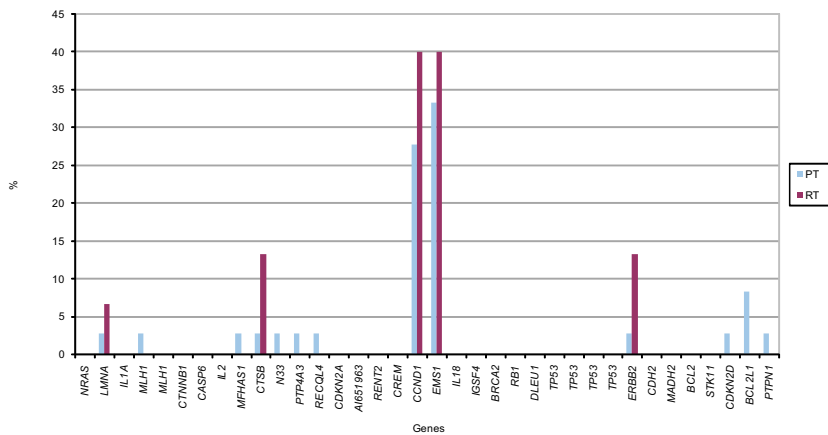


Figura 32. Comparación de las amplificaciones génicas entre los PT (N=36) y RT (N=15).

### Resumen

Las alteraciones génicas que diferencian los PT y las RT de forma significativa son las pérdidas en *IGSF4* y *TP53*, más frecuentes en los PT, y las ganancias en *LMNA* y *PTPN1*, más frecuentes en las RT.

## 8.2.2.3 Entre los 21 STP y las 15 RT

En la tabla XIX se muestran los valores estadísticamente significativos.

Las **pérdidas** de los genes *CDKN2A*, *TP53* (exón 11), *MFHAS1*, *A1651963*, *RENT2* y *IL18* y las **ganancias** de *N33*, *LMNA*, *CTSB* y *PTPN1* se correlacionaron de forma estadísticamente significativa al comparar los STP y las RT con la t de Student.

Tabla XIX. Comparación entre las alteraciones génicas de los STP y RT.

Gen	Nº STP	Nº RT	p (t-Student)
<i>TP53</i> (exón 11) -	6/21	0/15	<b>0,01</b>
<i>IL18</i> -	0/21	7/15	<b>0,004</b>
<i>MFHAS1</i> -	2/21	4/15	<b>0,048</b>
<i>CDKN2A</i> -	14/21	3/15	<b>0,004</b>
<i>A1651963</i> -	1/21	6/15	<b>0,021</b>
<i>RENT2</i> -	1/21	5/15	<b>0,048</b>
<i>CTSB</i> +	1/21	5/15	<b>0,048</b>
<i>N33</i> +	7/21	1/15	<b>0,04</b>
<i>LMNA</i> +	4/21	11/15	<b>0,001</b>
<i>PTPN1</i> +	1/21	8/15	<b>0,003</b>

(-: pérdida; +: ganancia)

En las figuras 33, 34 y 35 se representan las pérdidas, ganancias y ampliificaciones génicas más importantes comparando los STP con las RT.

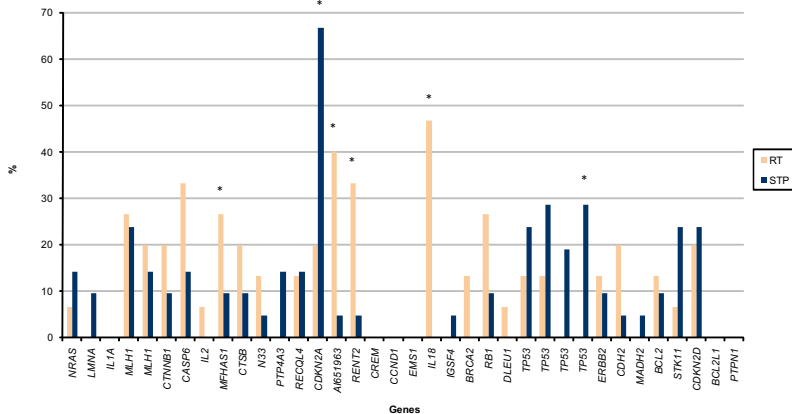


Figura 33. Comparación de las pérdidas génicas entre los STP (N=21) y RT (N=15). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).



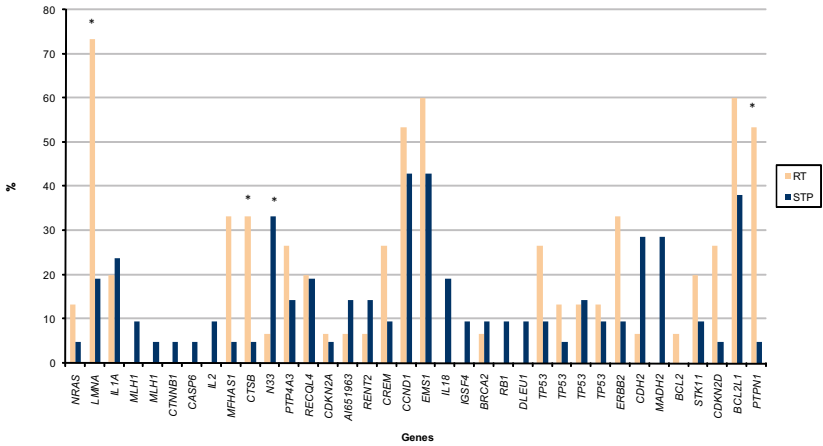


Figura 34. Comparación de las ganancias génicas entre los STP (N=21) y RT (N=15). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

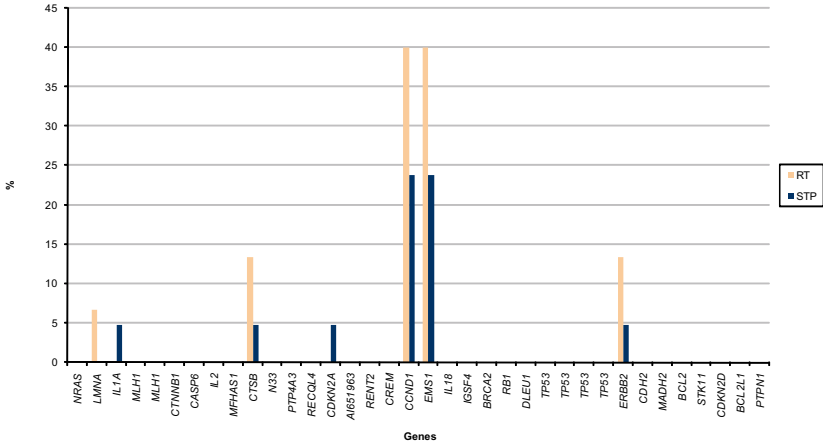


Figura 35. Comparación de las amplificaciones génicas entre los STP (N=21) y RT (N=15).

### Resumen

Las alteraciones génicas que diferencian los STP y las RT son las pérdidas en *TP53* (exón 11), *CDKN2A*, más frecuentes en los STP, y las pérdidas en *A1651963*, *RENT2*, *MFHAS1*, *IL18* más frecuentes en las RT. Las ganancias en *LMNA*, *CTSB* y *PTPN1* son más frecuentes en las RT, mientras que *N33* lo es en los STP.

#### 8.2.2.4 Entre los 15 PT que desarrollaron RT y los 21 PT que desarrollaron STP

La **pérdida** del gen *CDH2* fue la única alteración génica que se correlacionó de forma estadísticamente significativa al comparar los PT con evolución a RT y STP con la t de Student.

En las figuras 36, 37 y 38 se representan las pérdidas, ganancias y ampliificaciones génicas más importantes comparando los PT con evolución a RT y STP.

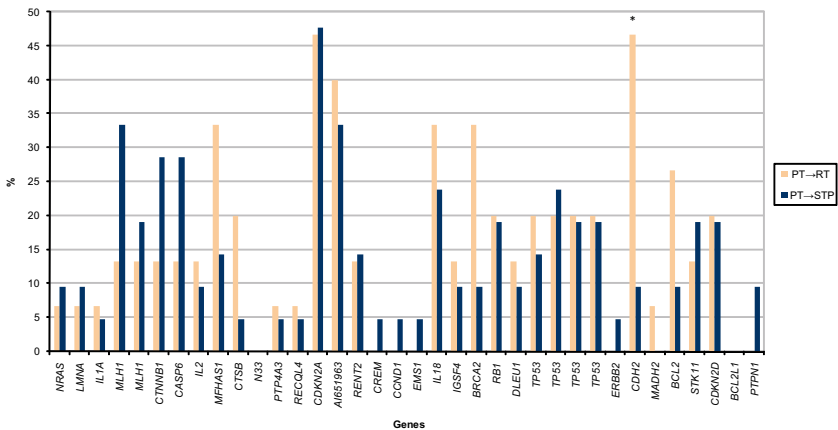


Figura 36. Comparación de las pérdidas génicas entre los PT→STP (N=21) y los PT→RT (N=15). Con \* se señalan los genes significativos (t de Student).

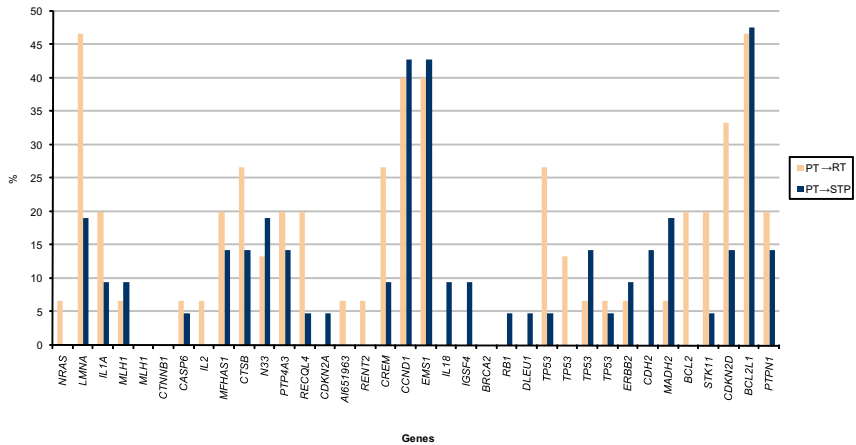


Figura 37. Comparación de las ganancias génicas entre los PT→STP (N:21) y los PT→RT (N=15).

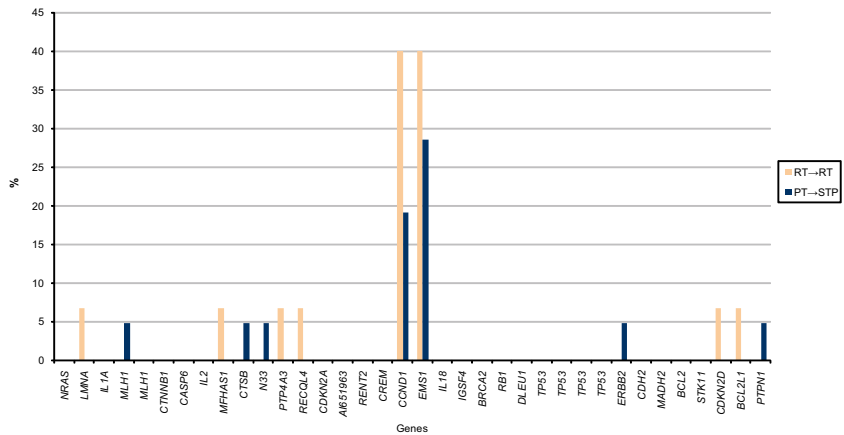


Figura 38. Comparación de las amplificaciones génicas entre los PT→STP (N=21) y los PT→RT (N=15).

### Resumen

La única alteración génica que diferencia a los PT→STP de los PT→RT es la pérdida de *CDH2* en estos últimos.

### 8.2.3 Concordancias y discordancias entre las alteraciones génicas

Denominamos concordancias a las alteraciones génicas que coinciden cuando comparamos dos grupos similares en número, en este caso los PT→STP (N=21) y los STP (N=21). Discordancias serían por tanto la falta de coincidencias en estas alteraciones. Siguiendo lo expuesto en el Modelo Teórico (Apartado 4) las concordancias y discordancias nos podrían indicar el patrón génico de similitud entre el PT y la RT, mientras que en el caso del STP sería un patrón génico de diferencia. En este punto establecemos el umbral de concordancia cuando la similitud de cada alteración génica es mayor del 50%, mientras que si es inferior se considera discordancia o dudosa.

#### 8.2.3.1 Entre los 21 PT y 21 STP

Las **ganancias** génicas concordantes y discordantes significativas entre PT→STP y STP se ponen de manifiesto en la tabla xx. Al analizar la concordancia y discordancia entre ambos grupos se objetivaron, con la prueba del estadístico exacto de Fisher, valores significativos en *EMS1*, *IL18*, *TP53* (exón 10) y *BCL2L1*. Sin embargo, al estudiar las diferencias mediante la prueba de Mc Nemar no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tabla xx. Ganancias concordantes y discordantes entre PT→STP(N=21) y STP (N=21).

Gen	crom	si-si	Chi2	no-si + si-no	no-si	Chi2
		%concord	Fisher Exact	%discord	%incremento	McNemar
<i>LMNA</i>	01q21.2	33,33%	0,148	66,67%	33,33%	1,000
<i>IL1A</i>	02q14	0/7	0,570	100,00%	71,43%	0,450
<i>MLH1</i>	03p22.1	0/4	0,800	100,00%	50,00%	1,000
<i>N33</i>	08p22	22,22%	0,410	77,78%	55,56%	0,450
<i>RECQL4</i>	08q24.3	0/5	0,810	100,00%	80,00%	0,370
<i>CCND1</i>	11q13	50,00%	0,071	50,00%	25,00%	1,000
<i>EMS1</i>	11q13	63,64%	<b>0,008</b>	36,36%	18,18%	1,000
<i>IL18</i>	11q23.1	50,00%	<b>0,029</b>	50,00%	50,00%	0,500
<i>TP53 (exón 10)</i>	17p13.1	50,00%	<b>0,041</b>	50,00%	25,00%	1,000
<i>CDH2</i>	18q11.2	28,57%	0,184	71,43%	57,14%	0,370
<i>MADH2</i>	18q21.1	25,00%	0,316	75,00%	50,00%	0,687
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	63,64%	<b>0,007</b>	36,36%	9,09%	0,630

Las **pérdidas** génicas concordantes y discordantes significativas entre PT y STP se ponen de manifiesto en la tabla XXI. Al analizar la concordancia y discordancia entre ambos grupos se objetivaron, con la prueba del estadístico exacto de Fisher, valores significativos en *TP53* (exón 9). Al estudiar las diferencias mediante la prueba de Mc Nemar se observaron valores significativos en *AI651963*.

Tabla XXI. Pérdidas concordantes y discordantes entre PT→STP (N=21) y STP (N=21).

Gen	crom	si-si	Chi2	no-si + si-no	no-si	Chi
		% <i>concor</i>	<i>Fisher Exact</i>	% <i>discord</i>	% <i>incremento</i>	<i>Mc Nemar</i>
<i>NRAS</i>	01p13.2	0/5	1,000	100,00%	60,00%	1,000
<i>LMNA</i>	01q21.2	0/4	1,000	100,00%	50,00%	1,000
<i>MLH1</i>	03p22.1	22,22%	0,280	66,67%	22,22%	0,690
<i>MLH1</i>	03p22.1	40,00%	0,080	60,00%	20,00%	1,000
<i>CTNNB1</i>	03p22	14,29%	0,500	85,71%	14,29%	0,220
<i>CASP6</i>	04q25	12,50%	1,000	87,50%	25,00%	0,450
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	0/5	0,729	100,00%	40,00%	1,000
<i>CTSB</i>	08p22	0/3	0,900	100,00%	66,67%	1,000
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	0/4	0,850	100,00%	75,00%	0,630
<i>RECQL4</i>	08q24.3	0/4	0,850	100,00%	75,00%	0,630
<i>CDKN2A</i>	09p21	50,00%	0,220	50,00%	100,00%	0,290
<i>AI651963</i>	10p14	14,29%	0,330	85,71%	0/7	<b>0,031</b>
<i>RENT2</i>	10p14	33,33%	0,140	66,67%	0/3	0,500
<i>TP53 (exón 8)</i>	17p13.1	33,33%	0,130	66,66%	50,00%	0,630
<i>TP53 (exón 9)</i>	17p13.1	57,14%	<b>0,011</b>	42,86%	28,57%	1,000
<i>TP53 (exón 10)</i>	17p13.1	14,29%	0,600	85,71%	42,86%	1,000
<i>TP53 (exón 11)</i>	17p13.1	25,00%	0,320	75,00%	50,00%	0,680
<i>ERBB2</i>	17q21.1	50,00%	0,095	50,00%	50,00%	1,000
<i>CDH2</i>	18q11.2	50,00%	0,095	50,00%	0/2	1,000
<i>BCL2</i>	18q21.2	0/4	0,800	100,00%	50,00%	1,000
<i>STK11</i>	19p13.3	28,57%	0,230	71,43%	42,86%	1,000
<i>CDKN2D</i>	19p13	28,57%	0,230	71,43%	42,86%	1,000

Las amplificaciones génicas no mostraron valores significativos con ambos test al analizar sus concordancias y discordancias.

## Resumen

Las alteraciones génicas concordantes entre los PT→STP y los STP son las ganancias en *EMS1*, *IL18* y *TP53* (exón 10) y la pérdida en *TP53* (exón 9). La alteración discordante corresponde la pérdida en *A1651963*.

## 8.2.3.2 Entre los 15 PT y las 15 RT

Las ganancias génicas concordantes y discordantes entre los PT→RT y las RT se ponen de manifiesto en la tabla XXII. Al analizar la concordancia y discordancia de los genes no se objetivaron valores significativos con el estadístico exacto de Fisher ni con la prueba de cambios mínimos de Mc Nemar.

Tabla XXII. Ganancias concordantes y discordantes y concordantes entre PT→RT (N=15) y RT (N=15).

Gen	crom	si-si	Chi2	no-si + si-no	no-si	Chi2
		%concord	Fisher Exact	%discord	%incremento	McNemar
<i>LMNA</i>	01q21.2	28,57%	0,231	71,42%	50,00%	0,344
<i>IL1A</i>	02q14	50,00%	0,081	50,00%	25,00%	1,000
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	33,33%	0,242	66,66%	50,00%	0,625
<i>CTSB</i>	08p22	28,57%	0,407	71,42%	42,85%	1,000
<i>PTP4A3</i>	08q24.3	16,66%	0,637	83,33%	50,00%	1,000
<i>CCND1</i>	11q13	55,55%	0,084	44,44%	33,33%	0,625
<i>EMS1</i>	11q13	50,00%	0,168	50,00%	40,00%	0,375
<i>TP53 (exón 8)</i>	17p13.1	14,28%	0,725	85,71%	42,85%	1,000
<i>TP53 (exón9)</i>	17p13.1	0/4	0,743	100,00%	50,00%	1,000
<i>TP53 (exón 10)</i>	17p13.1	0/3	0,867	100,00%	66,66%	1,000
<i>TP53 (exón 11)</i>	17p13.1	0/3	0,867	100,00%	66,66%	1,000
<i>ERBB2</i>	17q21.1	20,00%	0,333	80,00%	80,00%	0,125
<i>CDKN2D</i>	19p13	50,00%	0,077	50,00%	16,66%	1,000
<i>BCL2L1</i>	20q11.1	45,45%	0,378	54,54%	36,36%	0,687
<i>PTPN1</i>	20q13.1	37,50%	0,123	62,50%	62,50%	0,063

Las **pérdidas** génicas discordantes y concordantes entre los PT→RT y RT se ponen de manifiesto en la tabla xxiii. Al analizar la concordancia y discordancia entre las pérdidas de los genes se objetivó que el gen *MLH1* presentaba valores significativos con la prueba del estadístico exacto de Fisher, pero no se correspondía con la prueba de cambios mínimos de Mc Nemar.

Tabla xxiii. Pérdidas discordantes y concordantes entre PT→RT (N=15) y RT (N=15).

Gen	crom	si-si	Chi2	no-si + si-no	no-si	Chi2
		%concord	Fisher Exact	%discord	%incremento	McNemar
<i>MLH1</i>	03p22.1	50,00%	0,057	50,00%	50,00%	0,500
<i>MLH1</i>	03p22.1	66,66%	<b>0,029</b>	33,33%	33,33%	1,000
<i>CTNNB1</i>	03p22	25,00%	0,371	75,00%	50,00%	1,000
<i>CASP6</i>	04q25	16,66%	0,571	83,33%	66,66%	0,375
<i>MFHAS1</i>	08p23.1	12,50%	0,593	87,50%	37,50%	1,000
<i>CTSB</i>	08p22	0/6	0,484	100,00%	50,00%	1,000
<i>CDKN2A</i>	09p21	25,00%	0,450	75,00%	12,50%	0,219
<i>A1651963</i>	10p14	50,00%	0,119	50,00%	25,00%	1,000
<i>RENT2</i>	10p14	16,66%	0,571	83,33%	66,66%	0,375
<i>IL18</i>	11q23.1	50,00%	0,100	50,00%	37,50%	0,625
<i>RB1</i>	13q14.2	16,66%	0,637	83,33%	50,00%	1,000

Las **amplificaciones** génicas no mostraron valores significativos con ambos test al analizar sus concordancias y discordancias.

### Resumen

La única alteración génica concordante entre los PT→RT y las RT es la pérdida en *MLH1*.

## 8.2.3.3 Entre cada PT con su correspondiente STP/ RT

Se comparó cada PT (PT→STP (N=21) y PT→RT (N=15)) con su posterior STP (N=21) y RT (N=15), con el fin de establecer similitudes y diferencias y confirmar o descartar el diagnóstico clínico realizado (Tablas xxiv y xxv). En este punto se agruparon todas las alteraciones de forma cualitativa, estableciendo el siguiente perfil de similitud o diferencia: muy concordante (>50%), intermedio o dudoso (25-50%) y discordante (<25%).

Tabla xxiv. Concordancia y discordancias en las alteraciones génicas entre cada PT →RT (N=15) y sus posteriores RT (N=15).

Pareja PT→RT	Nº Total alteraciones	% Concordancias	% Discordancias
1	11	81,81	18,18
2	16	43,75	56,25
3	19	0	100
4	27	33,33	66,66
5	10	0	100
6	18	55,55	44,44
7	21	19,04	80,95
8	21	19,04	80,95
9	16	6,25	93,75
10	13	38,46	61,53
11	18	0	100
12	22	36,36	63,63
13	11	27,27	72,72
14	15	13,33	86,66
15	19	26,31	73,68

En el grupo PT→RT (N=15) y sus respectivas RT (N=15) observamos 2 casos (13,33%), (nº: 1 y 6) muy concordantes, 6 intermedios (40%), (nº: 2,4,10,12,13 y 15) y 7 discordantes (46,66%), (nº: 3,5,7,8,9,11 y 14) (Tabla xxiv).



Tabla xxv. Concordancia y discordancias en las alteraciones génicas entre cada PT→STP (N=21) y sus posteriores STP (N=21).

Pareja PT→SPT	Nº Total de alteraciones	% Concordancias	% Discordancias
1	17	11,76	88,23
2	5	0	100
3	13	46,15	53,84
4	11	27,27	72,72
5	18	11,11	88,88
6	11	72,72	27,27
7	19	36,84	63,15
8	20	0	100
9	20	30	70
10	11	9,09	90,90
11	22	59,09	40,90
12	14	7,14	92,85
13	7	28,57	71,42
14	18	33,33	66,66
15	20	40	60
16	21	4,76	95,23
17	5	20	80
18	17	17,64	82,35
19	6	16,66	83,33
20	12	0	100
21	7	14,28	85,71

En el grupo PT→STP (N=21) y a sus respectivos STP (N=21) observamos 2 casos (9,52%), (nº: 6 y 11) muy concordantes, 7 intermedios (33,33%), (nº: 3,4,7,9,13,14 y 15) y 12 discordantes (57,14%), (nº: 1,2,5,8,10,12,16,17, 18,19,20,21)(Tabla xxv).

### Resumen

En ambos grupos (PT→RT, PT→STP) predominaría un perfil génico de discordancia con sus correspondientes RT y STP, ligeramente superior en estos últimos.

### 8.3 Estudio de supervivencia

Los resultados referidos a la supervivencia, sobre todo los que la correlacionan con las alteraciones génicas, aunque sean significativos, deben ser tomados como orientativos debido al limitado número de pacientes que entró en ese estudio.

#### 8.3.1 Comparación entre la supervivencia de los pacientes con STP y RT

Se observó que la supervivencia en los pacientes con RT (N=15) era peor que en los STP (N=21), siendo estas diferencias estadísticamente significativas, tal y como se muestra en la figura 39.

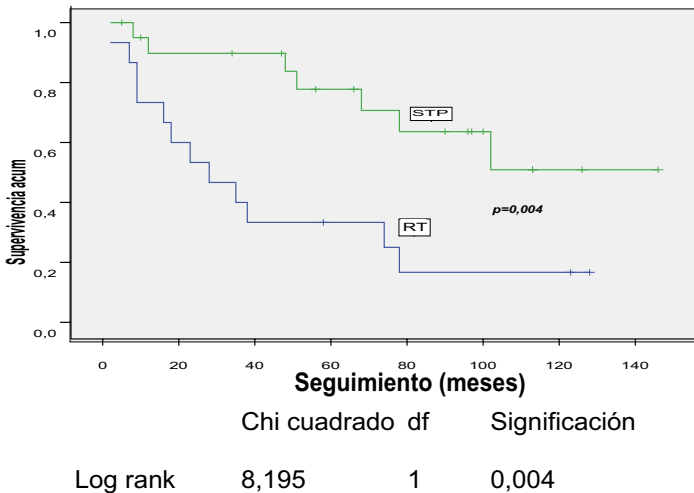


Figura 39. Curva de supervivencia para las RT (azul) y los STP (verde). El "log rank test" muestra diferencias significativas.

#### 8.3.2 Correlación de las alteraciones génicas de los PT con la supervivencia.

El total de los resultados estadísticamente significativos para todos los grupos se muestra en la tabla xxvi. En la tabla también se refleja el número de pacientes entre los que se estableció la correlación.

En los PT (N=36) la supervivencia se correlacionó de forma significativa con la pérdida en el gen *MADH2* y con las ganancias en *IGSF4* y en *TP53* (exón 9).

En los PT→STP (N=21) la supervivencia se correlacionó de forma significativa con la ganancia en el gen *CDKN2A* y con la amplificación de *PTPN1*.

En los PT→RT (N=15) la supervivencia se correlacionó de forma significativa con las pérdidas en los genes *LMNA*, *PTP4A3* y *RECQL4*, así como con la ganancia en *TP53* (exón 9).

Tabla xxvi. Supervivencia y alteraciones génicas.

Genes	Grupos						Log Rank test		
	PT		PT→STP		PT→RT		$\chi^2$	gl	p
	♥	†	♥	†	♥	†			
<i>MADH2</i> -	1	0					5,03	1	0,0249
<i>IGSF4</i> +	1	1					7,09	1	0,008
<i>TP53</i> (9)+	0	2					19,649	1	0,000
<i>CDKN2A</i> +			0	1			4,22	1	0,04
<i>PTPN1</i> ++			0	1			4,22	1	0,04
<i>LMNA</i> -					0	1	5,78	1	0,016
<i>PTP4A3</i> -					0	1	5,78	1	0,016
<i>RECQL</i> -					0	1	5,78	1	0,016
<i>TP53</i> (9)+					0	2	8,634	1	0,003
<i>TP53</i> (10)+					0	1	14,000	1	0,000
<i>TP53</i> (11)+					0	1	14,000	1	0,000

♥: vivo; †: fallecido; -: pérdida; +: ganancia; ++Amplificación;

## Resumen

La supervivencia en los pacientes con RT es muy baja respecto a los STP.

Se han encontrado un buen número de alteraciones génicas relacionadas con la supervivencia, aunque en un número muy reducido de pacientes.





## 9. Discusión



Como preámbulo a la interpretación de los datos obtenidos he de hacer las siguientes consideraciones que ayudarán a situar en su justa medida esta discusión, con el fin de obtener unas conclusiones más sólidas. Se deben tener en cuenta los distintos sesgos establecidos en la selección de la muestra, sobre todo el reducido número de pacientes, producto de los estrictos criterios de inclusión. Por ese motivo, y en relación con los datos génicos, en lo que respecta a su correlación con la supervivencia, los resultados del estudio estadístico, aunque sean significativos, han de ser tomados como orientativos.

### **9.1. Datos clínicos e histopatológicos**

La muestra completa estudiada de 36 casos es de tamaño reducido y no trata de definir los aspectos clínico-histopatológicos generales de los CECC. Además, la selección no se hizo de forma aleatoria, sino de acuerdo al material clínico e histopatológico disponible. Los criterios de selección establecidos, entre los que destacan no haber recibido radio y/o quimioterapia antes del diagnóstico de STP o RT, son muy restrictivos y han limitado mucho el número de casos. Este sesgo también ha hecho que el grupo de las RT tenga un número inferior al de los STP, pues al tratarse en muchos casos de PT con estadios avanzados, habrían recibido radioterapia complementaria después de la cirugía. No obstante, la tendencia natural en la reducción de las RT y el aumento en los STP ya había sido señalada por nosotros en artículos previos<sup>13,20</sup>.

Al analizar los resultados obtenidos se observó un claro predominio del sexo masculino, tanto en el grupo de PT como en los STP y RT, sin que se estableciesen diferencias sustanciales entre ellos. Este hecho concuerda con lo descrito en estudios previos donde el sexo masculino es dominante en el CECC<sup>41,43,44</sup>.



La **edad** media en el momento del diagnóstico del PT (58 años) es ligeramente inferior a la de series más amplias<sup>1,2</sup>, acentuándose esa tendencia en los STP (57 años), pero aumentando en las RT (61 años).

El consumo de **alcohol** y **tabaco** es un hecho habitual en nuestros pacientes y más del 75 % de la muestra estaba expuesta a ambos factores de riesgo, sin que se viesen diferencias sustanciales entre STP y RT. Se observó que la mayoría de los pacientes abandonaron esos hábitos después del diagnóstico del PT, aunque en los STP (90%) este valor era ligeramente inferior al de las RT (100%). Estos porcentajes tan altos de abandono, la deficiente recogida de datos en las historias clínicas (gramos de etanol/día, paquetes cigarrillos/año), junto al número limitado de casos, nos hizo ser prudentes en establecer una relación entre los hábitos tóxicos y el riesgo de STP o RT. No obstante, dados los resultados contradictorios que han aparecido publicados, será un aspecto epidemiológico muy interesante para analizar, aunque con una muestra más amplia y menos restrictiva<sup>24,25</sup>.

En cuanto a la **localización** del PT predominaban ligeramente los tumores laríngeos (56%) y dentro de ellos los supraglóticos, como es habitual en los CECC de nuestro medio. El porcentaje de neoplasias faríngeas no es despreciable llegando a representar el 44% de los diagnósticos realizados, como también se ha descrito (Tabla IV)<sup>1,2</sup>. Se observó que los STP asentaban mayoritariamente en la región de cabeza y cuello, si bien en nuestra serie las cifras son muy superiores (90%) a las publicadas por otros autores<sup>17,48</sup>. Esto se debe al sesgo establecido para la obtención de una muestra histopatológica adecuada, pues en series más numerosas nuestro grupo ha publicado cifras inferiores de STP en cabeza y cuello<sup>13</sup>. La localización del PT en los casos que evolucionaron a STP concuerda con lo observado en otros estudios, con un predominio en supraglotis, orofaringe y glotis (Tabla VIII)<sup>17,48,49</sup>. Se observa cierta tendencia a que los STP sincrónicos se localicen en zonas de cabeza y cuello, teniendo además los STP metacrónicos una ubicación menos dispersa a la descrita en series más amplias<sup>17,50</sup>. Esta diferencia podría estar condicionada por el reducido número de pacientes y el sesgo debido a la obtención de la muestra histopatológica.

En las RT se coincide con otros autores en la localización hipofaríngea como asiento del PT<sup>20,44</sup>, aunque también destaca la laringe supraglótica (Tabla x), quizás en relación al elevado número de tumores supraglóticos que hay en nuestro medio, más que a la frecuencia relativa de RT.

Se evidencia un predominio de las RT locorreregionales (53%), siendo las recidivas locales más frecuentes en los tumores supraglóticos y las estomales en los glóticos (Tabla x). No obstante, estos datos son discrepantes con otros estudios donde predominan las recidivas locales<sup>51</sup>. Este hallazgo podría justificarse por el hecho de que en los tumores de hipofaringe predominan las formas locorreregionales.

En cuanto a la **histopatología** se coincide con otros autores en que la gran mayoría de los STP eran carcinomas epidermoides (Tabla IX). El reducido número de pacientes observados con otra estirpe impide confirmar la influencia de la histopatología en la supervivencia, como han demostrado otros autores<sup>16</sup>. Al examinar el grado histopatológico del PT éste era bien o moderadamente diferenciado (86%), (Tabla VIII), hecho que estaba descrito en relación al riesgo de desarrollar un STP<sup>5</sup>.

Las RT tienen como rasgo habitual compartir estirpe histológica con el PT<sup>7</sup>, lo cual también se refleja en este estudio, sin que se observe predominio de tumores poco diferenciados (Tablas XI y XII), como han señalado otros autores<sup>165</sup>.

En la **estadificación** tumoral se emplea el sistema TNM<sup>73</sup>. Así, se pudo comprobar que la mayoría de los PT que desarrollaron STP tenían estadios precoces (I-II: 66%). No se observó, con una tendencia tan marcada a la descrita en la literatura, que los STP tuviesen un estadio más avanzado respecto a los PT previos (Tablas VIII y IX; figura 14)<sup>5,6,10,14,15</sup>. Sí se constató el predominio de STP metacrónicos (76%), relacionados con el diagnóstico del PT en estadios precoces, tal como atribuyen algunos autores a la mayor supervivencia de estos pacientes<sup>10,16</sup>.

En los PT previos a las RT se observó un predominio claro de estadios avanzados (III-IV: 67%), dato que también ha sido publicado aunque con mayores porcentajes<sup>45</sup>. Hay que indicar que la información obtenida de las

historias clínicas de nuestros pacientes no permitió estadificar la RT, aunque sí clasificarla en locorregional, local y estomal, predominando la primera (Tabla XII), como nuestro grupo ha demostrado recientemente en una serie clínica más amplia<sup>20</sup>.

La presencia de **ganglios linfáticos** positivos (pN+) era muy superior en los PT que desarrollaron RT (40%), respecto a los que tuvieron STP (19%), estando en relación con el estadio más avanzado que presentan los primeros<sup>13,20</sup>.

Los **bordes** de resección en la pieza quirúrgica de los PT que desarrollaron un STP estaban libres en el 95%, mientras que ese porcentaje se reducía al 80% cuando el PT desarrollaba una RT, como también ha sido publicado<sup>13,20</sup>.

El **tratamiento** inicial realizado a los PT fue siempre quirúrgico, al excluir a los pacientes que recibieron radio y/o quimioterapia antes del diagnóstico del STP o RT (Figura 13).

En nuestro estudio un alto porcentaje de STP (90%) y RT (80%) se beneficiaron de tratamiento quirúrgico, asociado en algunos casos a radioterapia complementaria, si bien aumentaron las indicaciones de protocolos de quimio-radioterapia, así como los tratamientos paliativos en el caso concreto de las RT (20%) (Figuras 15 y 17). Estos datos son coincidentes con otras series publicadas en las que predomina el tratamiento quirúrgico y en casos seleccionados la reirradiación<sup>8,14,45,50,71,76,77,78</sup>.

La **evolución** de los pacientes de la muestra completa de PT mostró un predominio de STP (58%) frente a RT (42%) (Tabla VI). En la literatura también se observa un aumento de SPT y de MD en detrimento de las RT<sup>2,5,6</sup>, siendo en la actualidad los STP la causa más frecuente de mortalidad en los CECC con estadios precoces<sup>13</sup>.

El tiempo medio transcurrido desde el tratamiento del PT y la aparición de un STP o RT era de 29 meses, pero si analizamos esta variable en la serie de los STP el período se prolonga a 41 meses, mientras en el caso de las RT se reduce al año. Estos datos no varían demasiado al compararlos con los que aparecen publicados en series más amplias<sup>16,20</sup>.

Se ha de señalar también que aunque en nuestro estudio predominaban

los STP metacrónicos, al igual que en estudios previos<sup>15</sup>, la cifra de sincrónicos es superior a la descrita por otros autores, con la particularidad añadida de que en nuestra serie eran todos simultáneos, añadiendo otro sesgo que debe ser tenido en cuenta<sup>16,17</sup>.

Los datos de **supervivencia** confirman que el pronóstico de los STP es mejor que el de las RT (Figura 39), como ha sido visto por otros autores y por nuestro grupo en series más amplias<sup>13,36,103</sup>. No obstante, las cifras de supervivencia a los 5 años del diagnóstico de la progresión tumoral (STP o RT) son inferiores a las descritas en otros estudios<sup>22,44,91,92,108</sup>. Además, los STP sincrónicos, localizados fuera del área de cabeza y cuello y las RT de PT faríngeos tienen para nosotros peor supervivencia, tal y como se ha puesto de manifiesto en estudios previos<sup>13,14,15,20,22,36,37,50,81</sup>.

En la **interpretación** global de los aspectos clínicos e histopatológicos podemos concluir diciendo que la muestra estudiada, aunque muy restringida y con sesgos importantes, tiene características muy coincidentes con muestras más amplias de STP y RT, como la presentada por nuestro propio grupo, que incluye la estudiada, por lo que consideramos que es representativa y adecuada para el estudio.

## 9.2. Datos génicos

Para conducir esta parte de la discusión es preciso apoyarse en los resúmenes presentados al final de cada bloque de resultados. A continuación se expone lo recogido hasta la fecha en la literatura para seguir con una interpretación final.

El comentario bibliográfico se realizará en conjunto pues en las referencias consultadas para el CECC no hay una separación definida entre PT, RT y STP. Se irán citando, por orden de frecuencia, los genes alterados, sintetizando su función biológica en los distintos apartados de la discusión, pero evitando su repetición una vez hayan sido comentados.

### 9.2.1 Aspectos descriptivos

El estudio génico se realizó en los PT (N= 36), STP (N= 21) y RT (N= 15).

El número de alteraciones génicas por caso en los PT fue similar al de los STP, pero inferior al de las RT, sobre todo por el mayor número de ganancias en estas últimas. Los PT que posteriormente progresaron a RT también presentaban un número mayor de alteraciones que los PT de los STP (Tabla XIII). Este número de alteraciones es similar al de otros trabajos previos presentados por nosotros, aunque habría que tener en cuenta el número de sondas empleadas al final de los experimentos.

Podemos **interpretar** estos datos considerando que al ser las RT la forma más agresiva y evolucionada de los CECC desarrollan mayor número de alteraciones génicas. Sin embargo, esa característica ya se observa en los PT que las originaron, quizás por presentar en su mayor parte estadios avanzados.

Las alteraciones génicas más frecuentes fueron para los PT las pérdidas en *CDKN2A* (9p21)(47%) y *A1651963* (10p14)(36%), las ganancias en *BCL2L1* (20q11.1)(47%), *CCND1* (11q13)(42%), *EMS1* (11q13)(42%) y las amplificaciones en estos dos últimos genes (Tabla XIV, figuras 18, 19 y 20).

En los STP las pérdidas en *CDKN2A* (9p21)(67%) y *TP53* (exones 9 y 11) (17p13.1)(29%), las ganancias en *BCL2L1* (20q11.1)(38%), *CCND1* (11q13)(43%), *EMS1* (11q13)(43%) y las amplificaciones en estos dos últimos genes (Tabla XV, figuras 21, 22 y 23).

Por último, en las RT las pérdidas en *IL18* (11q23.1)(47%), *A1651963* (10p14)(40%), *CASP6* (4q25)(33%), *RENT2* (10p14)(33%), las ganancias en *LMNA* (1q21.2)(73%), *BCL2L1* (20q11.1)(60%), *EMS1* (11q13)(60%), *CCND1* (11q13)(53%) y las amplificaciones en estos dos últimos genes (Tabla XVI, figuras 24, 25 y 26).

A continuación se hace un breve comentario de los principales genes alterados por orden de frecuencia en los respectivos grupos.

*CDKN2A* es un gen descrito reiteradamente como cambio precoz en el CECC<sup>117,127,128, 151</sup>. Codifica la proteína *p16* que inhibe las *CDK*, punto crítico en el desarrollo y progresión del CECC<sup>166,167,168</sup>. La delección e inactivación del gen por hipermetilación de su región promotora es el mecanismo por el que actúa como supresor en las fases iniciales de la carcinogénesis<sup>166,169,170,171,172,173,174,175,176,177</sup>. Se ha visto también relación de la pérdida de *CDKN2A* con

el desarrollo de los campos de expansión (Apartado 3.1)<sup>122</sup> y con las lesiones preinvasivas<sup>157</sup>. Se ha descrito que la pérdida de *CDKN2A* se asocia más a pacientes mayores de 40 años que desarrollan un CECC<sup>169</sup>. Su delección también se observa en tumores agresivos con metástasis ganglionares<sup>170</sup>. En el cáncer laríngeo de alto grado es frecuente observar la inactivación del gen, bien por delección o por metilación<sup>174</sup>.

Para nosotros esta pérdida es constante en los PT y STP, aunque reduce su expresión en las RT. Es por tanto una marca genética del CECC cuando se desarrolla de novo.

**A1651963** no es un verdadero gen. Se trata de un fragmento de ADN humano que hibrida en la región 10p14, exactamente en la posición 10900000 PB. En esta región no ha sido descrito hasta la fecha ningún gen y por tanto no hay información respecto al CECC.

Nosotros encontramos pérdidas importantes en PT y RT. Esta sonda podría darnos información sobre un posible gen candidato, aún desconocido, implicado en los CECC<sup>178</sup>.

**BCL2L1** codifica una proteína de la familia *BCL2* que actúa como complejo receptor de señales y está relacionada con el proceso de apoptosis.

Su mayor implicación se da en el cáncer colorrectal en relación al grado histopatológico, estadio, metástasis ganglionares y comportamiento biológico del tumor<sup>179</sup>. La sobreexpresión del gen se asocia a la pérdida de la apoptosis, siendo las células tumorales más resistentes y agresivas.

En el CECC la sobreexpresión del gen se asocia con estadios avanzados y peor pronóstico<sup>180</sup>.

Nosotros observamos que la ganancia de este gen es una de las alteraciones genéticas más frecuentes en los PT y STP. Sin embargo, no hemos constatado su relación con la supervivencia.

**TP53** es un gen supresor de tumores que codifica la proteína *p53*. Esta proteína al unirse al ADN activa su transcripción y oligomerización. Además, regula la apoptosis, el envejecimiento y la reparación del ADN e interrumpe el ciclo celular y su metabolismo al activar genes inhibidores del crecimiento

e invasión<sup>181,182,183,184,185,186,187,188,189</sup>. La pérdida o inactivación del gen ocurre en el 50% de los CECC, asociando su expresión proteica con la progresión de lesiones preinvasivas a cáncer en los campos de expansión tumoral<sup>122,157</sup>. Además, en el CECC, la expresión proteica se relaciona con el mayor grado de diferenciación histológica, la extensión tumoral (T) y el estadio TNM, al igual que con peor pronóstico en otros tumores<sup>181</sup>.

Nuestro grupo, en estudios previos, ha demostrado en el cáncer de laringe la pérdida de *TP53* asociada a metástasis linfáticas y a fases tardías de la progresión tumoral<sup>183</sup>, aunque en nuestro estudio la pérdida de *TP53* fue más frecuente en los PT donde predominaban los tumores N0.

Nosotros observamos frecuentemente la pérdida de *TP53* en los PT y en los STP, por lo que junto a *CDKN2A* podría interpretarse como un evento precoz en el desarrollo del tumor, que posteriormente pasa a segundo plano por el desarrollo y acúmulo de otras alteraciones.

*RBI* y *CDH2* son genes cuyas pérdidas ocurren de forma tardía y podrían establecer la diferencia entre campo de expansión y tumor<sup>117</sup>.

En nuestro trabajo observamos la pérdida de *RBI* y *CDH2* en más del 20% en los PT y en las RT, mientras que los STP tenían porcentajes muy bajos de esta alteración, sugiriendo una posible diferencia para los tumores que surgen de un campo de expansión.

*MFHAS1* es un gen que se asocia con tumores de alto grado y pobre diferenciación<sup>145</sup>.

En nuestro estudio la pérdida de *MFHAS1* ocurría en el 26% de las RT, que serían la forma más agresiva de progresión tumoral.

*CCND1* y *EMS1* son genes con amplificaciones demostradas en el 40-60% de los CECC<sup>130,131</sup>. Aunque en la región 11q13 se han visto pérdidas y ganancias en fases iniciales, sobre todo en laringe y cavidad oral<sup>141,145</sup>, la mayoría de los estudios describen su amplificación como un evento tardío en la carcinogénesis<sup>130,131</sup>.

Nosotros hemos encontrado la amplificación de estos dos genes en todos los grupos estudiados (PT, STP y RT), (23%-40%), aunque el mayor número de amplificaciones observadas corresponde a las RT (40%).

El gen *CCND1* (ciclina D1) interviene en la selección del clon maligno dentro del campo de cancerización<sup>123</sup> y es una alteración tardía que se asocia a mal pronóstico<sup>130,131</sup>. La amplificación del protooncogen *CCND1* se ha visto asociada a mayor incidencia de STP metacrónicos<sup>135</sup>. Otros estudios han confirmado que la amplificación de *CCND1* puede ocurrir de manera independiente a la de *EMSI*<sup>190,191</sup>.

El gen *EMSI* tiene diversas funciones, por un lado regula las interacciones entre los componentes de las uniones «tipo adherens» y por otro organiza el citoesqueleto y las estructuras de adhesión entre el epitelio y las células tumorales. La proteína codificada por este gen es degradada durante la apoptosis de forma caspasa dependiente. Al sobreexpresar la proteína se altera la regulación que ejerce, contribuyendo a la invasión tumoral y a las metástasis. Se ha visto que las amplificaciones de *EMSI* en el CECC se asocian con el tamaño tumoral, las metástasis ganglionares, el menor grado de diferenciación y el estadio TNM avanzado<sup>192,193</sup>.

En estudios previos realizados por nuestro grupo se habían descrito en el CECC las ganancias y amplificaciones de *CCND1* y *EMSI* y la pérdida de *CDKN2A*, como nosotros ratificamos en el presente estudio<sup>183</sup>. Sin embargo, en aquellos trabajos no se evidenció la pérdida de *A1651963* ni la ganancia en *BCL2L1*, que sí han sido demostradas en el grupo de PT y a las que ya hemos y haremos referencia.

En la **interpretación** global de los aspectos descriptivos del estudio génico podemos decir que los cambios más frecuentemente observados (pérdidas en *CDKN2A*, *MLH1*, *TP53*, ganancias y amplificaciones en *BCL2L1*, *CCND1* y *EMSI*) definen la «huella génica» en los grupos de tumores primarios (PT, STP) dentro del CECC. Así, se diferencian de las RT, fases más avanzadas de progresión tumoral, en que aunque éstas siguen presentando dichas alteraciones, exhiben otras más frecuentes (pérdida *IL18*, ganancias y amplificaciones en *LMNA*). La «huella génica» se mantiene en los tres grupos, de forma constante y estable, representada por las amplificaciones en *CCND1* y *EMSI*. Se insinúa así un mecanismo de alteración acumulativo en donde los cambios génicos nuevos van desplazando a los previos según progresa la neoplasia.



Hay que considerar que se habían descrito ganancias en las regiones 3q, 5p, 7p, 7q y 18p relacionadas con las displasias de alto grado y los CECC<sup>142,144,145,149</sup>. Sin embargo, el kit «SALSA P084 HNSCC-1», empleado en nuestro estudio, no dispone de sondas para esas localizaciones y los genes de esas regiones no han sido estudiados.

### 9.2.2 Relación PT y STP

Las alteraciones génicas más significativas que diferencian los PT y los STP son las pérdidas en *IL2* (4q26), *A1651963* (10p14), *IL18* (11q23.1), *BRCA2* (13q12.3), *DLEU1* (13q14.3), *CDH2* (18q11.2) (Tabla xvii, figura 27) y la ganancia en *CDKN2D* (19p13) (Tabla xvii, figura 28).

*IL2* codifica una citocina implicada en la respuesta inmune que además interviene en el crecimiento, diferenciación y regulación de la muerte celular. No se ha descrito la expresión de *IL2* en los CECC, pero la progresión de otros tumores se asociaría a su ganancia y no a su pérdida como nosotros hemos evidenciado<sup>194</sup>.

*IL18* codifica también una citocina que induce la secreción de interferón gamma e interviene en la inmunidad antitumoral<sup>195</sup>.

Durante la carcinogénesis oral se ha visto expresión baja del gen en relación con la angiogénesis, demostrando que la alta producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y la baja de *IL18* por los polimorfonucleares promueve la neoangiogénesis. Así, sería un factor importante en la adquisición de potencial metastásico por las células tumorales en las fases iniciales de la neoplasia<sup>195</sup>. Si embargo, otros autores no han podido demostrar que su baja expresión contribuya a la oncogénesis oral<sup>196</sup>. Por último, en relación al problema de los «campos de cancerización» se ha descrito la relación entre la pérdida de la región cromosómica 11q23 y las posibles recidivas<sup>152</sup>.

En nuestro estudio la pérdida de *IL18* está en relación con lo descrito en la progresión del cáncer en la cavidad oral<sup>195</sup>.

*BRCA2* es un gen implicado en la reparación y transcripción del ADN, la regulación del ciclo celular, centrosoma y citoquinesis y el mantenimiento de la estabilidad genómica<sup>197</sup>. Aunque su alteración no ha sido descrita en

el CECC, las pérdidas cromosómicas de 13q se han señalado como eventos tardíos en la carcinogénesis de los CECC y serían útiles para distinguir entre campo y tumor<sup>117</sup>.

Nuestros resultados establecen una diferencia significativa para su pérdida entre los PT y los STP, pero su escasa frecuencia en los primeros (<20%) hace que seamos cautos en establecer conclusiones. Una posible interpretación entre lo observado por nosotros y lo citado en la bibliografía sería que la pérdida de *BRCA2* se relacione con otro gen próximo aún no descrito.

*DLEU1* no tiene definida su función molecular, pero podría estar implicado en el crecimiento celular. No hay estudios que relacionen su alteración con el CECC.

La explicación de su pérdida podría deberse a la proximidad de otro gen no conocido pues, como ya se ha indicado, las pérdidas cromosómicas de 13q sí han sido descritas en la carcinogénesis tardía<sup>117</sup>.

*CDH2* interviene en la síntesis de las moléculas transmembrana denominadas cadherinas que contribuyen a la morfogénesis tisular y al fenotipo epitelioide. Se describe su aumento de expresión en la progresión tumoral y en la dediferenciación<sup>198,199</sup>. Se ha demostrado que la pérdida de 18q está implicada en el proceso tardío de la carcinogénesis en el CECC<sup>117</sup>.

Este dato sería coincidente con nuestros resultados donde se demuestra de forma significativa la pérdida de dicho gen, aunque no podamos explicar por qué su pérdida es más frecuente en los PT que en los STP.

*CDKN2D* codifica la ciclina D2, enzima del complejo *CDK* que regula el ciclo celular. Su funcionamiento deficiente se relacionaría con su pérdida<sup>200</sup> y no con su ganancia como nosotros hemos observado.

### 9.2.3 Relación PT y RT

Las alteraciones génicas que diferencian los PT y las RT son las pérdidas en *IGSF4* (11q23) y *TP53* (exones 10 y 11) (17p13.1), más frecuentes en los PT (Tabla XVIII, figura 30) y las ganancias en *LMNA* (1q21.2) y *PTPNI* (20q13.1), más frecuentes en las RT (Tabla XVIII y figura 31).

*IGSF4* es un gen que codifica una molécula de adhesión implicada en la comunicación celular, concretamente en la transducción de señales. Se ha detectado su pérdida en carcinomas de nasofaringe<sup>201</sup>, en relación a la aparición de metástasis ganglionares, siendo su falta de expresión debida a fenómenos de metilación.

Nosotros hemos encontrado que la pérdida de *IGSF4* es una de las alteraciones génicas que diferencian los PT de las RT.

*TP53* (exones 10 y 11). La función de este gen ya ha sido descrita en el apartado 9.2.1 por lo que se evitarán repeticiones.

Nuestro grupo en estudios previos ha demostrado la pérdida de *TP53* asociada a metástasis linfáticas y a fases tardías de la progresión tumoral<sup>183</sup>, aunque en el presente estudio la pérdida de *TP53* fue más frecuente en los PT, donde predominaban los tumores N0.

Al ser las pérdidas en *TP53* más frecuentes en los PT pueden contribuir a diferenciar los PT de las RT, siendo este dato coincidente con lo descrito por otros autores<sup>181</sup>.

*LMNA* es un gen que codifica una proteína estructural relacionada con el crecimiento y sostén celular. No se ha descrito su implicación en el CECC.

En nuestro estudio se ha visto que las ganancias de *LMNA* son más frecuentes en las RT.

*PTPNI* es un gen que codifica una proteína de la familia tirosin fosfatasa. Estas proteínas son moléculas de señalización que regulan los procesos de crecimiento celular, diferenciación, ciclo mitótico y transformación oncogénica<sup>202</sup>. Hasta el momento no se ha visto su implicación en el CECC.

Nosotros hemos evidenciado ganancias de este gen en las RT, dato coincidente con lo descrito respecto a la relación de su incremento con la agresividad tumoral.

#### 9.2.4 Relación STP y RT

Las alteraciones génicas que diferencian los STP y las RT son las pérdidas en *TP53* (exón 11)(17p13.1), *CDKN2A* (9p21), más frecuentes en los STP, y las

pérdidas en *AIG5I963* (10p14), *RENT2* (10p14), *IL18* (11q23.1), más frecuentes en las RT (Tabla XIX, figura 33). Las ganancias en *LMNA* (1q21.2), *CTSB* (8p22) y *PTPNI* (20q13.1) son más frecuentes en las RT, mientras que *N33* (8p22) lo es más en los STP (Tabla XIX, figura 34).

*TP53* (exón 11) ya ha sido ampliamente citado en los apartados 9.2.1 y 9.2.3. Aparece de nuevo como una de las alteraciones génicas que diferencian STP de RT, aunque es más frecuente en los STP. Su pérdida es concordante con lo descrito en la literatura<sup>181</sup> y, tal y como vimos al discutir los aspectos descriptivos, su inactivación juega un papel importante en el carcinogénesis<sup>173</sup>. Además, se ha visto que las mutaciones de *TP53* en los márgenes quirúrgicos de los CECC incrementan el riesgo de RT locorregionales, MD y STP<sup>187</sup>.

Nuestro grupo en estudios previos relacionó la pérdida de *TP53* con el desarrollo de metástasis ganglionares<sup>183</sup>. Es posible que la pérdida evidenciada en nuestro estudio sea el resultado del elevado número de pacientes con STP de tipo pN+.

*CDKN2A*. La función e implicaciones de este gen han sido ampliamente descritas en el apartado 9.2.1. En nuestro estudio la pérdida de *CDKN2A* también diferencia los STP, donde es más frecuente, de las RT.

*RENT2*. Este gen codifica una proteína que controla el transporte y la estabilidad del mRNA<sup>203</sup>. No se ha descrito su implicación en el CECC, pero en nuestro estudio se ha perfilado como una de las alteraciones génicas que diferencian los STP y las RT, siendo más frecuente en las últimas.

*IL18* ya ha sido ampliamente comentado en el apartado 9.2.2. Como ya hemos indicado se ha descrito su baja expresión en la carcinogénesis oral<sup>195</sup>.

Nosotros observamos la pérdida de *IL18* en las RT respecto a los STP, quizás por el mayor número de RT originadas en cavidad oral y orofaringe.

*LMNA* ya ha sido descrito en el apartado 9.2.3. En la bibliografía no hay datos que lo impliquen al CECC.

Nosotros encontramos además que las ganancias de *LMNA* permiten distinguir entre RT y STP, siendo más frecuentes en las primeras.

*CTSB* codifica una cistein proteasa que interviene en el metabolismo pro-teico. Es un marcador de la actividad de las glándulas neoplásicas, relacionando su expresión con el proceso de neovascularización y la agresividad tumoral<sup>204,205</sup>.

En nuestro estudio la ganancia de *CTSB* en el grupo de RT coincide con lo recogido en la literatura, pues muchas RT provenían de PT muy agresivos, la mayoría diagnosticados en estadios III y IV.

*PTPNI* ha sido descrito en el apartado 9.2.3. Como ya hemos indicado hasta el momento no hay recogidos datos de su implicación en el CECC.

Nosotros encontramos mayor número de ganancias en las RT. Esta observación coincide con lo descrito por otros autores en relación a la mayor agresividad en otras neoplasias<sup>202</sup>.

*N33* es un candidato a gen supresor. Se han descrito alteraciones del gen en el CECC<sup>183</sup> y en el cáncer de ovario<sup>206</sup>, relacionando ambas localizaciones con peor pronóstico<sup>183,206</sup>. Nuestro grupo ha demostrado en trabajos previos que su pérdida está en relación con la presencia de metástasis ganglionares<sup>183</sup>.

En nuestro estudio, y a diferencia de lo publicado<sup>183</sup>, hemos evidenciado que su ganancia es más acusada en los STP respecto a las RT.

### 9.2.5 Relación entre $PT \rightarrow STP$ y $PT \rightarrow RT$

La única alteración génica que diferencia a los  $PT \rightarrow STP$  de los  $PT \rightarrow RT$  es la pérdida de *CDH2* en estos últimos (Figura 36). Ya hemos descrito las implicaciones funcionales de *CDH2* en el apartado 9.2.2. La pérdida de este gen como ya se ha sugerido en estudios previos podría tener utilidad para distinguir entre campo y tumor<sup>117</sup>.

La **interpretación** global que podemos hacer en el conjunto de las relaciones entre los grupos, respecto a las diferencias observadas en los cambios génicos es la siguiente:

Entre los PT y STP hay 7 alteraciones génicas que diferencian ambos grupos en un total de 36 sondas. Esta diferencia es mayor entre los STP y las RT (9/36) y un pero se reduce entre PT y las RT (4/36).

Entre los PT→STP y PT→RT sólo un gen (*CDH2*) establece la diferencia.

En el resto de cambios génicos observados en las distintas relaciones entre grupos no se observan diferencias significativas.

Por tanto el «perfil génico» entre los grupos es similar, aunque con algunas diferencias mayores entre tumores con diferente origen.

### 9.2.6 Concordancias y discordancias

Para establecer el criterio de concordancia y discordancia nos remitimos al apartado 8.2.3.

9.2.6.1 Entre los PT y STP las alteraciones génicas concordantes son las ganancias en *EMSI* (11q13), *IL18* (11q23.1), *TP53* (exón 10) (17p13.1), *BCL2L1* (20q11.1) y la pérdida en *TP53* (exón 9) (17p13.1) (Tablas xx y xxi). La alteración discordante corresponde a la pérdida en *AI651963* (10p14) (Tabla xxi).

*EMSI* es un gen cuya función ha sido ya comentadas en el apartado 9.2.1.

En nuestro estudio la ganancia de *EMSI* se ha perfilado como una de las alteraciones génicas concordantes entre los PT y los STP. Debemos recordar que su amplificación era una de las alteraciones más frecuentes y constantes en los grupos establecidos. Al analizar estos grupos con concordancia en la ganancia de *EMSI* observamos que, aunque eran mayoría los tumores en estadios iniciales, no era desdeñable el porcentaje de pacientes diagnosticados en estadios avanzados (34% en PT y 44% en STP). En el caso de los STP se detectó un incremento de los tumores moderadamente y poco diferenciados (57%), aunque en relación a las metástasis ganglionares nuestros datos no concuerdan con lo descrito en la literatura<sup>192</sup>.

*IL18*. Ya se ha comentado ampliamente su papel en los apartados 9.2.2 y 9.2.4.

Nosotros observamos su concordancia entre PT y STP, pero no evidenciamos su relación con el pronóstico.

*TP53* (exón 10). La función del gen también ha sido ampliamente comentada en los apartados 9.2.1, 9.2.3 y 9.2.4.

Su ganancia es otra de las alteraciones génicas concordantes entre PT y STP. Debemos considerar que el funcionamiento deficiente del gen está en relación con su pérdida y no con su ganancia, como nosotros hemos detectado para este exón.

La pérdida en *TP53* (exón 9) es también una alteración génica concordante entre PT y STP, estando estos datos de acuerdo con lo descrito en la literatura<sup>181</sup>.

*BCL2L1* es un gen cuya función ya ha sido descrita en el apartado 9.2.1.

En el CECC la sobreexpresión del gen se asocia con estadios avanzados y peor pronóstico<sup>207</sup>.

Nosotros observamos que la ganancia de este gen es una de las alteraciones génicas concordantes entre PT y STP. Sin embargo, no hemos constatado su relación con la supervivencia.

*A1651963*. Su función fue descrita en el apartado 9.2.1.

En nuestro estudio fue la única alteración génica discordante entre PT y STP. Sólo recordar su posible relación con un gen candidato, aún desconocido, en la región 10p14 asociado al CECC<sup>178</sup>.

9.2.6.2 Entre los PT y RT la única alteración génica concordante fue la pérdida en *MLH1* (3p22.1) (Tabla xxiii).

*MLH1* es un gen implicado en la reparación del ADN. Su locus se encuentra frecuentemente mutado en el CECC<sup>174,208,209,210,211</sup> siendo descrita su inactivación por hipermetilación<sup>208,209</sup>. En el cáncer de laringe la pérdida del gen se relaciona con la progresión tumoral y el menor grado de diferenciación<sup>174,207,210</sup>.

Todos estos datos coinciden con lo observado en nuestro estudio donde evidenciamos la pérdida de *MLH1*, predominando en los grupos PT→RT y RT las formas moderadamente y poco diferenciadas.

Un aspecto importante también descrito en la bibliografía es que la pérdida de expresión de las proteínas *MLH1* y/o *MLH2* hace que los pacientes tengan mayor riesgo de desarrollar un STP en el área gastrointestinal<sup>212</sup>.

En nuestro estudio observamos que la pérdida de *MLH1* es frecuente en los STP, aunque sería necesario profundizar con nuevos estudios para confirmar su localización.

### 9.2.6.3 Entre los PT con su correspondiente STP/ RT

En el grupo PT→RT (N=15) y sus correspondientes RT observamos 2 casos (13%, n°: 1 y 6) muy concordantes, 6 intermedios (40%, n°: 2, 4, 10, 12, 13 y 15) y 7 discordantes (47%, n°: 3, 5, 7, 8, 9, 11 y 14), (Tabla xxiv).

En el grupo PT→STP (N=21) y sus correspondientes STP observamos 2 casos (10%, n°: 6 y 11) muy concordantes, 7 intermedios (33%, n°: 3, 4, 7, 9, 13, 14 y 15) y 12 discordantes (57%, n°: 1, 2, 5, 8, 10, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21), (Tabla xxv).

En ambos grupos (PT→STP y PT→RT) predominan las discordancias con sus correspondientes STP y RT, presentando un «perfil génico» distinto al esperado si tenemos en cuenta las definiciones de RT y STP<sup>7,9</sup>. Podemos esperar que esa tendencia a las discordancias sea más acentuada entre las parejas PT→STP y STP (57%), si consideramos que se trata de tumores primarios distintos. Las discordancias entre PT→RT y RT (47%) serían menores al tratarse del mismo tumor. No obstante, entre ambos grupos esa diferencia no es importante. Además, ambos grupos presentan dos casos con patrones muy concordantes, con un porcentaje similar (10% para PT→STP y STP; 13% para PT→RT y RT). Este hecho es más sorprendente en el primer grupo, pues se esperaría un patrón génico diferente, si bien uno de los pacientes tenía dos tumores sincrónicos y simultáneos, localizados en glotis y orofaringe. Es llamativo el gran número de parejas con patrones de concordancia intermedia en los dos grupos (33% para PT→STP y STP; 40% para PT→RT y RT). En el primero, los casos de concordancia intermedia podrían agruparse bajo la denominación de STC; sin embargo, no resulta sencillo explicar el fenómeno en el segundo, si aceptamos previamente el diagnóstico clínico de RT.

No hemos encontrado, desafortunadamente, en la bibliografía trabajos que analicen estos patrones de concordancia/discordancia sobre los que podamos contrastar nuestros resultados.



La interpretación global de todos estos aspectos comentados nos lleva a sugerir que las formas de progresión clínica del CECC (STP, RT) no son adecuadas al tener un sesgo importante en su clasificación. Es posible que la progresión del CECC no pueda ser clasificada y dividida con criterios clínicos y estos deban ser modificados teniendo en cuenta las observaciones genéticas<sup>114,115,117,118,120,121,122</sup>. Por tanto PT, STP y RT serían definiciones artificiales de un único y complejo proceso genético, más propio de la progresión real del CECC.

Con vistas a reflexionar sobre este problema, teniendo en mente una futura ordenación génica de la progresión tumoral en el CECC, se presentan dos ejemplos de nuestra serie, llevados a cabo con MLPA, donde se ponen de manifiesto las posibles discrepancias entre la clasificación clínica y los cambios génicos.

El **primer ejemplo** corresponde al caso nº 11 (Tabla xxv). Se trata de un paciente con un PT de laringe que desarrolló posteriormente un STP en fosa nasal, siendo ambos carcinomas epidermoides. La MLPA muestra un «patrón génico de concordancia» (59%), aunque se trata de STP metacrónicos con localizaciones alejadas (Figura 40). Se descarta una recidiva al ser zonas anatómicas muy separadas, siendo poco probable una metástasis a distancia al tratarse el tumor laríngeo de un pT2N0M0 y estar controlado clínicamente. Este caso es muy problemático, pues aunque clínicamente parece tratarse de un STP, genéticamente no se comporta como tal.

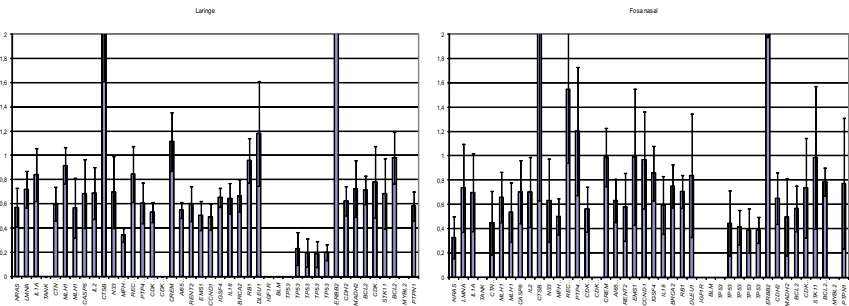


Figura 40. Diagrama de barras de la MLPA para la muestra de laringe y de fosa nasal (caso 11, tabla xxv). Obsérvese el patrón de concordancia.

El **segundo ejemplo** (caso 7, tabla xxiv) es un paciente con un PT (larínge supraglótica) y una RT (recidiva locorregional). Desde el punto de vista clínico era un carcinoma epidermoide supraglótico pT3N2bM0 (estadio IV), que tendría alta probabilidad de desarrollar una RT. Además la localización de la recidiva correspondía al asiento del PT. Sin embargo, el «patrón génico es muy discordante» (81%), sugiriendo más un STP o un STC (Figura 41).

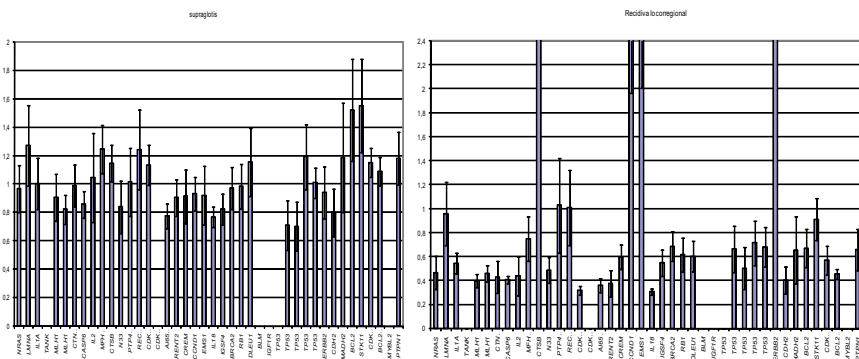


Figura 41. Diagrama de barras de la MLPA para la muestra de supraglótis y de la recidiva (caso 7, tabla xxiv). Obsérvese el patrón de discordancia.

Estos dos ejemplos son extremos, aunque ilustrativos, debido a que la gran mayoría de los catalogados como STP son discordantes e intermedios (90%), mientras que en las RT hay ligera mayoría de concordantes e intermedios (53%).

Hay que considerar como criterio de calidad en nuestro estudio no haber recibido quimio y/o radioterapia, evitando así la posible selección de los cambios génicos que distorsionarían la observación posterior. Además, debemos tener en cuenta la limitación de la propia técnica de medida, ya que la MLPA («SALSA P084») estudia un número restringido de sondas, más genes supresores que oncogenes, dejando sin explorar regiones cromosómicas como 3q, 5p y 18p, descritas en la progresión tumoral del CECC<sup>213,214</sup>.

### 9.2.7 Relación de las alteraciones génicas de los PT con la supervivencia.

Se han encontrado un buen número de alteraciones génicas relacionadas con la supervivencia. Debemos recordar lo comentado al inicio de la discusión sobre los datos génicos y los aspectos clínico-patológicos, en particular lo concerniente a la supervivencia. Aunque las pruebas estadísticas confirmen la significación de los datos, debemos ser prudentes al trasladar estos resultados a la clínica, al ser una muestra muy reducida, sesgada por los estrictos criterios de inclusión además las alteraciones génicas implicadas son poco frecuentes (Tabla XIV).

9.2.7.1 En el total de los PT (N=36) son las pérdidas en *MADH2* (18q21.1) y las ganancias en *IGSF4* (11q23), *TP53* (exón 9) (17p13.1) las que tienen relación con la supervivencia (Tabla XXVI).

*MADH2* codifica una proteína transductora de señal y modula la transcripción, mediando en múltiples vías de señales («*signaling pathways*»). Esta proteína regula la señal del factor de transformación beta e interviene en los procesos celulares de proliferación, diferenciación y apoptosis. En el CECC se han realizado algunos estudios donde se observa que la mayor expresión de la proteína codificada por *MADH2* está en relación con mejor pronóstico y supervivencia<sup>215,216</sup>.

Nosotros observamos que la pérdida de *MADH2* es una alteración génica relacionada con peor supervivencia en los PT, hecho que no concuerda con lo observado por otros autores (Tabla XXVI)<sup>215</sup>.

*IGSF4* es un gen ya descrito en el apartado 9.2.3. Su pérdida se asocia a peor supervivencia en el carcinoma de nasofaringe<sup>201</sup>.

No obstante, nuestros resultados muestran que los pacientes con ganancia de *IGSF4* tienen peor supervivencia, hecho que podría estar en relación con una sobreexpresión ectópica, como se ha visto en algunas leucemias (Tabla XXVI)<sup>217</sup>.

*TP53* (exón 9) es un gen ampliamente descrito en los apartados 9.2.1, 9.2.3, 9.2.4 y 9.2.6, concretando ese exón en el 9.2.6.1. En general, la mayoría de los autores hablan de su pérdida al comportarse como gen supresor

en el CECC, aunque otros describen su expresión asociada a peor pronóstico en otros tumores<sup>181</sup>.

Nosotros observamos que su ganancia está en relación a la supervivencia (Tabla xxvi).

En nuestro estudio no hemos observado relación entre la supervivencia y la pérdida del gen *N33*, aunque esto sí fue demostrado por nuestro grupo en un estudio previo de CECC<sup>183</sup>.

9.2.7.2 En los PT→STP (N=21) son la ganancia en *CDKN2A* y la amplificación de *PTPNI* las que se relacionan con la supervivencia (Tabla xxvi).

*CDKN2A* ha sido ampliamente comentado en los apartados 9.2.1 y 9.2.4. Como ya hemos indicado en la mayoría de los trabajos revisados el gen está en pérdida. Su ganancia no es una alteración génica habitual y se ha visto implicada sólo en lesiones preinvasivas de cabeza y cuello<sup>176,177</sup>.

Al contrario de lo que se presenta en la literatura donde su pérdida es un evento precoz de la carcinogénesis<sup>170,171</sup>, en nuestro estudio la ganancia génica se asocia a menor supervivencia (Tabla xxvi).

*PTPNI* también ha sido descrito en los apartado 9.2.3 y 9.2.4. Su amplificación ha sido relacionada por otros autores con la agresividad tumoral y supervivencia<sup>202</sup>, como nosotros también hemos constatado (Tabla xxvi).

9.2.7.3 En los PT→RT (N=15) son las pérdidas en *LMNA* (1q21.2), *PTP4A* (8q24.3), *RECQL4* (8q24.3) y la ganancia en *TP53* (exón 9, 10 y 11) (17p13.1) las que se relacionan con la supervivencia (Tabla xxvi).

*LMNA* ya ha sido descrito en el apartado 9.2.3. No hemos encontrado referencias que lo impliquen con la supervivencia del CECC.

Nuestro estudio sí relaciona la pérdida de *LMNA* con peor supervivencia en las RT (Tabla xxvi).

*PTP4A3* es un gen que codifica una tirosin fosfatasa relacionada con la motilidad y proliferación celular<sup>218,219</sup>. Su ganancia ha sido ampliamente descrita en los CECC<sup>142</sup>. En estudios previos de nuestro grupo se encontraron amplias ganancias en *PTP4A3* (40-50%)<sup>183</sup>. En relación a la supervivencia se constata

que la sobreexpresión de esta proteína se asocia a mal pronóstico<sup>217,218</sup> excepto en cáncer de pulmón donde la regulación negativa del gen condiciona la aparición de metástasis<sup>220</sup>.

En nuestro estudio las ganancias fueron escasas, salvo para RT (27%). Observamos que la pérdida de *PTP4A3* se relaciona con peor supervivencia (Tabla xxvi).

*RECQL4* codifica una proteína relacionada con los procesos de reparación del ADN. No hay estudios que asocien su pérdida a peor supervivencia como nosotros hemos observado (Tabla xxvi).

*TP53* (exón 9, 10 y 11) es un gen ampliamente descrito en los apartados 9.2.1, 9.2.3, 9.2.4, 9.2.6.1 y 9.2.7.1.

Nosotros observamos en este grupo que su ganancia está también en relación con la supervivencia (Tabla xxvi).

La **interpretación** global que podemos hacer del estudio de supervivencia es que las RT tienen un pronóstico mucho peor que el de los STP. Por ese motivo, mejorar la clasificación clínica por medio de estudios génicos podría ayudar a definir mejor el pronóstico individual.

Debido al escaso número de alteraciones en una muestra muy reducida es preciso incrementar la serie de pacientes con el fin de que las alteraciones génicas con significación estadística puedan tener utilidad clínica.





## 10. Conclusiones





1. Los pacientes estudiados tenían características clínico-patológicas similares a las de los CECC, siendo los grupos clínicos (PT, STP y RT) representativos. La supervivencia fue mayor en los STP (67%) respecto a las RT (20%).
2. La «huella génica» común en los tres grupos está definida por ganancias/ amplificaciones en *CCND1* y *EMS1*. En los tumores primarios (PT, STP) se añaden las pérdidas en *CDKN2A*, *A1651963*, *TP53* y la ganancia en *BCL2L1*. En las RT, a los anteriores cambios, se acumulan las pérdidas en *IL18*, *CASP6*, *RENT2* y la ganancia en *LMNA*.
3. El «perfil génico» de los tres grupos es similar con algunas diferencias, mayores entre tumores con diferente origen:
  - Entre los PT y STP hay 7 cambios génicos que los diferencian en un total de 36 sondas, entre STP y RT 9 y entre PT y RT se reducen a 4.
  - Entre los PT→STP y PT→RT sólo difiere la pérdida de *CDH2* en los últimos.
  - El resto de los cambios génicos no muestra diferencias significativas.
4. Los patrones de concordancia/discordancia génica no apoyan, en nuestros casos, la diferencia clínica establecida entre STP y RT:
  - Entre PT y STP hay 5 alteraciones concordantes y sólo una discordante.
  - Entre PT y RT sólo hay una alteración génica concordante.

- Entre cada PT con su correspondiente STP y RT predominan las discordancias, ligeramente superiores en los STP (57%) respecto a las RT (47%); aunque también hay concordancias, ligeramente superiores en las RT (13%) respecto a los STP (10%).
5. Un amplio número de cambios génicos se relacionan con la supervivencia, pero es preciso incrementar el número de pacientes para confirmar estas tendencias.





## 11. Perspectivas futuras



Como ya se indicó en las bases previas, al comienzo de este trabajo, esta tesis doctoral es el producto de una línea de investigación iniciada por nuestro grupo, hace años, en el CECC. Sin embargo, esta línea no termina aquí, siendo este trabajo una etapa más que ha sido cubierta. El hecho de que la supervivencia del CECC no se haya modificado, pese a los avances realizados en su diagnóstico y tratamiento, supone un reto continuo para la búsqueda de nuevas estrategias. Debemos considerar que una de las claves del problema es el diagnóstico tardío, ya que la mayoría de estos tumores están en estadios avanzados y los tratamientos son poco eficaces.

En este trabajo se han descrito buen número de alteraciones génicas que definen un complejo mapa en el CECC, alguna de ellas no conocidas. Es llamativo el elevado número de cambios en los PT y STP, incluso en sus estadios iniciales, que se incrementan aún más en las RT. Esto nos identifica el patrón acumulativo de alteraciones que rige el desarrollo de estos tumores. Una vía de estudio muy prometedora, recientemente iniciada en nuestro grupo, es la que comprende a las lesiones preinvasivas, y a los sujetos sanos expuestos al tabaco. Así, será posible identificar los cambios génicos iniciales y establecer el diagnóstico precoz.

Otra vía de estudio derivada de la investigación es la relacionada con el campo de cancerización, pues es difícil determinar, por los procedimientos habituales, su extensión exacta. Definir las alteraciones génicas que acontecen en el campo de cancerización y su relación con los bordes de resección quirúrgica, proyectan una evidente utilidad clínica al ajustar los procedimientos terapéuticos y prevenir la progresión tumoral. En este sentido ha sido aprobada recientemente la financiación de un proyecto por el FIS.



La técnica de MLPA empleada en nuestra investigación tiene la ventaja de realizar un estudio génico de calidad, consumiendo poca cantidad de muestra tisular. Sin embargo, al utilizarla como «screening» sólo permite estudiar un número limitado de genes, la mayoría supresores. Esto supone un vacío de información en regiones cromosómicas relevantes (3q, 5p y 18p), que han sido demostradas por CGH en estudios previos de nuestro grupo<sup>272</sup>. Se podría obtener un mayor rendimiento de la MLPA si fuese posible diseñar mezclas de sondas «a la carta» que estudiaran esas regiones.

Un paso más en relación a la MLPA, que podría aportar indudables ventajas, sería dirigir el estudio a determinados genes hipermetilados propios del CECC, por medio de una modificación de la técnica denominada ms-MLPA.

Podrían realizarse estudios de «screening» más completos por medio de microarray-CGH y de expresión, aunque teniendo en cuenta la limitación de la muestra tisular.

Por último, otro aspecto pendiente en este trabajo sería ampliar la casuística de pacientes para confirmar y validar las tendencias que apuntaban algunas alteraciones génicas respecto a la supervivencia.

Todo este abanico de posibilidades que se abre permitirá conocer mejor el mecanismo de progresión del cáncer en sus primeras fases. Confiamos así que en el futuro el diagnóstico génico precoz pueda contribuir a mejorar la supervivencia de nuestros pacientes.





## 12. Bibliografía



- 1 Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol.* 2004; 31: 726-33.
- 2 Sikora AG, Toniolo P, DeLacure MD. The changing demographics of head and neck squamous cell carcinoma in the United States. *Laryngoscope.* 2004;114:1915-23.
- 3 Hoffman HT, Porter K, Karnell LH, Cooper JS, Weber RS, Langer CJ, Ang KK, Gay G, Stewart A, Robinson RA. Laryngeal cancer in the United States: changes in demographics, patterns of care, and survival. *Laryngoscope.* 2006; 116 (9 Pt 2 Suppl 111): 1-13.
- 4 Quer M, León X, Orús C, Recher K, Gras JR. Análisis de 2500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2001; 52: 201-5.
- 5 Yamamoto E, Shibuya H, Yoshimura R, Miura M. Site specific dependency of second primary cancer in early stage head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2002; 94: 2007-14.
- 6 Franchin G, Minatel E, Gobitti C, Talamini R, Vaccher E, Sartor G, Politi D, Trovo MG, Barzan L. Radiotherapy for patients with early-stage glottic carcinoma: univariate and multivariate analyses in a group of consecutive, unselected patients. *Cancer.* 2003; 98: 765-72.

- 7 Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck*. 2002; 24: 198-206.
- 8 Wong LY, Wei WI, Lam LK, Yuen AP. Salvage of recurrent head and neck squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Head Neck*. 2003; 25: 953-9.
- 9 Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumours: a survey of literature and statistical study. *Am J Cancer*. 1932; 16: 1358-414.
- 10 Sturgis EM, Miller RH. Second primary malignancies in the head in a cancer patient. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995; 104: 946-54.
- 11 Dolan R, Vaughan C, Fuleihan N. Metachronous cancer: prognostic factors including prior irradiation. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998; 119: 619-23.
- 12 Ecimovic P, Pompe-Kirn V. Second primary cancers in laryngeal cancer patients in Slovenia, 1961- 1996. *Eur J Cancer*. 2002; 38: 1254-60.
- 13 Álvarez Marcos CA, Llorente Pendás JL, Franco Gutiérrez V, Hermsen MA, Cuesta Albalad MP, Fernández Espina H, Suárez Nieto C. Segundos primarios en el cáncer escamoso de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006; 57:462-6.
- 14 Di Martino E, Sellhaus B, Hausmann R, Minkenbergr R, Lohmann M, Esthofen MW. Survival in second primary malignancies of patient with head and neck cancer. *J Laryngol Otol*. 2002; 116: 831-39.
- 15 Dooghe IJ, De Vos M, Van Cauwenberge PB. Multiple primary tumors in patient with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. *Laryngoscope*. 1998, 108: 250-256.

- 16 Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1995; 75: 1343-1353.
- 17 Leon X, Quer M, Díez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck*. 1999; 21: 204-210.
- 18 Brenner B, Marshak G, Sulkes A, Rakowsky E. Prognosis of patients with recurrent laryngeal carcinoma. *Head Neck*. 2001;23: 531-5.
- 19 Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Supraglottic carcinoma: patterns of failure and salvage treatment after curatively intended radiotherapy in 410 consecutive patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002; 53: 948-58.
- 20 Álvarez Marcos CA, Llorente Pendás JL, Franco Gutiérrez V, Fernández Espina H, Alonso Guervós M, Suárez Nieto C, Hermsen M. Recidivas en el cáncer escamoso de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58: 156-63.
- 21 Bongers V, Braakhuis BJ, Tobi H, Lubsen H, Snow GB. The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996; 5: 595-8.
- 22 Leon X, Ferlito A, Myer CM, Saffiotti U, Shaha AR, Bradley PJ, Brandwein MS, Anniko M, Elluru RG, Rinaldo A. Second primary tumors in head and neck patients. *Acta Otolaryngol*. 2002;122:765-78.
- 23 Day GL, Blot WJ, Shore RE, McLaughlin JK, Austin DF, Greenberg RS, Liff JM, Preston-Martin S, Sarkar S, Schoenberg JB, Fraumeni JF Jr. Second cancers following oral and pharyngeal cancers: role of tobacco and alcohol. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 131-137.



24 Schottenfeld D, Gantt RC, Wynder EL. The role of alcohol and tobacco in multiple primary cancers of the upper digestive system, larynx and lung: a prprospective study. *Prev Med.* 1974; 3: 277-293.

25 Garces YI, Schroeder DR, Nirelli LM, Croghan GA, Croghan IT, Foote RL, Hurt RD. Second primary tumors following tobacco dependence treatments among head and neck cancer patients. *Am J Clin Oncol.* 2007; 30: 531-9.

26 Do KA, Johnson MM, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, Khuri FR, Spitz MR. Longitudinal study of smoking patterns in relation to the development of smoking- related secondary primary tumors in patients with upper aerodigestive tract malignances. *Cancer.* 2004; 101: 2837-42.

27 Dikshit RP, Boffetta P, Bouchardy C, Merletti F, Crosignani P, Cuchi T, Ardanaz E, Brennan P. Risk factors for the development of second primary tumors among men after laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2005;10: 2326-33.

28 Farshadpour F, Hordijk GJ, Koole R, Slootweg PJ. Non-smoking and non-drinking patients with head and neck squamous cell carcinoma: a distinct population. *Oral Dis.* 2007; 13: 239-43.

29 Wiseman SM, Swede H, Stoler DL, Anderson GR, Rigual NR, Hicks WL Jr, Douglas WG, Tan D, Loree TR. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers and nondrinkers: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcomes. *Ann Surg Oncol.* 2003; 10: 551-7.

30 Spitz MR, Hoque A, Trizna Z, Schantz SP, Amos CI, King TM, Bondy ML, Hong WK, Hsu TC. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst.* 1994; 86: 1681-4.

- 31 Cloos J, Steen I, Joenje H, Ko JY, de Vries N, van der Sterre ML, Nauta JJ, Snow GB, Braakhuis BJ. Association between bleomycin genotoxicity and non-constitutional risk factors for head and neck cancer. *Cancer Lett.* 1993; 74: 161-5.
- 32 Gonzalez MV, Alvarez V, Pello MF, Menendez MJ, Suarez C, Coto E. Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione s-transferase-M1, and cytochromes P450H1E1 and P450H1D6 in the susceptibility to head and neck cancer. *J Clin Pathol.* 1998; 51: 294-8.
- 33 Bongers V, Snow GB, de Vries N, Cattan AR, Hall AG, van der Waal I, Braakhuis BJ. Second primary head and neck squamous cell carcinoma predicted by the glutathione s-transferase expression in healthy tissue in the direct vicinity of the first tumor. *Lab Invest.* 1995; 73: 503-10.
- 34 Matthias C, Harreus U, Strange R. Influential factors on tumor recurrence in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2006; 263: 37-42.
- 35 de Vries N, Drexhage HA, de Waal LP, de Lange G, Snow GB. Human leukocyte antigens and immunoglobulin allotypes in head and neck cancer patients with and without multiple primary tumors. *Cancer.* 1987; 60: 957-61.
- 36 Rennemo E, Zätterström U, Boysen M. Impact of Second Primary Tumors on Survival in Head and Neck Cancer: An Analysis of 2,063 Cases. *Laryngoscope.* 2008; 118: 1350-6.
- 37 Tsou YA, Hua CH, Tseng HC, Lin MH, Tsai MH. Survival study and treatment strategy for second primary malignancies in patients with head and neck squamous cell carcinoma and nasopharyngeal carcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2007; 127: 651-7.
- 38 Mc Guirt WF, Ray M. Second laryngeal cancers in previously treated larynges. *Laryngoscope.* 1999; 109: 1406-8.

- 39 Rusthoven K, Chen C, Raben D, Kavanagh B. Use of external beam radiotherapy is associated with reduced incidence of second primary head and neck cancer: a SEER database analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 71: 192-8.
- 40 Bockmuhl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I. Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res.* 1997; 57: 5213-6.
- 41 Ritoe SC, Verbeek AL, Krabbe PF, Kaanders JH, van den Hoogen FJ, Marres HA. Screening for local and regional cancer recurrence in patients curatively treated for laryngeal cancer: definition of a high-risk group and estimation of the lead time. *Head Neck.* 2007; 29: 431-8.
- 42 Jørgensen K, Godballe C, Hansen O, Bastholt L. Cancer of the larynx-treatment results after primary radiotherapy with salvage surgery in a series of 1005 patients. *Acta Oncol.* 2002; 41: 69-76.
- 43 Liu SA, Wong YK, Lin JC, Poon CK, Tung KC, Tsai WC. Impact of recurrence interval on survival of oral cavity squamous cell carcinoma patients after local relapse. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007; 136: 112-8.
- 44 Agra IM, Carvalho AL, Pontes E, Campos OD, Ulbrich FS, Magrin J, Kowalski LP. Postoperative complications after en bloc salvage surgery for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129: 1317-21
- 45 Schwartz GJ, Mehta RH, Wenig BL, Shaligram C, Portugal LG. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* 2000; 22: 34-41.
- 46 Agra IM, Carvalho AL, Ulbrich FS, de Campos OD, Martins EP, Magrin J, Kowalski LP. Prognostic factors in salvage surgery for recurrent oral and oropharyngeal cancer. *Head Neck.* 2006; 28: 107-13.

47 Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people. A comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001; 37: 401-18.

48 Herranz González-Botas J, Sarandeses García A, Martínez Vidal J, Vázquez Barro C, López Amado M. Segundos tumores primarios en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2000; 51: 149-53.

49 Leon X, Del Prado Venegas M, Orus C, Kolanczak K, Garcia J, Quer M. Metachronous second primary tumours in the aerodigestive tract in patients with early stage head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2005; 262: 905-9.

50 Lin K, Patel SG, Chu PY, Matsuo JM, Singh B, Wong RJ, Kraus DH, Shaha AR, Shah JP, Boyle JO. Second primary malignancy of the aerodigestive tract in patients treated for cancer of the oral cavity and larynx. *Head Neck.* 2005; 27: 1042-8.

51 Shah JP, Cendon RA, Farr HW, Strong EW. Carcinoma of the oral cavity. factors affecting treatment failure at the primary site and neck. *Am J Surg.* 1976; 132: 504-7.

52 Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Glottic carcinoma. Patterns of failure and salvage treatment after curative radiotherapy in 861 consecutive patients. *Radiother Oncol.* 2002 ; 63: 257-67.

53 TNM interactive CD ROM. An illustrated resource for the classification and staging of malignant tumours. Version 1.0. Wiley-Liss, Inc and Med Ascend, Inc. Sobin LH editor; 1998.

54 Fugita M, Rudoltz MS, Canady DJ, Patel P, Machtay M, Pittard MQ, Mohiuddin M, Regine WF. Second malignant neoplasia in patients with T1 cancer treated with radiation. *Laryngoscope.* 1998; 108: 1853-55.

55 Hermans R, Pameijer FA, Mancuso AA, Parsons JT, Mendenhall WM. Laryngeal or hypopharyngeal squamous cell carcinoma: can follow-up CT after definitive radiation therapy be used to detect local failure earlier than clinical examination alone? *Radiology*. 2000; 214: 683-7.

56 Zbären P, Caversaccio M, Thoeny HC, Nuyens M, Curschmann J, Stauffer E. Radionecrosis or tumor recurrence after radiation of laryngeal and hypopharyngeal carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 135: 838-43.

57 Farber LA, Benard F, Machtay M, Smith RJ, Weber RS, Weinstein GS, Chalian AA, Alavi A, Rosenthal DI. Detection of recurrent head and neck squamous cell carcinomas after radiation therapy with 2-18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *Laryngoscope*. 1999; 109: 970-5.

58 Álvarez Pérez RM, Borrego Dorado I, Vázquez Albertino R, Ruiz Franco-Baux J, Ceballo Pedraja JM, Esteban Ortega F. Evaluación de la eficacia y el impacto clínico de la tomografía de emisión de positrones (PET) con 18 F fluoro desoxiglucosa (FDG) en pacientes con sospecha de recurrencia en carcinoma de laringe. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2006; 57: 134-9.

59 Zbären P, Christe A, Caversaccio MD, Stauffer E, Thoeny HC. Pretherapeutic staging of recurrent laryngeal carcinoma: clinical findings and imaging studies compared with histopathology. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 137: 487-91.

60 Pellada A, Grosjean P, Leoni S, Mihaescu A, Monnier P, Pasche P. Abrasive esophageal cytology for oncological follow-up of patients with head and neck cancer. *Laryngoscope*. 1999, 109: 1703-8.

61 Terhaard CH, Bongers V, van Rijk PP, Hordijk GJ. F-18-fluoro-deoxy-glucose positron-emission tomography scanning in detection of local recurrence after radiotherapy for laryngeal/ pharyngeal cancer. *Head Neck*. 2001; 23: 933-41.

62 Brouwer J, Bodar EJ, De Bree R, Langendijk JA, Castelijns JA, Hoekstra OS, Leemans CR. Detecting recurrent laryngeal carcinoma after radiotherapy: room for improvement. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261: 417-22.

63 Zbären P, Nuyens M, Curschmann J, Stauffer E. Histologic characteristics and tumor spread of recurrent glottic carcinoma: analysis on whole-organ sections and comparison with tumor spread of primary glottic carcinomas. *Head Neck.* 2007; 29: 26-32.

64 Ridge JA, Glisson BS, Horwitz EM, Meyers MO. Head and neck tumors. En: Pazdur R, Coia LR, Hoskins WJ, Wagman LD (Eds). *Cancer management. A multidisciplinary approach.* 8<sup>th</sup> edition, New York: Manhasser; 2004.p. 39-86.

65 Vandecaveye V, De Keyzer F, Nuyts S, Deraedt K, Dirix P, Hamaekers P, Vander Poorten V, Delaere P, Hermans R. Detection of head and neck squamous cell carcinoma with diffusion weighted MRI after (chemo) radiotherapy: correlation between radiologic and histopathologic findings. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 67: 960-71.

66 Ritoe SC, Krabbe PF, Kaanders JH, van den Hoogen FJ, Verbeek AL, Marres HA. Value of routine follow-up for patients cured of laryngeal carcinoma. *Cancer.* 2004; 101: 1382-9.

67 Ritoe SC, Bergman H, Krabbe PF, Kaanders JH, van den Hoogen FJ, Verbeek AL, Marres HA. Cancer recurrence after total laryngectomy: treatment options, survival, and complications. *Head Neck.* 2006; 28: 383-8.

68 Sabin SL, Rosenfeld RM, Sundaram K, Har-el G, Lucente FE. The impact of comorbidity and age on survival with laryngeal cancer. *Ear Nose Throat J.* 1999; 78: 578-581.

69 McGuirt WF, Greven K, Williams D, Keyes JW, Watson N, Cappelliari JO, Geisinger KR. PET scanning in head and neck oncology: a review. *Head Neck.* 1998, 20: 208-15.

70 Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, Favrot MC. Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 1179-85.

71 Julieron M, Temam S. Récidives locorégionales des cancers ORL: place de la chirurgie. *Bull Cancer.* 2004; 91: 863-9.

72 Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention? *Oncologist.* 2005; 10: 493-500.

73 Resser JR, Carbone DP. Immunotherapy of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol.* 1998; 10: 226-232.

74 Copper MP, Triesscheijn M, Tan IB, Ruevekamp MC, Stewart FA. Photodynamic therapy in the treatment of multiple primary tumours in the head and neck, located to the oral cavity and oropharynx. *Clin Otolaryngol.* 2007; 32: 185-9.

75 Verrico AK, Haylett AK, Moore JV. In vivo expression of the collagen-related heat shock protein HSP47, following hyperthermia or photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2001; 16: 192-8.

76 Leon X, Quer M, Orus C, Lopez M, Gras JR, Vega M. Results of salvage surgery for local or regional recurrence after larynx preservation with induction chemotherapy and radiotherapy. *Head Neck.* 2001; 23: 733-8.

77 Steiner W, Vogt P, Ambrosch P, Kron M. Transoral carbon dioxide laser microsurgery for recurrent glottic carcinoma after radiotherapy. *Head Neck.* 2004; 26: 477-84.

78 Gallo A, Moi R, Simonelli M, Vitolo D, Fiorella ML, Marvaso V, Manciooco V, de Vincentiis M. Salvage resection after previous laryngeal surgery: total laryngectomy with en bloc resection of the overlying cervical skin. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127: 786-9.

79 Kim AJ, Suh JD, Sercarz JA, Abemayor E, Head C, Funk G, Blackwell KE. Salvage surgery with free flap reconstruction: factors affecting outcome after treatment of recurrent head and neck squamous carcinoma. *Laryngoscope*. 2007; 117: 1019-23.

80 Withrow KP, Rosenthal EL, Gourin CG, Peters GE, Magnuson JS, Terris DJ, Carroll WW. Free tissue transfer to manage salvage laryngectomy defects after organ preservation failure. *Laryngoscope*. 2007; 117: 781-4.

81 Liu SA, Wong YK, Lin JC, Poon CK, Tung KC, Tsai WC. Impact of recurrence interval on survival of oral cavity squamous cell carcinoma patients after local relapse. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 136: 112-8.

82 Goodwin WJ Jr. Salvage surgery for patients with recurrent squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: when do the ends justify the means? *Laryngoscope*. 2000; 110 (3 Pt 2 Suppl 93): 1-18.

83 Motamed M, Laccourreye O, Bradley PJ. Salvage conservation laryngeal surgery after irradiation failure for early laryngeal cancer. *Laryngoscope*. 2006; 116: 451-5.

84 Piazza C, Peretti G, Cattaneo A, Garrubba F, De Zinis LO, Nicolai P. Salvage surgery after radiotherapy for laryngeal cancer: from endoscopic resections to open-neck partial and total laryngectomies. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 133: 1037-43.

85 Bradley PJ, Ferlito A, Suárez C, Werner JA, Genden EM, Shaha AR, Leemans CR, Langendijk JA, Rinaldo A. Options for salvage after failed initial treatment of anterior vocal commissure squamous carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2006; 263: 889-94.

86 Pellini R, Pichi B, Ruscito P, Ceroni AR, Caliceti U, Rizzotto G, Pazzoia A, Laudadio P, Piazza C, Peretti G, Giannarelli D, Spriano G. Supracricoid partial laryngectomies after radiation failure: a multi-institutional series. *Head Neck*. 2008; 30: 372-9.



87 Yiotakis J, Stavroulaki P, Nikolopoulos T, Manolopoulos L, Kandiloros D, Ferekidis E, Adamopoulos G. Partial laryngectomy after irradiation failure. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 128: 200-9.

88 Creak AL, Harrington K, Nutting C. Treatment of recurrent head and neck squamous cell carcinoma: reirradiation or chemotherapy? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2005; 17: 138-47.

89 Farrag TY, Lin FR, Cummings CW, Koch WM, Flint PW, Califano JA, Broussard J, Bajaj G, Tufano RP. Neck management in patients undergoing postradiotherapy salvage laryngeal surgery for recurrent/persistent laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 2006; 116: 1864-6.

90 Ganly I, Patel SG, Matsuo J, Singh B, Kraus DH, Boyle JO, Wong RJ, Shaha AR, Lee N, Shah JP. Results of surgical salvage after failure of definitive radiation therapy for early-stage squamous cell carcinoma of the glottic larynx. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006; 132: 59-66.

91 Kasperts N, Slotman BJ, Leemans CR, de Bree R, Doornaert P, Langendijk JA. Results of postoperative reirradiation for recurrent or second primary head and neck carcinoma. *Cancer.* 2006; 106 :1536-47.

92 Salama JK, Vokes EE, Chmura SJ, Milano MT, Kao J, Stenson KM, Witt ME, Haraf DJ. Long-term outcome of concurrent chemotherapy and reirradiation for recurrent and second primary head-and-neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006 1; 64: 382-91.

93 Wong SJ, Machtay M, Li Y. Locally recurrent, previously irradiated head and neck cancer: concurrent re-irradiation and chemotherapy, or chemotherapy alone? *J Clin Oncol.* 2006; 24: 2653-8.

94 Adelstein DJ. Systemic chemotherapy for squamous cell head and neck cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2003; 4: 2151-63.

- 95 Spencer SA, Harris J, Wheeler RH, Machtay M, Schultz C, Spanos W, Rotman M, Meredith R. rTOG 96-10: reirradiation with concurrent hydroxyurea and 5-fluorouracil in patients with squamous cell cancer of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51: 1299-304.
- 96 Rhee JC, Khuri FR, Shin DM. Advances in chemoprevention of head and neck cancer. *Oncologist.* 2004; 9: 302-11.
- 97 Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase- 2 transcription by CREB- binding protein/ p300-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.* 2002; 62: 2522-30.
- 98 Mulshine JL, Atkinson JC, Greer RO, Papadimitrakopoulou VA, Van Waes C, Rudy S, Martin JW, Steinberg SM, Liewehr DJ, Avis I, Linnoila RI, Hewitt S, Lippman SM, Frye R, Cavanaugh PF Jr. Randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIb trial of the cyclooxygenase inhibitor ketorolac as an oral rinse in oropharyngeal leukoplakia. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 1565- 73.
- 99 Singh M, Krishanappa R, Bagewadi A, Keluskar V. Efficacy of oral lycopene in the treatment of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2004; 40: 591-6.
- 100 Rudin CM, Cohen EE, Papadimitrakopoulou VA, Silverman S Jr, Recant W, El-Naggar AK, Stenson K, Lippman SM, Hong WK, Vokes EE. An attenuated adenovirus, ONYX-015, as mouthwash therapy for premalignant oral dysplasia. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 4546-52.
- 101 Hsu SD, Singh BB, Lewis JB, Borke JL, Dickinson DP, Drake L, Caughman GB, Schuster GS. Chemoprevention of oral cancer by green tea. *Gen Dent.* 2002; 50: 140-6.
- 102 Casto BC, Kresty LA, Kraly CL, Pearl DK, Knobloch TJ, Schut HA, Stoner GD, Mallery SR, Weghorst CM. Chemoprevention of oral cancer by black raspberries. *Anticancer Res.* 2002; 22 (6C): 4005-15.

103 Wutzl A, Ploder O, Kermer C, Millesi W, Ewers R, Klug C. Mortality and causes of death after multimodality treatment for advanced oral and oropharyngeal cancer. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65: 255-60.

104 Vaamonde P, Martín C, del Río M, LaBella T. Second primary malignancies in patients with cancer of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129: 65-70.

105 Friedrich RE. Primary and second primary cancer in 649 patients with malignancies of the maxillofacial región. *Anticancer Res.* 2007; 27 (4A): 1805-18.

106 Bhattacharyya N, Nayak VK. Survival outcomes for second primary head and neck cancer: a matched analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 ; 132: 63-8.

107 Sood S, Bradley P, Quraishi MS. Second primary tumors in squamous cell carcinoma of the head and neck incidence, site, location and prevention. *Curr Opin Otolaryngol* 2000; 8: 87-90.

108 Schwartz DL, Barker J Jr, Chansky K, Yueh B, Raminfar L, Drago P, Cha C, Austin-Seymour M, Laramore GE, Hillel AD, Weymuller EA, Wallner KE. Postradiotherapy surveillance practice for head and neck squamous cell carcinoma-too much for too little?. *Head Neck.* 2003; 25: 990-9.

109 Garavello W, Spreafico R, Somigliana E, Gaini L, Pignataro L, Gaini RM. Prognostic influence of gender in patients with oral tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 138: 768-71.

110 Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR, Myoung H. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol.* 2006; 42: 208-17.

111 Lee N, Chan K, Bekelman JE, Zhung J, Mechalakos J, Narayana A, Wolden S, Venkatraman ES, Pfister D, Kraus D, Shah J, Zelefsky MJ. Salvage re-irradiation for recurrent head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 68: 731-40.

112 Cho EI, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic significance of pretreatment hemoglobin for local control and overall survival in T1-T2N0 larynx cancer treated with external beam radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58: 1135-40.

113 Chen MF, Chang JT, Tsang NM, Liao CT, Chen WC. Radiotherapy of early-stage glottic cancer: analysis of factors affecting prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003; 112: 904-11.

114 Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953; 6: 963-8.

115 Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Rigante M, Artuso A, Maurizi M. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field of cancerization phenomenon: a review. *Eur J Cancer.* 2004; 40: 2383-8.

116 Pantel K, Braakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nature.* 2004; 4: 448-56.

117 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: 2488-92.

118 Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, Phillips E, Langdon J. Field cancerization of the oral cavity: comparison of the spectrum of molecular alterations in cases presenting with both dysplastic and malignant lesions. *Oral Oncol.* 1997; 33: 332-37.

- 119 van Oijen MG, Slootweg PJ. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000; 9: 249-56.
- 120 van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Mutated *p53* as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol.* 2002 ; 198: 476-86.
- 121 Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3: 444-51.
- 122 Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2005; 15: 113-20.
- 123 Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, Cadoni G, Galli J, Ferrandina G, Scambia G, Neri G. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 1996; 2: 175-80.
- 124 Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Leemans CR. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Ann Oncol.* 2005; 16Suppl 2: ii249-50.
- 125 Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61: 759-67.
- 126 Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2001; 345:1890-1900. Fe de erratas en: *N Engl J Med* 2002; 346(10):788.
- 127 Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of *p16* (*CDKN2/MTS-1/INK4A*) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 3630-33.

- 128 Okami K, Reed AL, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Cyclin D1 amplification is independent of *p16* inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene*. 1999; 18: 3541-5.
- 129 Maestro R, Gasparotto D, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, Boiocchi M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res*. 1993; 53: 5775-9.
- 130 Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, Berean K, Epstein JB, Priddy R, Le ND, Zhang L. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 357-62.
- 131 Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, Pignataro L. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck*. 2000; 22: 234-40.
- 132 Ke LD, Adler-Storthz K, Clayman GL, Yung AW, Chen Z. Differential expression of epidermal growth factor receptor in human head and neck cancers. *Head Neck*. 1998; 20: 320-27.
- 133 Cohen EE, Rosen F, Stadler WM, Recant W, Stenson K, Huo D, Vokes EE . Phase II trial of ZD1839 in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1980-7.
- 134 Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, Heyne K, Shin HJ, Ro JY, Goepfert H, Hong WK, Hittelman WN. *p53* expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88: 519-29.
- 135 Nogueira CP, Dolan RW, Goey J, Byahatti S, Vaughan CW, Fuleihan NS, Grillone G, Baker E, Domanowski G. Inactivation of *p53* y amplification of cyclin D1 correlate with clinical outcome in head and neck cancer. *Laryngoscope*. 1998, 108: 345-50.

136 Wolf C, Flechtenmacher C, Dietz A, Weidauer H, Abel U, Maier H, Bosch FX. *p53*-positive tumor-distant squamous epithelia of the head and neck reveal selective loss of chromosome 17. *Laryngoscope*. 2004; 114: 698-704.

137 Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck*. 2001; 23: 238-53.

138 Okafuji M, Ita M, Oga A, Hayatsu Y, Matsuo A, Shinzato Y, Shinozaki F, Sasaki K. The relationship of genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization to DNA ploidy and tumor size in human oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2000; 29: 226-31.

139 Kujawski M, Sarlomo-Rikala M, Gabriel A, Szyfter K, Knuutila S. Recurrent DNA copy number losses associated with metastasis of larynx carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999; 26: 253-7.

140 Bockmühl U, Schlüns K, Schmidt S, Matthias S, Petersen I. Chromosomal alterations during metastasis formation of head and neck squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 ; 33: 29-35.

141 Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du Manoir S. A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: *PIK3CA* but not *p63* gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res*. 2001; 61: 4122-9.

142 Patmore HS, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Unraveling the chromosomal aberrations of head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Ann Surg Oncol*. 2005; 12: 831-42.

143 Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. *AT5* is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97: 5462-7.

144 Woenckhaus J, Steger K, Werner E, Fenic I, Gamedinger U, Dreyer T, Stahl U. Genomic gain of *PIK3CA* and increased expression of p110alpha are associated with progression of dysplasia into invasive squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2002; 198: 335-42.

145 Huang Q, Yu GP, McCormick SA, Mo J, Datta B, Mahimkar M, Lazarus P, Schäffer AA, Desper R, Schantz SP. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 34: 224-33.

146 Spandidos DA, Sourvinos G, Tsatsanis C, Zafiroopoulos A. Normal ras genes: their onco-suppressor and pro-apoptotic functions (review). *Int J Oncol.* 2002; 21: 237-41.

147 Hermsen MA, Joenje H, Arwert F, Braakhuis BJ, Baak JP, Westerveld A, Slater R. Assessment of chromosomal gains and losses in oral squamous cell carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Oral Oncol.* 1997; 33: 414-8.

148 Gebhart E, Ries J, Wiltfang J, Liehr T, Efferth T. Genomic gain of the epidermal growth factor receptor harboring band 7p12 is part of a complex pattern of genomic imbalances in oral squamous cell carcinomas. *Arch Med Res.* 2004; 35: 385-94.

149 Tremmel SC, Götte K, Popp S, Weber S, Hörmann K, Bartram CR, Jauch A. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003; 144: 165-74.

150 Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene.* 1999; 18: 5646-53.

151 van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res.* 1994; 54: 1156-8.



152 Lazar AD, Winter MR, Nogueira CP, Larson PS, Finnemore EM, Dolan RW, Fuleihan N, Chakravarti A, Zietman A, Rosenberg CL. Loss of heterozygosity at 11q23 in squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with recurrent disease. *Clin Cancer Res.* 1998; 4: 2787-93.

153 Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001; 7: 1523-32.

154 Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 1999; 5: 206-9.

155 Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998; 34: 270-5.

156 van der Waal I, Axell T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. *Oral Oncol.* 2002; 38: 521-6.

157 Partridge M, Li SR, Pateromichelakis S, Francis R, Phillips E, Huang XH, Tesfa-Selase F, Langdon JD. Detection of minimal residual cancer to investigate why oral tumors recur despite seemingly adequate treatment. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 2718-25.

158 Tabor MP, Braakhuis BJM, van der Wal JE, van Diest PJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, Kummer JA. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol.* 2003; 199: 354-60.

159 Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: e57.

160 Slater HR, Bruno DL, Ren H, Pertile M, Schouten JP, Choo KH. Rapid, high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA). *J Med Genet.* 2003; 40: 907-12.

161 Janssen B, Hartmann C, Scholz V, Jauch A, Zschocke J. MLPA analysis for the detection of deletions, duplications and complex rearrangements in the dystrophin gene: potential and pitfalls. *Neurogenetics.* 2005; 6: 29-35.

162 Erlandson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlstrom J. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the *MECP2* gene of Swedish *RETTE* syndrome patients. *Genet Test.* 2003; 7: 329-32.

163 Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Prunzel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluij I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G. Large genomic deletions and duplications in the *BRCA1* gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res.* 2003; 63: 1449-53.

164 Baudhuin LM, Mai M, French AJ, Kruckeberg KE, Swanson RL, Winters JL, Courteau LK, Thibodeau SN. Analysis of *bMLH1* and *bMSH2* gene dosage alterations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients by novel methods. *J Mol Diagn.* 2005; 7: 226-35.

165 Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds). World Health Organization. Classification of Tumours, Pathology and genetics of head and neck tumours. IRAC Press. Lyon 2005.

166 Smigiel R, Sasiadek M, Krecicki T, Ramsey D, Jagielski J, Blin N. Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2<sup>a</sup> (*CDKN2A*) gene in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mol Carcinog.* 2004; 39: 147-154.

167 Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M, Sasiadek MM. Studies of the cell cycle regulatory proteins *p16*, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. *J Laryngol Otol.* 2004 Sep; 118: 676-80.

168 Worsham MJ, Pals G, Schouten JP, Van Spaendonk RM, Concus A, Carey TE, Benninger MS. Delineating genetic pathways of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003; 129: 702-8.

169 O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, Timon C, Smyth P, Cahill S, Flavin R, Sheils OM, O'Leary JJ. *P16(INK4A)* genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. Hum Pathol. 2008; 39: 452-8.

170 Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of *P16INK4A* and *P14ARF* genes in prognosis of oral carcinoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2008; 17: 414-20.

171 Suzuki H, Sugimura H, Hashimoto K. *P16INK4A* in oral squamous cell carcinomas--a correlation with biological behaviors: immunohistochemical and FISH analysis. J Oral Maxillofac Surg. 2006; 64: 1617-23.

172 Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, Field JK, Risk JM. Promoter methylation of *P16*, *RARB*beta, *E-cadherin*, *cyclin A1* and *cytoglobin* in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. Br J Cancer. 2006; 94: 561-8.

173 Lim KP, Sharifah H, Lau SH, Teo SH, Cheong SC. Alterations of the *P14ARF-P53-MDM2* pathway in oral squamous cell carcinoma: *MDM2* overexpression is a common event. Oncol Rep. 2005; 14: 963-8.

174 Sasiadek MM, Stembalska-Kozłowska A, Smigiel R, Ramsey D, Kayademir T, Blin N. Impairment of *MLH1* and *CDKN2A* in oncogenesis of laryngeal cancer. Br J Cancer. 2004; 90: 1594-9.

175 Bazan V, Zanna I, Migliavacca M, Sanz-Casla MT, Maestro ML, Corsale S, Macaluso M, Dardanoni G, Restivo S, Quintela PL, Bernaldez R, Salerno S, Morello V, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A. Prognostic significance of *P16INK4A* alterations and 9p21 loss of heterozygosity in locally advanced laryngeal squamous cell carcinoma. J Cell Physiol. 2002; 192: 286-93.

- 176 Shi J, Liu H, Wilkerson M, Huang Y, Meschter S, Dupree W, Schuerch C, Lin F. Evaluation of *P16INK4A*, minichromosome maintenance protein 2, DNA topoisomerase II alpha, ProEX c, and *P16INK4A/PROEX C* in cervical squamous intraepithelial lesions. *Hum Pathol.* 2007; 38: 1335-44.
- 177 Tripathi Bhar A, Banerjee S, Chunder N, Roy A, Sengupta A, Roy B, Roychowdhury S, Panda CK. Differential alterations of the genes in the *CDKN2A-CcND1-CDK4-RB1* pathway are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; 129: 642-50.
- 178 National Center for biotechnology information. Entrez nucleotide (base de datos en internet). Bethesda: National Center for biotechnology information; 1988-, (fecha de acceso: 25 de agosto de 2008) disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuclest&id=4735942>.
- 179 Zhang YL, Pang LQ, Wu Y, Wang XY, Wang CQ, Fan Y. Significance of *Bcl-xL* in human colon carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008; 14: 3069-73.
- 180 Schoop RA, Kooistra K, Baatenburg De Jong RJ, Noteborn MH *Bcl-xL* inhibits *p53*- but not apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 2004; 109: 38-42.
- 181 Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. A model for *p53*-induced apoptosis. *Nature.* 1997; 389: 300-5.
- 182 Lee TL, Yeh J, Friedman J, Yan B, Yang X, Yeh NT, Van Waes C, Chen Z. A signal network involving coactivated  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  and *STAT3* and altered *p53* modulates *BAX/BCL-XL* expression and promotes cell survival of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2008; 122: 1987-98.
- 183 Guervós MA, Marcos CA, Hermsen M, Nuño AS, Suárez C, Llorente JL. Deletions of *N33*, *STK11* and *TP53* are involved in the development of lymph node metastasis in larynx and pharynx carcinomas. *Cell Oncol.* 2007; 29: 327-34.

184 Chen K, Hu Z, Wang LE, Sturgis EM, El-Naggar AK, Zhang W, Wei Q. Single-nucleotide polymorphisms at the *TP53*-binding or responsive promoter regions of *BAX* and *BCL2* genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 2008-12.

185 Chen K, Hu Z, Wang LE, Zhang W, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphic *TP53BP1* and *TP53* gene interactions associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2007; 13: 4300-5.

186 Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. *TP53* mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2007; 357: 2552-61.

187 Tunca B, Erisen L, Coskun H, Cecener G, Ozuysal S, Egeli U. *P53* gene mutations in surgical margins and primary tumor tissues of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Tumori*. 2007; 93: 182-8.

188 Gallo O, Schiavone N, Papucci L, Sardi I, Magnelli L, Franchi A, Masini E, Capaccioli S. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 pathways by *p53* in squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*. 2003; 163: 723-32.

189 Couture C, Raybaud-Diogenè H, Têtu B, Bairati I, Murry D, Allard J, Fortin A. *p53* and *Ki-67* as markers of radioresistance in head and neck carcinoma. *Cancer*. 2002; 94: 713-22.

190 Kowalski JR, Egile C, Gil S, Snapper SB, Li R, Thomas SM. Cortactin regulates cell migration through activation of *N-WASP*. *J Cell Sci*. 2005; 118(Pt 1):79- 87.

191 Rodrigo JP, García LA, Ramos S, Lazo PS, Suárez C. *EMS1* gene amplification correlates with poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 3177-82.

- 192 Xia J, Chen Q, Li B, Zeng X. Amplifications of *TAOS1* and *EMS1* genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. *Oral Oncol.* 2007; 43: 508-14.
- 193 Buday L, Downward J. Roles of cortactin in tumor pathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1775: 263-73.
- 194 Nelson BH. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. *Curr Dir Autoimmun.* 2002; 5: 92-112.
- 195 Jablonska E, Puzewska W, Grabowska Z, Jablonski J, Talarek L. *VEGF*, *IL-18* and NO production by neutrophils and their serum levels in patients with oral cavity cancer. *Cytokine.* 2005; 30: 93-9.
- 196 Vairaktaris E, Serefoglou ZC, Yapijakis C, Agapi C, Vassiliou S, Nkenke E, Antonis V, Sofia S, Neukam FW, Patsouris E. The interleukin-18 -607A/C polymorphism is not associated with risk for oral cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27 (6B): 4011-4.
- 197 Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of *BRCA* genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med.* 2002; 8: 571-6.
- 198 Zynger DL, Dimov ND, Ho LC, Laskin WB, Yeldandi AV. Differential expression of neural-cadherin in pulmonary epithelial tumours. *Histopathology.* 2008; 52: 348-54
- 199 Cavallaro U. N-cadherin as an invasion promoter: a novel target for antitumor therapy? *Curr Opin Investig Drugs.* 2004; 5: 1274-8.
- 200 Arcellana-Panlilio MY, Egeler RM, Ujack E, Magliocco A, Stuart GC, Robbins SM, Coppes MJ. Evidence of a role for the *INK4* family of cyclin-dependent kinase inhibitors in ovarian granulosa cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002; 35: 176-81.

201 Lung HL, Cheung AK, Xie D, Cheng Y, Kwong FM, Murakami Y, Guan XY, Sham JS, Chua D, Protopopov AI, Zabarovsky ER, Tsao SW, Stanbridge EJ, Lung ML. *TSLC1* is a tumor suppressor gene associated with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 9385-92.

202 Zhu S, Bjorge JD, Fujita DJ. *PTP1B* contributes to the oncogenic properties of colon cancer cells through Src activation. *Cancer Res.* 2007; 67: 10129-37.

203 Chamieh H, Ballut L, Bonneau F, Le Hir H. *NMD* factors *UPF2* and *UPF3* bridge *UPF1* to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol.* 2008; 15: 85-93.

204 Trinkaus M, Vranic A, Dolenc VV, Lah TT. Cathepsins B and L and their inhibitors stefin B and cystatin C as markers for malignant progression of benign meningiomas. *Int J Biol Markers.* 2005; 20: 50-9.

205 Premzl A, Turk V, Kos J. Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *J Cell Biochem.* 2006; 97: 1230-40.

206 Pils D, Horak P, Gleiss A, Sax C, Fabjani G, Moebus VJ, Zielinski C, Reinthaller A, Zeillinger R, Krainer M. Five genes from chromosomal band 8p22 are significantly down-regulated in ovarian carcinoma: *N33* and *EFA6R* have a potential impact on overall survival. *Cancer.* 2005; 104: 2417-29.

207 Schoop RA, Kooistra K, Baatenburg De Jong RJ, Noteborn MH. Bcl-xL inhibits *p53*- but not apoptin-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 2004; 109: 38-42.

208 Zhigang H, Demin H, Han G, Erzhong F, Xiaohong C, Hongbo X. Significance and mechanism of microsatellite instability in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol.* 2007; 36: 168-74.

- 209 Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer*. 2007; 109: 703-12.
- 210 Demokan S, Suoglu Y, Demir D, Gozeler M, Dalay N. Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann Oncol*. 2006; 17: 995-9.
- 211 Smigiel R, Stembalska-Kozłowska A, Mirghomizadeh F, Krecicki T, Zatonski T, Ramsey D, Horobiowska M, Jagielski J, Blin N, Sasiadek M. Correlation among loss of heterozygosity, promoter methylation and protein expression of *MLH1* in larynx cancer. *Oncol Rep*. 2004;11: 707-10.
- 212 Yamamoto M, Taguchi K, Baba H, Endo K, Kohnoe S, Okamura T, Maehara Y. Loss of protein expression of *hMLH1* and *hMSH2* with double primary carcinomas of the stomach and colorectum. *Oncol Rep*. 2006; 16: 41-7.
- 213 Singh B, Stoffel A, Gogineni S, Poluri A, Pfister DG, Shaha AR, Pathak A, Bosl G, Cordon-Cardo C, Shah JP, Rao PH. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 2002; 161: 365-71.
- 214 Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2002; 23: 19-24.
- 215 Qiu W, Schönleben F, Li X, Su GH. Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of *SMAD2* and *SMAD4*. *Cancer Lett*. 2007; 245: 163-70.



216 Peng H, Shintani S, Kim Y, Wong DT. Loss of *PI2CDK2-API* expression in human oral squamous cell carcinoma with disrupted transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway. *Neoplasia*. 2006; 8: 1028-36.

217 Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, Kubuki Y, Okayama A, Hamada K, Okabe H, Murakami Y, Tsubouchi H, Morishita K. Overexpression of a cell adhesion molecule, *TSLCI*, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood*. 2005; 105: 1204-13.

218 Polato F, Codegoni A, Fruscio R, Perego P, Mangioni C, Saha S, Bardelli A, Broggin M. *PRL-3* phosphatase is implicated in ovarian cancer growth. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(19 Pt 1): 6835-9.

219 Radke I, Götte M, Kersting C, Mattsson B, Kiesel L, Wülfing P. Expression and prognostic impact of the protein tyrosine phosphatases *PRL-1*, *PRL-2*, and *PRL-3* in breast cancer. *Br J Cancer*. 2006; 95: 347-54.

220 Yamashita S, Masuda Y, Matsumoto K, Okumura Y, Matsuzaki H, Kurizaki T, Haga Y, Katafuchi S, Murayama T, Ikei S, Kawahara K. Down-regulation of the human *PRL-3* gene is associated with the metastasis of primary non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 13: 236-9.





## 13. Anexos



## Metástasis a distancia en el cáncer de cabeza y cuello

C.A. Álvarez Marcos<sup>1</sup>, J.L. Llorente Pendás<sup>2</sup>, V. Franco Gutiérrez<sup>2</sup>, M. Hermesen<sup>2</sup>, M.P. Cuesta Albalad<sup>2</sup>, H. Fernández Espina<sup>1</sup>, C. Suárez Nieto<sup>2</sup>

Servicio de Otorrinolaringología. <sup>1</sup>Hospital Valle del Nalón. Riello-Langreo. <sup>2</sup>Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

**Resumen:** *Introducción:* La presencia de metástasis a distancia (MD) no es un evento muy frecuente en los carcinomas de cabeza y cuello (CECC) y se asocia con muy mal pronóstico. *Objetivo:* Investigar las principales características clínicas y factores de riesgo asociados con el diagnóstico de MD en CECC. *Material y método:* Estudio retrospectivo de 633 pacientes con CECC para describir las características clínicas de las MD. *Resultados:* Se observan en el 6,2% de los CECC. Las localizaciones que más las originan son la hipofaringe (14,4%), los primarios de origen desconocido (11,8%) y la orofaringe (8,5%), apareciendo con mayor frecuencia en pulmón (58%) y hueso (22%). Determinan un gran impacto en la supervivencia, reduciéndola al 2,5% a los 3 años (49,5% en el grupo control a los 5 años). *Conclusiones:* Es preciso realizar un seguimiento adecuado para su detección precoz y tratamiento eficaz, investigando nuevos protocolos terapéuticos que incluyan la quimioterapia.

**Palabras clave:** Cáncer de cabeza y cuello. Metástasis a distancia. Cáncer escamoso.

### Distant metastases in head and neck cancer

**Abstract:** *Introduction:* The presence of distant metastasis (DM) after the initial treatment of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is not considered a common event and it is associated to a poor outcome. *Purpose:* To investigate the prevalence and risk factors associated with the diagnosis of distant metastasis in SCC. *Methods and Materials:* A retrospective study of 633 patients with HNSCC to describe the clinical characteristics of the DM. *Results:* During the follow-up period after the initial treatment, 6.2% of the patients were diagnosed of having distant metastasis. The site of primary tumor was hypopharynx in 14.4%, unknown origin in 11.8% and oropharynx in 8.5%. The most common sites of DM were the lungs (58%) and the bone (22%). Three year overall survival in patients with DM was 2.5% (versus 49.5% in the control group). *Conclusions:* This

study confirms that DM have an adverse impact in survival. There is a need of guidelines for screening of distant metastases in patients with HNSCC in order to get an early diagnosis and a more effective treatment. Because of the poor prognosis of DM, protocols including adjuvant chemotherapy should be investigated.

**Key words:** Head and neck cancer. Distant metastases. Squamous cell carcinoma.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) presenta en nuestro medio una incidencia y mortalidad elevada. Aunque se han producido importantes avances en su diagnóstico y tratamiento, la supervivencia no ha experimentado mejoras sustanciales en los últimos años debido a que sigue haciéndose un diagnóstico tardío. El mejor control local de la enfermedad ha disminuido las recidivas locales al realizarse resecciones más seguras, debido a la introducción de nuevas técnicas reconstructivas. Sin embargo, las metástasis a distancia (MD) y los segundos tumores primarios (STP) se han incrementado de manera inversa al descenso de las recidivas locales<sup>1,2</sup>. El diagnóstico de una MD supone para el paciente una reducción drástica de las expectativas de supervivencia y el fin de casi todas las opciones terapéuticas curativas<sup>3</sup>.

El propósito de este estudio es hacer una recopilación de las principales características clínicas de las MD y determinar su implicación en la supervivencia.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Diseño y sujetos de estudio

En el diseño del estudio incluimos a los pacientes con diagnóstico clínico de MD constatado con pruebas de imagen (Rx, ecografía, TAC, RNM) e isotópicas, excluyendo los casos dudosos o insuficientemente documentados<sup>4</sup>. La confirmación histopatológica casi nunca fue posible y el diagnóstico se basó en las técnicas anteriormente citadas, valorando los criterios que establecen las diferencias con un STP.

Correspondencia: César Antonio Álvarez Marcos  
Las Aldeas, 19  
33013 Oviedo (Asturias)  
E-mail: alvarezmarcos@telefonica.net  
Fecha de recepción: 13-3-2006  
Fecha de aceptación: 14-7-2006

Realizamos un estudio retrospectivo en el periodo 1984-2004 utilizando la base de datos oncológica de nuestro hospital (DBASE con 76 campos). En ese tiempo tenemos recogidos 633 pacientes con el diagnóstico de CECC de múltiples localizaciones. En esta muestra inicial hay registrados 63 pacientes con el diagnóstico de MD (10%). Sin embargo, al seleccionar los casos, para ajustarlos al diseño establecido, la muestra quedó reducida a 39 casos bien documentados, que fueron finalmente los estudiados. Al mismo tiempo, para valorar el impacto que supuso en la supervivencia la aparición de una MD, se estableció una muestra control de 39 pacientes con CECC de la misma localización y estadio, pero sin MD, elegidos aleatoriamente en la misma base de datos.

En la muestra seleccionada estudiamos las variables epidemiológicas y clínico-patológicas: incidencia anual y global, localización, asociaciones, estadio TNM e histopatología del tumor origen, temporalidad, tratamiento y supervivencia.

#### Estudio estadístico

Utilizamos el programa SPSS 11.0 con un nivel de significación de  $p < 0,05$ . Para el análisis uni y bivariable se compararán las medias independientes, estimando la supervivencia con curvas de Kaplan Meier.

## RESULTADOS

La incidencia total de MD constatadas representa el 6,2%. El riesgo de incidencia anual es del 4% el primer año, 2% el segundo y sólo 0,1% el tercero, para posteriormente desaparecer. Se diagnostican en torno a 3-4 MD por año, representando el 4-14% de los diagnósticos oncológicos nuevos anuales, con tendencia a aumentar.

Las MD tienen como principal órgano diana el pulmón (58%), seguido por el hueso (22%) e hígado (9%). Los tumores primarios más metastásicos son los de hipofaringe (14,4%), seguidos por los de origen desconocido (11,8%) (Tabla 1).

El estadio TNM del tumor primario que originó las MD, en el momento de su diagnóstico, presenta predominio

muy importante de la categoría N+ (95%) y de los estadios III-IV (98%) (Figura 1).

Son habituales las asociaciones entre MD con recidivas (20,5%), MD y STP (12%), así como las metastasis múltiples localizaciones (15,3%).

El diagnóstico histopatológico en las MD no se hace habitualmente por la inaccesibilidad y el mal estado general de los pacientes, siendo diagnosticadas por técnicas de imagen o isotópicas. El tumor origen de la metástasis se trataba en casi todos los casos de un carcinoma de tipo escamoso con distintos grados de diferenciación (buen: 10%, moderado: 43% y poco: 38%).

El tiempo medio de aparición de las MD es de 12 meses desde el diagnóstico del tumor primario, con un rango muy amplio (1-49 meses), aunque no se observaron de forma simultánea.

La supervivencia fue sólo del 2,5% debido a que todos los pacientes fallecieron en un tiempo medio de 5 meses (rango de 1-30), excepto uno con múltiples metastasis pulmonares y recidiva local, tratado con radio-quimioterapia, que sigue vivo sin tumor 40 meses después.

El antecedente de radioterapia previa al desarrollo de MD se constató en el 76% de los pacientes, pero en la muestra control, sin MD, este antecedente también aparecía en el 81%. Ninguno de los datos que relacionan supervivencia con radioterapia previa al desarrollo de MD alcanzó significación estadística.

El impacto que supuso en la supervivencia la aparición de una MD muestra valores muy significativos al compararla con la serie control (supervivencia a los 5 años del 49,5%) ( $p < 0,001$ ) (Figura 2).

## DISCUSIÓN

Nuestra base de datos oncológica en general se ajusta a las características clínicas y de supervivencia de los CECC en nuestro medio, donde predominan los tumores de laringe supraglótica y faringe<sup>16</sup>.

Las MD tienen en nuestra serie una incidencia del 6,2%, con criterios estrictos. Otros autores presentan valores aproximados (5,5%), aunque sólo para las metastasis pul-

Tabla 1: Localización y asociaciones entre las MD y el tumor primario. El número final corresponde al total de metastasis, incluidas las localizaciones múltiples

TP	Hipofaringe	1° ¿?	Orofaringe	Supraglotis	C. oral	Transglotis	Otros	Total tumor primario**
MD								
Pulmón	7	2	7	6	1	2	1	26 (58%)
Hueso	3	2	2	2	-	-	1	10 (22%)
Hígado	1	-	2	-	-	-	1	4 (9%)
Partes blandas	2	-	-	2	-	-	-	4 (9%)
Otras	1	-	-	-	-	-	-	1 (2%)
Total localización MD	14	4	11	10	1	2	3	45*
	(14,4%)	(11,8%)	(8,5%)	(8%)	(3%)	(1%)	(4,5%)	

\*6 localizaciones múltiples: 3 pulmón + hueso, 2 pulmón + partes blandas, 1 pulmón + hígado.

\*\*El % se calcula sobre el total de tumores de esa localización en la base de datos. 1° ¿?: Tumor primario desconocido.

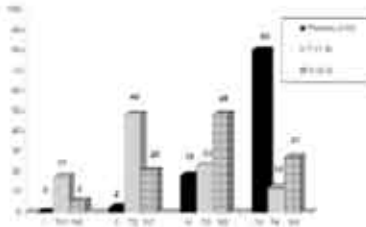


Figura 1. Estadísticas totales de T y N del tumor primario de los pacientes que desarrollaron una MD. Se especifica el porcentaje.

monares<sup>16</sup>. Es muy posible que la incidencia real de las MD sea superior al porcentaje señalado, pues hemos excluido los casos en los que no se llegó a documentar el diagnóstico por el mal estado del paciente. La localización pulmonar es la más frecuente, siendo constante en las MD múltiples, que ocurren en el 15% de los casos<sup>16</sup>.

Cuando se diagnostica una MD se observa un predominio muy manifiesto de estadios avanzados y metástasis ganglionares en el tumor primario. No hemos diagnosticado ningún caso de MD que aparezcan de forma simultánea al tumor primario<sup>16</sup>. Por ello se interpreta que son el paso más avanzado en la progresión del tumor maligno (invasión local/metástasis ganglionar/metástasis a distancia). Otros autores corroboran estos datos observando que las metástasis ganglionares cervicales son un factor de riesgo para el desarrollo de MD<sup>17</sup>.

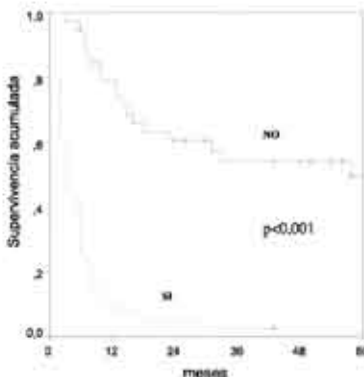


Figura 2. Impacto de la supervivencia de los pacientes con MD versus pacientes control.

En la histopatología del tumor primario destaca el alto porcentaje de carcinomas poco diferenciados (38%) en relación a lo observado en los CECC en general (12%)<sup>18</sup>.

La localización tumoral que origina mayor número de MD es la hipofaringe, seguida por los tumores de origen desconocido (Tx) y la orofaringe<sup>19,20,21</sup>. Es posible que el mayor número de MD que presentan los tumores faríngeos sea la causa de su escasa supervivencia, y frente al desarrollo de STP, en oposición a lo que ocurre en los tumores laringeos, aunque otros autores también señalan la alta incidencia en tumores supraglóticos<sup>22</sup>. Las metástasis ganglionares han sido consideradas como un factor de riesgo para el desarrollo de MD, como hemos visto en nuestro estudio y ratifican otros autores<sup>23</sup>. Es particularmente llamativo el alto número de MD en las metástasis ganglionares de tumores primarios de origen desconocido. También es frecuente la asociación entre MD y STP, pudiendo dificultar más el diagnóstico si la metástasis es única y con localización pulmonar, aunque en el resto de los casos el diagnóstico es más evidente<sup>24</sup>. Para esclarecer este punto puede contribuir el estudio genético del ADN tumoral, que sería igual al tumor inicial en las MD y recidivas, y parecido o diferente si se trata de un segundo tumor de campo o STP<sup>25</sup>. En la mayoría de los MD no se puede confirmar este dato por el difícil acceso para obtener una muestra tisular<sup>26</sup>. Para solventar este problema no se descarta el estudio futuro de otros marcadores séricos<sup>27</sup>.

El tiempo medio de aparición de un año después del tumor primario también se ajusta a lo presentado por otros autores<sup>28</sup>. El impacto que supone la MD en la supervivencia de nuestra serie es desalentador falleciendo los pacientes en la mayoría de los casos (97,5%), con una supervivencia media de 6 meses. Sólo un caso excepcional sigue vivo sin tumor transcurridos 40 meses, después de un tratamiento combinado con radio-quimioterapia<sup>29</sup>. Todos los pacientes con MD fallecidos habían recibido radioterapia complementaria, aunque también los del grupo control al tratarse de estadios muy avanzados<sup>30</sup>.

En nuestro trabajo resaltamos la no desdeñable incidencia de MD, que además consideramos un valor subestimado pues buen número de ellas no se han incluido al no estar bien documentadas. La principal dificultad es diferenciar si se trata de una MD o de un STP en asiento pulmonar, siendo más fácil el diagnóstico si la MD es ósea o en partes blandas<sup>31,32</sup>. Se debería realizar el diagnóstico precoz en los pacientes con mayor riesgo (tumores faríngeos, estadios III-IV, N+), mediante técnicas de imagen (Rx, TAC, RNM, PET)<sup>33</sup>, con el fin de que sea posible realizar no sólo tratamientos paliativos, que mejoren la calidad de vida, sino también curativos. Así como ensayos clínicos y de investigación.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado en parte por el FIS (P92-0831).



## Referencias

- Ferlito A, Shaha AR, Silver CE, Rinaldo A, Mordir V. Incidence and sites of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:202-7.
- Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofly S, Perez CA. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2001;111:1079-87.
- Johnson JT. Proposal of standardization on screening test for detection of distant metastases from head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:256-8.
- Quar M, León X, Orús C, Recher K, Gras JR. Análisis de 2500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:201-5.
- Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004;31:726-33.
- Leon X, Quar M, Orús C, del Prado M, Lopez M. Distant metastases in head and neck cancer patients who achieved loco-regional control. *Head Neck* 2000;22:680-6.
- Yucel OT, Yilmaz T, Ural O, Turan E. Distant metastases in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:285-8.
- Spector GJ. Distant metastases from laryngeal and hypopharyngeal cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:224-8.
- Mitsuo JM, Patel SC, Singh B, Wong RJ, Boyle JO, Kraus DH, et al. Clinical nodal stage is an independently significant predictor of distant failure in patients with squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2005; 115:1813-7.
- Labeix Zamarrón MT, Galve Royo E, Martínez Sabido J, Laguna Pérez M. Distant metastases in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2001;52:307-11.
- Kowalski LJ, Carvalho AL, Martins Fariante AW, Magrin J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41:534-41.
- Goodwin WJ. Distant metastases from oropharyngeal cancer. *ORL J Relat Spec* 2001;63:222-3.
- Brakhuus BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005;15:113-20.
- Wedman J, Balm AJ, Hart AA, Leffus BM, Hilgers FJ, Geogor RT, et al. Value of resection of pulmonary metastases in head and neck cancer patients. *Head Neck* 1996;18: 311-6.
- Gerden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. *Oral Oncol* 2003;99:207-12.
- Osaki T, Yoneda K, Yamamoto T, Kimura T, Matsuoka H, Sakai H, Ryoike K. Clinical investigation on pulmonary metastasis of head and neck carcinomas. *Oncology* 2000;99:196-203.
- Al-Othman MO, Morris CG, Hinerman RW, Arndar RJ, Mendenhall WM. Distant metastases after definitive radiotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 2003;25:628-33.
- Leong PP, Reznik B, Koch WM, Reed A, Eisold D, Lee DJ, et al. Distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:672-7.
- Pietropoli MP, Dammor JA, Vermeert AJ. Bone metastases from squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Surg Oncol* 2000;75:136-41.
- Brouwer J, de Bree K, Hoekstra OS, Goldring RP, Langendijk JA, Costello J, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is chest computed tomography sufficient? *Laryngoscope* 2005;115:1813-7.
- Goerres GW, Schmid DT, Bandhauer F, Huguonin PU, von Schultheis GK, Schmid S, Stoeckli SJ. Positron emission tomography in the early follow-up of advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130:105-9.

## Segundos tumores primarios en el cáncer escamoso de cabeza y cuello

C. A. Álvarez Marcos<sup>1</sup>, J. L. Llorente Pendás<sup>2</sup>, V. Franco Gutiérrez<sup>2</sup>, M. A. J. A. Hermesen<sup>1</sup>,  
M. P. Cuesta Albalad<sup>1</sup>, H. Fernández Espina<sup>1</sup>, C. Suárez Nieto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Valle del Nalón, Riado-Lasgros. <sup>2</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

**Resumen:** *Introducción:* El desarrollo de un segundo tumor primario (STP) en el cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) presenta elevada mortalidad y condiciona la decisión terapéutica. *Objetivo:* Describir las características clínicas de los STP y determinar su implicación en la supervivencia. *Materiales y métodos:* Revisión de 633 pacientes con CECC entre 1984-2004 describiendo las principales características de los STP. *Resultados:* Se observan en el 11% de los CECC. Los tumores índice que se asocian más a un STP son los de laringe supraglótica (21%) y cavidad oral (16%). Los STP ocurren sobre todo en el área de cabeza y cuello (47%), pulmón (32%) y esófago (11%). Tienen gran impacto en la supervivencia de los pacientes con CECC, reduciéndola en un 30% (23% versus 53% en el grupo control). *Conclusiones:* Debido a la alta incidencia de STP es necesario profundizar en su estudio para realizar una prevención adecuada y un tratamiento eficaz.

**Palabras clave:** Cáncer de cabeza y cuello. Campo de cancerización. Segundos tumores primarios.

### Second primary tumors in head and neck cancer

**Abstract:** *Introduction:* The development of second primary tumors (SPT) in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has become an increasingly important factor in clinical treatment decisions. *Purpose:* To define favourable clinical characteristics for overall survival, in patients with SP head and neck cancer. *Material and method:* Records of 633 patients with SCC treated from 1984 to 2004 were reviewed to describe clinical characteristics of the SPT. *Results:* The overall incidence of SPT was 11%. The incidence of the index tumors was as follows: supraglottic cancer 21% and oral

cancer 16%. The most common SPT occurred in head and neck area in 47%, lung in 32% and esophagus in 11%. Second primary was associated with a poor 5 years survival in patients with HN-SCC (23 versus 53% in control group). *Conclusion:* Because of the high rate of second primary tumors, protocols including chemoprophylaxis should be investigated. Prevention and early detection are indicated.

**Keywords:** Head and neck cancer. Field cancerization. Second primary tumors.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) es una patología que en nuestro medio presenta una incidencia de 40-42 casos/100.000 h/año para varones y una mortalidad aproximada de 15 casos/100.000 h/año. Aunque se han realizado importantes avances en su diagnóstico precoz y tratamiento, la supervivencia no ha experimentado mejoras sustanciales en los últimos años debido a que muchos pacientes siguen diagnosticándose en estadios avanzados. El control local de la enfermedad ha mejorado y las recidivas locales han disminuido al realizarse resecciones más seguras, debido a la introducción de nuevas técnicas reconstructivas. Sin embargo, los segundos tumores primarios (STP) y las metástasis a distancia (MD) se han incrementando de manera inversa al descenso de las recidivas locales<sup>1,2</sup>. En la actualidad, el número de STP es muy elevado (5-30%), siendo la principal causa de mortalidad en los pacientes con CECC en estadios I y II<sup>3</sup>. El diagnóstico de un STP es desalentador, tanto para el paciente como para el médico, como tras superar un tratamiento en ocasiones complejo, obteniendo un control local adecuado del primer tumor (PT) o tumor índice, ve como se frustran sus expectativas de vida, complicando sobremanera las alternativas terapéuticas<sup>4</sup>.

El propósito de este estudio es recopilar las principales características clínicas de los STP y determinar su implicación en la supervivencia.

Correspondencia: César Antonio Álvarez Marcos.  
Los Alendras 19, 33013 Oviedo (Asturias).  
E-mail: alvarezmarcos@telefonos.net  
Fecha de recepción: 13-2-2006  
Fecha de aceptación: 8-10-2006

## MATERIAL Y MÉTODOS

## Diseño y sujetos de estudio

En nuestro diseño incluíamos a los pacientes con un STP con un diagnóstico clínico, corroborado con pruebas de imagen (Rx, TAC, RNM) o histopatología, excluyendo los casos dudosos o insuficientemente documentados. El diagnóstico de STP debe cumplir los criterios clínico-patológicos establecidos por Warren y Gates<sup>1</sup>.

Realizamos un estudio retrospectivo en el periodo 1984-2004 utilizando la base de datos oncológica de nuestro hospital (DBASE con 76 campos). En ese tiempo tenemos registrados 633 pacientes con el diagnóstico de CECC. En esa muestra inicial hay registrados 70 pacientes con STP que se ajustan al diseño establecido. Al mismo tiempo, para valorar el impacto que supone en la supervivencia la aparición de un STP, se estableció otra muestra control de 70 pacientes con CECC de la misma edad, localización y estadio, pero sin STP, elegidos aleatoriamente en la misma base de datos.

Las variables epidemiológicas y clínico-patológicas que se valoraron fueron incidencia anual y global, localización, asociaciones y estadio TNM del PT, histopatología (PT, STP), temporalidad, tratamiento y supervivencia.

En los STP se siguió la clasificación temporal de simultáneos a la vez que el PT, sincrónico: menos de 6 meses entre ambos y metacrónico: más de 6 meses.

## Estadío estadístico

Utilizamos el programa SPSS 11.0 con un nivel de significación de  $p \leq 0,05$ . Para el análisis uní y bivariable se compararon las medias independientes, estimando la supervivencia con curvas de Kaplan Meier.

## RESULTADOS

Los STP se desarrollan en el 11% del total de los pacientes con CECC de nuestra serie. El diagnóstico de STP osciló en torno a 1-3% anual del porcentaje total en el seguimiento del PT (Tabla 1). Se diagnostican en torno a 4-6 STP por año, representando el 10-24% de los diagnósticos oncológicos nuevos anuales, con tendencia a aumentar este porcentaje (Figura 1).

En la tabla 2 se muestran la localización y asociaciones de los STP y en la figura 2 los estadios TNM (correspondientes al PT). Los STP se originan sobre todo en el área de cabeza y cuello (47%), seguidos por el pulmón (32%). Los estadios I-II predominaban en el PT (54%), así como la ausencia de metástasis ganglionares (63%). No hay datos suficientes ni fidedignos para establecer el TNM del STP.

La localización del PT que más se asocia a un STP es la laringe supraglótica (21%). El STP se originaba sobre todo en el pulmón (32%), seguida por la cavidad oral (20%), aunque si sumamos todas las localizaciones de cabeza y cuello se alcanza el 47%.

Tabla 1. Frecuencia de aparición, según el tiempo de seguimiento, de los STP (n=70) en los pacientes con CECC (n=633)

Años desde PT	STP (n=70) N° (%)
1	18 (2,9)
2	13 (2)
3	9 (1,4)
4	6 (1)
5	6 (1)
6	6 (1)
7	6 (1)
>7	6 (1)

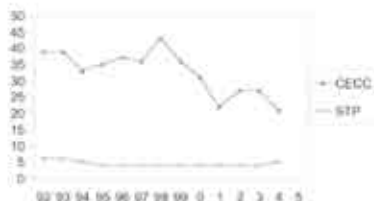


Figura 1. Incidencia anual del CECC y STP en una población aproximada de 100.000 habitantes durante el periodo 1982-2004.

Los STP se asocian con recidivas (14%) y metástasis a distancia (12%), siendo habituales los STP múltiples (11,5%).

En la histopatología del PT predominaba el carcinoma escamoso con diferentes grados de diferenciación (bien: 51%, moderado: 40% y poco: 6%). En el STP no se pudo estudiar en todos los casos (51 casos, 73%), siendo la mayoría carcinomas escamosos.

En cuanto al tiempo de aparición de los STP encontramos que la mayor parte son metacrónicos (87%), seguidos por los sincrónicos (9%) y simultáneos (4%), con una media para su diagnóstico de 40 meses (rango 0-156 meses). Llaman la atención el menor número de STP en la laringe en relación a la laringe, aunque cuando aparecen lo hacen en tiempo similar al total del grupo (43 meses).

El tipo de tratamiento realizado con fines curativos estuvo en relación con la localización tumoral. Así en los STP del área de cabeza y cuello predominó el tratamiento quirúrgico (76%) y la radioterapia (12%), reduciéndose en el pulmón al 43% para ambos tratamientos y bajando en el esófago al 20%. En estas dos últimas localizaciones predominaban los tratamientos paliativos (57 y 80%).

La supervivencia también presentaba mucha variación con respecto a la localización. Así, obtenemos una supervivencia global del 30% a los 5 años, que asciende al 39% en los STP de cabeza y cuello y llega al 61% cuando son de cavidad oral. En los tumores de pulmón se reduce al 10% y en los de esófago ningún paciente sobrevivió. El tiempo medio de supervivencia en los pacientes fallecidos fue 11 meses

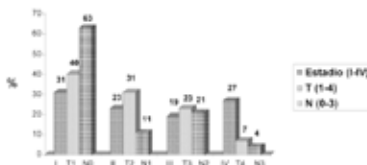
C. A. ÁLVAREZ MARCOS ET AL.

**Tabla 2.** Localización y asociaciones de los STP con el PT. El número final corresponde al total de tumores, incluidas las localizaciones múltiples

PT/STP	Pulmón	C. oral	Esófago	Laringe	Orofaringe	Hipofaringe	Estómago	Otros	Total PT**
Supraglotis	9	8	1	4	4	1	-	2	29 (21%)
Cavidad oral	1	2	1	1	1	1	-	-	7 (6%)
Glotis	12	2	2	4	2	-	2	2	26 (13%)
Orofaringe	3	2	4	-	1	2	1	2	15 (11%)
Hipofaringe	3	3	2	-	1	-	-	1	10 (9%)
Hipofaringe	22	25	36	25	5	89	21	14	
Total localización STP	28 (32%)	17 (20%)	10 (11%)	9 (10%)	9 (10%)	4 (5%)	3 (3%)	7 (8%)	87*

\*8 localizaciones múltiples: 1 (5 STP), 2 (4 STP), 2 (3 STP), 3 (2 STP).

\*\*El % se calcula sobre el total de tumores de esa localización en la base de datos.

**Figura 2.** Estadificación (estado, T y N) del tumor índice en los pacientes que desarrollaron un STP. Se especifica el porcentaje.

(rango 1-51), desde el diagnóstico del STP. El impacto que supuso en la supervivencia la aparición de un STP mostró valores muy significativos (25% a los 5 años) con respecto a la muestra control de pacientes con CECC, pero sin segundo tumor (53% a los 5 años) (Figura 3).

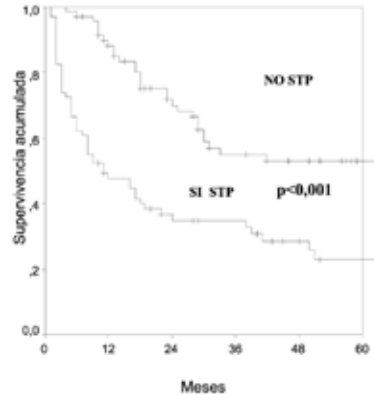
El antecedente de radioterapia previa al desarrollo de STP se constató en el 72% de los casos. En la serie control sólo observamos este tratamiento en el 48%, aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.

## DISCUSIÓN

Partimos de una base de datos oncológica que en general se ajusta a las características clínicas y de supervivencia de los CECC en nuestro medio, donde predominan los tumores de laringe supraglótica y faríngea<sup>10</sup>.

En cuanto a la frecuencia de STP (11%) nuestros resultados son similares a los de otros autores<sup>3</sup>, que también diferencian entre simultáneos, sincrónicos y metacrónicos, pero nuestro número de metacrónicos (87%) es muy superior al de otras series<sup>3</sup>. Aunque la mayoría de los STP se diagnostican en los tres primeros años del seguimiento del PT, sólo el 13% lo hacen en el primer semestre, acumulándose el resto entre el segundo semestre y los años siguientes (Tabla 1).

La suma de todas las localizaciones de cabeza y cuello (47%) es superior a la localización pulmonar (32%), como también han observado otros autores<sup>10,15</sup>. La localización del PT que más se asocia con STP es la laringe supraglótica, se-

**Figura 3.** Impacto en la supervivencia de los STP, en relación a la serie control de CECC sin esta evolución.

guida por la cavidad oral y la laringe glótica, como también ha sido publicado<sup>10,15</sup>. En el conjunto de la laringe es especialmente notable la asociación con un STP en pulmón (21 de 28) y cavidad oral (10 de 17), mientras que los tumores faríngeos en conjunto lo hacen con la mayoría de los STP de esófago (6 de 10) (Tabla 2)<sup>10</sup>.

Los PT de laringe tenían una incidencia de STP superior a los de faríngeo. Esto se interpreta en relación al peor pronóstico y mayor mortalidad que tienen estos últimos, tanto por recidivas como por metástasis a distancia, que suelen ocurrir antes de la aparición del STP. No obstante, otros autores presentan cifras similares de incidencia entre ambas localizaciones<sup>3</sup>.

En la clasificación TNM del PT destacan los estadios I y II y la categoría N0 (63%), en contraste con lo observado en los CECC en general que suelen presentar estadios más avanzados y mayor número de metástasis ganglionares<sup>10,16,17</sup>. No fue posible obtener el estadio TNM de la mayoría de los

STP, pues las distorsiones anatómicas de tratamientos previos añaden complejidad a la estadificación, tendiendo a omitirse o a realizar sólo en tumores muy pequeños o alejados del PT, sesgando mucho este dato. Otros autores sí han visto que el STP tiene un estadio más avanzado que el PT<sup>20</sup>. En la histopatología del PT predominan los carcinomas escamosos bien diferenciados (51%), al contrario de lo que ocurre en las metástasis a distancia donde se incrementan mucho los poco diferenciados (38%), siendo en ambos similares los moderadamente diferenciados (40%) (datos aún no publicados). En el STP también predominan los carcinomas escamosos<sup>27</sup>.

Encontramos que el desarrollo del STP ocurrió sobre todo en los tres primeros años desde el diagnóstico del PT, manteniéndose constante hasta el séptimo año (Tabla 1). Esto no está en desacuerdo al riesgo constante en torno al 4-7% de padecer un STP que observan otros autores durante seguimientos largos, teniendo en cuenta que en estos estudios se hace un cálculo corregido de la incidencia anual según el número de pacientes<sup>27</sup>. Para nosotros es crucial el primer año de seguimiento pues ahí concurren además la mayoría de las recidivas y MD, complicando el diagnóstico correcto. La asociación entre STP y recidivas es un hecho relativamente frecuente, radicando la confusión principal en el caso de los segundos tumores de campo que surgen en la misma zona del PT, y que no son verdaderas recidivas, aunque muestran características genéticas comunes<sup>28</sup>. La aparición de múltiples STP es también un hecho habitual, contabilizándose la mayoría en el área de cabeza y cuello, además de pulmón, esófago y otras localizaciones. Desde el punto de vista terapéutico la cirugía y la radioterapia son los procedimientos más aceptados, sobre todo en los STP de cabeza y cuello (39%), y particularmente en los localizados en la cavidad oral (61%)<sup>29</sup>. En el pulmón la supervivencia es mucho menor, siempre en relación con la posibilidad de realizar cirugía. Las otras localizaciones tienen supervivencia muy baja, siendo especialmente desfavorable en los tumores esofágicos<sup>30</sup>.

No fue posible establecer la persistencia de hábitos tóxicos entre el PT y el desarrollo del STP, aunque hay autores que sí la encuentran de forma manifiesta, incluso con relación al pronóstico<sup>21,29</sup>.

Debemos interpretar con cautela los datos de radioterapia previa al STP, pues aunque son llamativos no son estadísticamente significativos. El concepto clásico de tumor radioinducido incluye a sarcomas con un intervalo de años desde la radioterapia. No obstante, no se puede descartar la hipótesis de tumores radioinducidos sobre un epitelio previamente alterado, sin manifestaciones fenotípicas, enlazando con el concepto de segundo tumor de campo<sup>28,32,33</sup>. La muestra que desarrolló STP había recibido radioterapia previa en un porcentaje muy superior al que se suele administrar en los estadios tumorales I y II, como comprobamos en la muestra control, y está bien establecido en la mayoría de los protocolos<sup>33,34</sup>.

El impacto que se supone en la supervivencia un STP, que siempre se había considerado muy negativo, queda re-

flejado por nosotros en la figura 3, aunque depende mucho de su localización. Es posible que la radioterapia influya negativamente en la supervivencia, pues con ella los diagnósticos del STP suelen ser más tardíos, además de aumentar la morbilidad de la cirugía. Aunque también podría tener un efecto beneficioso al eliminar tumores sincrónicos o simultáneos precoces. Por tanto, es muy difícil establecer esta relación de forma directa, estando condicionada a otros factores asociados<sup>31,32</sup>.

Como conclusión a nuestro trabajo señalamos la alta incidencia de STP en los CECC de nuestra serie y el impacto negativo que tienen en la supervivencia (un 30% peor a los 5 años). Aunque se asocian más a PT supraglóticos de estadios I-II y N<sub>0</sub>, siendo el STP sobre todo del área de cabeza y cuello y pulmón, en ocasiones se confunden con una recidiva si asientan en la misma zona del PT, o con una metástasis si están en órganos distintos en la VAS, especialmente en pulmón. Para esclarecer esta circunstancia puede contribuir el estudio genético del ADN tumoral, que sería igual al tumor inicial en recidivas y metástasis, y parecido o diferente si se tratase de un segundo tumor de campo o STP<sup>32,33</sup>. Este planteamiento que parece bastante sólido, tiene la limitación de la heterogeneidad genética observada en muchos de estos tumores.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado por la financiación del FIS (PI02-0831).

## Referencias

- Lanson TJ, Adams GL, Fatah HA. Survival statistics for multiple primaries in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;103:14-24.
- Vikram B. Changing patterns of failure in advanced head and neck cancer. *Arch Otolaryngol* 1984;110:564-5.
- Yamamoto E, Shibuya H, Yoshimura R, Miura M. Site-specific dependency of second primary cancer in early stage head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2002;94:2007-14.
- Spector JG, Sessions DG, Haughey BH, Chao KS, Simpson J, El Mofly S, et al. Delayed regional metastases, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope* 2001;111:1079-87.
- Nikolaou AG, Markou C, Petridis DG, Daniilidis I. Second primary neoplasms in patients with laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2005;110:58-64.
- Sood S, Bradley P, Quraishi MS. Second primary tumours in squamous cell carcinoma of the head and neck: incidence, site, location, and prevention. *Curr Opin Otolaryngol* 2006;8:87-90.
- Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumours: a survey of the literature and a statistical study. *Am J Cancer* 1932;16:1358-1414.
- Quer M, León X, Orús C, Rócher K, Grau JR. Análisis de 2500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. *Acta Otorinolaringol Esp* 2001;52:201-5.
- Sturgis EM, Wei Q, Spitz MR. Descriptive epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol* 2004;31:28-33.
- Dhooge II, De Vos M, Van Cauwenbergh P. Multiple primary malignant tumors in patients with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. *Laryngoscope* 1998;108:250-256.
- León X, Quer M, Díez S, Orús C, Lopez-Pousa A, Bargaes J. Second

C. A. ÁLVAREZ MARCOS ET AL.

- Neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 1999;21:204-210.
12. Herranz González-Rotas J, Sarandeses García A, Martínez Vidal J, Vázquez Barro C, López Aranda M. Segundos tumores primarios en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello. *Acta Otorinolaringol Esp* 2000;51:149-153.
  13. Leon X, Del Prado Vasegas M, Orus C, Kolanetzak K, García J, Quer M. Metachronous second primary tumours in the aerodigestive tract in patients with early stage head and neck squamous cell carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005;262:905-909.
  14. Silvestri F, Bussani R, Cosatti C, Bosatra A. High relative risk of a second pulmonary cancer in patients affected by laryngeal cancer: differences by specific site of occurrence and lung cancer histotype. *Laryngoscope* 1994;104:222-25.
  15. García Cantos MD, De Mier Morales MM, Delgado Balafó D, Márquez García-Salazar MM, Jaén Olazolo J, Porras Alonso E, et al. Múltiples primarios en vías aerodigestivas superiores, esófago y pulmón. *Acta Otorinolaringol Esp* 2000;51:154-159.
  16. Di Martino E, Scilhaus B, Hausmann R, Minkenberg R, Lohmann M, Westholm M. Survival in second primary malignancies of patient with head and neck cancer. *J Laryngol Otol* 2002;116:831-36.
  17. Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Hellwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;75:1343-1353.
  18. Brakakis BJM, Brakenhoff RH, Leemans CR. Second field tumors: a new opportunity for cancer prevention. *The Oncologist* 2005;10:487-501. [www.TheOncologist.com](http://www.TheOncologist.com)
  19. Brakakis BJM, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002;24:198-206.
  20. Lin K, Patel SG, Chu PY, JMS Matsuo, Singh B, Wong RJ, et al. Second primary malignancy of the aerodigestive tract in patients treated for cancer of the oral cavity and larynx. *Head Neck* 2005;27:1042-8.
  21. Khuri FR, Kim ES, Lee JJ, Wirtz RJ, Benner SE, Lippman SM, et al. The impact of smoking status, disease stage, and tumor recurrence in the head and neck retinoid chemoprevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:823-9.
  22. Dolan R, Vaughan C, Fuleihan N. Metachronous cancer: prognostic factors including prior irradiation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998;119:619-23.
  23. Do KA, Johnson MM, Lee JJ, Wu XF, Dong Q, Hong WK, et al. Longitudinal study of smoking patterns in relation to the development of smoking-related secondary primary tumors in patients with upper aerodigestive tract malignancies. *Cancer* 2004;101:2837-42.
  24. Mc Guire WJ, Ray M. Second laryngeal cancers in previously treated larynges. *Laryngoscope* 1999;109:1436-8.
  25. Fujita M, Rudolph MS, Canady DJ, Patel F, Machray M, Pittard MQ, et al. Second malignant neoplasia in patients with T1 cancer treated with radiation. *Laryngoscope* 1998;108:1853-55.
  26. Panosetti A, Lubinski B, Marnette G, Richard JM. Multiple synchronous and metachronous cancers of the upper aerodigestive tract: a nine-year study. *Laryngoscope* 99;99:1267-73.
  27. Brakakis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Expanding fields of genetically altered cells in head and neck squamous carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2005;15:113-20.
  28. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Van Der Wal JE, Snow GB, Leemans CR, et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002;161:1051-60.

## Recidivas en el cáncer escamoso de cabeza y cuello

Charo Antonio Álvarez Martínez<sup>1</sup>, José Luis Llorente Jiménda<sup>2</sup>, Virginia Franco Calabrero<sup>3</sup>, Humberto Fernández Espasa<sup>4</sup>,

María Álvaro Guerrero<sup>5</sup>, Carlos Suárez Nieto<sup>6</sup> y María Plummer<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Valle del Nalón, Riado-Langreo, Asturias, España.

<sup>2</sup>Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias, España.

<sup>3</sup>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Oviedo, Asturias, España.

**Introducción:** Las recidivas tumorales (RT) causan elevada mortalidad en los pacientes con cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) y complican mucho la actitud terapéutica.

**Objetivo:** Describir los aspectos clínicos de las RT y su implicación en la supervivencia.

**Pacientes y métodos:** Se revisa a 652 pacientes con CECC y se recoge las características clínicas de las RT observadas.

**Resultados:** Las RT se presentaron en el 19,9% (130 pacientes) de nuestra serie de CECC. Las localizaciones más frecuentes son mesofaringe (32%), hipofaringe (24%) y cavidad oral (21%). El 70% de las RT son de carácter locoregional, el 83% locales, y el 7% entomiales. La aparición de una RT reduce al 15% la supervivencia general de los pacientes con CECC, es mayor en la laringe glótica (38%) y la supraglótica (27%), y baja al 2-4% en mesofaringe e hipofaringe.

**Conclusiones:** Las RT son más frecuentes en tumores laringeos y de tipo locoregional. El pronóstico en esta localización es muy malo y el tratamiento de rescate apenas modifica la supervivencia.

**Palabras clave:** Cáncer de cabeza y cuello. Carcinoma escamoso. Recidivas locales. Recidivas locoregionales. Supervivencia.

### Tumour Recurrence in Squamous Head and Neck Cancer

**Introduction:** For most patients with squamous head and neck cancer (HN-SCC), locoregional tumour recurrence (TR) carries an extremely poor prognosis and is therapeutically challenging.

**Objective:** To define the clinical aspects of TR and their implications on the survival in patients with HN-SCC.

**Patients and method:** The clinical management and the outcome of 652 patients with HN-SCC were reviewed.

**Results:** The overall incidence of TR in this series of HN-SCC was 19.9% (n=130). The most frequent locations of the primary tumours were oropharynx (32%), hypopharynx (24%), and oral cavity (21%). The rates of recurrence were locoregional 70%, local 83% and distant 7%. The appearance of a TR reduces the overall survival of patients with HN-SCC to 15%. Survival is better in glottic (38%) and supraglottic (27%), and worse in oro-hypopharynx tumours (2-4%).

**Conclusions:** RT are more frequent in pharyngeal tumours, especially locoregional recurrences. Patients with recurrence in pharynx were definitely associated with poor prognosis and in these cases salvage surgery seems not to improve survival rates.

**Key words:** Head and neck cancer. Squamous cell carcinoma. Local recurrence. Locoregional recurrence. Survival.

### INTRODUCCIÓN

El cáncer escamoso de cabeza y cuello (CECC) presenta una incidencia de 40-42 casos/100.000 habitantes/año

en varones y una mortalidad aproximada de 15 casos/100.000/año<sup>1</sup>. En los últimos años se han realizado importantes avances en su diagnóstico y tratamiento, pero la supervivencia no ha experimentado los cambios notoriables que cabría esperar por el esfuerzo realizado, pues se sigue diagnosticando a muchos pacientes en estadios avanzados<sup>2</sup>. El control local de la enfermedad ha mejorado al introducirse nuevas técnicas quirúrgicas reconstructivas que permiten hacer resecciones más amplias. Sin embargo, la mortalidad sigue siendo alta, por un lado a causa de las recidivas tumorales (RT) y, por otro, al desarrollo de segundos tumores primarios (STP) y metástasis a distancia

Este estudio ha recibido financiación del IIS (1982/085).

Correspondencia: Dr. C. A. Álvarez Martínez.  
 Luz Álvarez, 14, 33013 Oviedo, Asturias, España.  
 Correo electrónico: alvarezmar@iisbio.org

Recibido el 15-01-2018.

Aceptado para su publicación el 11-05-2017.

198 - Acta Otorrinolaringol Esp. 2017;136(1):193-63

(MD)<sup>14</sup>. Aunque la incidencia actual de las RT parece que ha disminuido ligeramente respecto a etapas anteriores, su aparición sigue siendo frecuente y es la principal causa de mortalidad en los pacientes con CECC avanzado<sup>5</sup>. El diagnóstico de una RT puede sorprender al paciente si ha estado extremando los controles clínicos durante el seguimiento del paciente. El planeamiento terapéutico está condicionado por diferentes circunstancias (edad, estado general, extensión del tumor), pero es la cirugía de rescate el procedimiento base sobre el que se apoya el resto de las alternativas. Esta cirugía es compleja y con muchas complicaciones, por lo que debería tener unas indicaciones precisas<sup>15</sup>.

El propósito de este estudio es recopilar las principales características clínicas de las RT y determinar su impacto en la supervivencia.

## PACIENTES Y MÉTODO

Realizamos un estudio retrospectivo durante el periodo 1984-2004 usando la base de datos oncológica de nuestro hospital (IBase, con 76 campos). En ese intervalo tenemos recogidos a 692 pacientes con diagnóstico inicial de CECC con las siguientes localizaciones: 190 de faringe glótica (incluidos 23 transglóticos), 127 de faringe supraglótica, 129 de mesofaringe, 97 de hipofaringe, 41 de cáncro, 34 de cavidad oral y 34 de metástasis de primarios desconocidos. Se excluyó los tumores originados en el tiroides, las glándulas salivales y las fosas y los senos paranasales, por no disponer en la base de datos de un número suficiente de casos con esa especie histopatológica (solo 2 casos en fosa nasal). El tratamiento realizado con fin curativo en esta serie consistió en cirugía (241 pacientes, 37%), radioterapia (85 pacientes, 13%), cirugía + radioterapia (294 pacientes, 45%) y quimioterapia sola o asociada a radioterapia o cirugía (13 pacientes, 2%). El resto de la serie (19 pacientes, 3%) fue rechazado o refuso tratamiento curativo. El seguimiento mínimo de la serie fue de 24 meses (hasta final de 2006), con 25 (3,8%) casos perdidos, mientras que 358 (51,9%) pacientes seguían vivos y libres de tumor.

De esa serie inicial, seleccionamos una muestra de CECC que desarrollaron una RT en las localizaciones citadas, con un seguimiento mínimo de 24 meses. Se confirmó el diagnóstico de RT con endoscopia, pruebas de imagen (radiografía, tomografía computarizada [TC], resonancia magnética [RM]), punción-aspiración con aguja fina (PAAF) o histopatología, y se excluyó los casos dudosos, insuficientemente documentados y perdidos. De este diagnóstico tratamos de elucidar también los STP originados en el mismo campo, aplicando los criterios clinicopatológicos establecidos por Warren et al.<sup>16</sup>

Para valorar el impacto que supuso en la supervivencia la aparición de una RT, se estableció también una muestra control obtenida de la misma serie inicial de CECC, con similares número de pacientes, localización y estadio, pero sin RT.

Las variables epidemiológicas y clinicopatológicas valoradas fueron incidencia anual y total, localización, asociaciones y estadio TNM (UICC, 2002)<sup>17</sup> del tumor inicial, his-

topatología (diferenciación, bordes de invasión) y tiempo libre de enfermedad o hasta la recidiva. La RT se clasificó, de acuerdo con otros autores, en local (misma localización del tumor inicial), locoregional (zonas adyacentes, profundas o con extensión cervical afectada) y del traqueostoma (se extiende a ese nivel). También se estudiaron algunos aspectos relacionados con el diagnóstico de la RT tales como si el paciente acudió espontáneamente o se detectó en una revisión programada, cuál fue el motivo de sospecha, cómo se hizo el diagnóstico o cuánto tiempo había pasado desde la última revisión normal. Por último, se determinó la eficacia de los tratamientos realizados inicialmente (cirugía, radioterapia o combinación) y la supervivencia final de los pacientes.

## Análisis estadístico

Usamos el programa SPSS® 11.0 (SPSS Inc., Illinois, Estados Unidos). Las variables cualitativas se expresaron como porcentaje y se compararon mediante la prueba de la  $\chi^2$ . La supervivencia se analizó mediante las curvas de Kaplan-Meier, utilizando la prueba de rango log-rank. El umbral de significación establecido fue  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Se detecta entre 7 y 10 RT/año, lo que representa un 13-39% de los diagnósticos oncológicos nuevos, con cierta tendencia a disminuir en los últimos años (fig. 1). Se diagnosticó a 130 (19,9%) de todos los pacientes de la serie de CECC seleccionados de nuestra base de datos. La frecuencia de RT se sitúa en torno al 2-7%, sobre todo en los primeros 2 años del seguimiento. La mayor parte (64%) ocurre en el primero, para reducirse de forma progresiva en el segundo, con valores sólo ocasionales más tarde (tabla I).

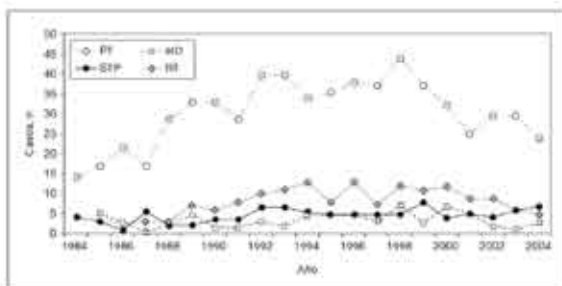
El tiempo medio de aparición de la RT en los tumores faringeos fue de 15 meses (12,7 para los supraglóticos y 10,3 para los glóticos), que en los faringeos se reduce a 11 meses (10,4 para la mesofaringe y 12 para la hipofaringe).

El mayor número de RT surge en faringe (mesofaringe e hipofaringe) (84 pacientes, 49,2%) y faringe (glótica y supraglótica) (45; 34,6%), y las demás ubicaciones son menos

Tabla I. Frecuencia de aparición de las lesiones tumorales por momentos de seguimiento en la serie de 692 pacientes con CECC.

Momentos desde el tumor inicial	Recidiva total, n (%)
0-6	46 (7)
7-12	56 (8,1)
13-18	21 (3,2)
19-24	13 (2)
25-30	4 (0,6)
30-36	3 (0,5)
37-42	3 (0,5)
43-60	2 (0,3)





**Figura 1.** Frecuencia anual de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello de nuestra serie (período 1984-2004). Se indican los primeros tumores (PT), segundos tumores primarios (STP), metástasis a distancia (MD) y los recidivos tumorales (MI).

**Tabla II.** Tipo y localización de las recidivas tumorales en la serie de 692 carcinomas escamosos de cabeza y cuello

Tumor inicial	Supraglotis	Gloso	Mesofaringe	Hipofaringe	Carotidiana	Cáncer	ACFPO	Distal
Recidiva tumoral								
Local	5	16	17	6	5	6	-	50 (42,5%)
Locoregional	11	5	23	17	2	1	7	66 (30,7%)
Distancia	2	0	1	-	-	-	-	6 (7%)
<b>Total localización</b>	<b>18 (14,2%)</b>	<b>27 (14,2%)</b>	<b>41 (31,8%)</b>	<b>23 (23,7%)</b>	<b>7 (2,6%)</b>	<b>7 (7%)</b>	<b>7 (23,6%)</b>	<b>130</b>

ACFPO: metástasis cervical de primer diagnóstico.

Los tumores locales incluyen las supraglóticas. Dos recidivas estomacales presentaron también una recidiva local en la localización.

El porcentaje se calcula sobre el total de los tumores de esa localización en la base de datos.

**Tabla III.** Clasificación y localización de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello que recidivaron

Localización	Estrato				
	I	II	III	IV	Distal
Supraglótica	3	3	5	7	16
Gloso	11	5	5	5	27
Mesofaringe	2	4	11	24	41
Hipofaringe	-	3	10	11	20
Cavidad oral	-	2	2	5	7
Cáncer	-	-	-	-	7
Primario desconocido	-	-	-	-	1
<b>Total</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>33</b>	<b>64</b>	<b>130</b>
	(12,3%)	(13%)	(25,3%)	(48,2%)	

frecuentes (tabla II). La localización del tumor inicial con más tendencia a recidivar es la mesofaringe (31,8%), seguida de hipofaringe (23,7%) y cavidad oral (20,6%).

Los estadios III-IV son predominantes en el tumor inicial (97 pacientes; 74,6%) (tabla III), así como la presencia de ganglios N+ (77,39%), de los que 21 (16%) eran N1; 39 (30%), N2 y 16 (14%), N3. No hay datos suficientes ni suficientes para establecer el TNM de la RT, aunque se las clasifi-

cificó en locoregional (50,7%), local (42,5%) y distal (7%) (tabla II). La recidiva local se observa más en tumores glóticos, glótico y cavidad oral, y la locoregional en mesofaringe, hipofaringe y supraglótica. Las recidivas en estomago aparecen sobre todo en tumores glóticos (tabla II). No obstante, no hay una relación estadísticamente significativa entre la recidiva local/localización del tumor inicial en la región y la recidiva locoregional/localización tumoral ( $\chi^2$ ,  $p = 0,117$ ). De las 9 recidivas distales, 4 fueron tras cirugía laringea parcial y 2 tras radioterapia radical. En las 3 restantes, el tumor inicial se trató mediante cirugía y radioterapia complementaria, y no se censuró la realización de traqueostomía previa en ningún caso (tabla II). Es frecuente la asociación de RT con STP (19 casos; 14,6%) y MD (12; 9,2%), aunque las recidivas múltiples simultáneas sólo se observaron en 2 tumores glóticos.

En cuanto al seguimiento, 62 (48%) pacientes con RT acudieron antes de la revisión programada, 47 (36%) en la fecha indicada y 21 (16%) fueron remitidos desde otro servicio, habitualmente radioterapia. La revisión previa a la sospecha de recidiva, considerada como normal, se realizó 1,2 meses antes (intervalo, 0,5-8 meses). La aparición de síntomas nuevos respecto a la última revisión se observó en 125 (96%) pacientes que desarrollaron RT, entre los que destacaron masa o inflamación cervical (54%), odinofagia (19%), algias cervicales o orofaríngeas (9%), disfonía (6%), dis-

nea (6%), linfoma (6%) y hemangioma (5%). Solo 5 (4%) pacientes estaban asintomáticos, 3 con recidivas locales en cavum y 2 en laringe glótica.

El diagnóstico de la RT tuvo 2 vertientes, por un lado el diagnóstico clínico realizado por endoscopia y estudios de imagen, usados en la mayoría de los pacientes sobre todo para obtener la biopsia y planificar el tratamiento. Las pruebas de imagen realizadas consistieron en 72 TC, 32 laringoscopios, 3 RM, junto con otros procedimientos menos usuales. Por otro, se basó en el diagnóstico citohistopatológico, realizado en 94 (72,3%) pacientes ambulatoriamente. En 11 (8,5%) pacientes fue preciso un abordaje quirúrgico para obtener muestras de tejido, mientras que en otros 12 (9,2%) se realizó una laringoscopia rígida para acceder a la zona tumoral. En los 13 (10%) pacientes restantes no se llegó a tomar biopsia o citología que confirmase la recidiva o ésta fue negativa, aunque tenían un diagnóstico por técnicas de imagen muy compatibles.

En el diagnóstico citohistopatológico debemos distinguir entre el tumor inicial y la RT. De los 130 pacientes que recidivaron se dispuso de un estudio histopatológico completo del tumor inicial (diferenciación, bordes, ganglios) en 108 (83%). Los 22 restantes fueron tratados inicialmente con radioterapia y sólo tenían la biopsia inicial. En todos los casos se trató de carcinomas escamosos con diferentes grados de diferenciación (bien, 35%; moderado, 47%; y poco, 13%). Los bordes de resección del tumor inicial estaban afectados en 30 (27,7%) pacientes. En los tumores laringeos había esta afectación en 13 (36%) pacientes (el 28% de los supraglóticos, el 38% de los glóticos); en los faríngeos, en 16 (27%), de forma similar en mesofaríngeo e hipofaríngeo, y en cavidad oral en sólo 1 (14%). En la muestra control sin RT se observó afectación de bordes en el 34%, y de los tumores laringeos, en el 32% (el 28% supraglótico y el 22% glótico); en los faríngeos, el 44% (el 44% de mesofaríngeo y el 43,5% de hipofaríngeo) y en la cavidad oral el 28,5%.

El estudio histopatológico de las RT se pudo realizar en 75 (37,7%) pacientes, mientras que en 42 (32,5%) se practicó PAAF (8 verdaderos positivos y 4 falsos negativos). En la PAAF consideramos el diagnóstico positivo o muy indicativo de carcinoma escamoso, aunque no se pudo determinar el grado de diferenciación.

En el tratamiento con fin curativo de la RT predominó la cirugía de rescate, sola (72 pacientes; 40%) o asociada a otro tratamiento (6, 3%), seguida por la radioterapia (16, 12%) y la quimioterapia (10; 8%). El tratamiento paliativo se indicó en 48 (39%) pacientes.

Hasta la finalización del estudio sobrevivieron libres de tumor 20 (15,4%) pacientes de toda la muestra con RT. La mayoría (95%) tuvo tratamiento quirúrgico único o asociado a radioterapia o quimioterapia, y se trató a los demás con radioterapia externa (1 caso) y braquiterapia (2 casos). La localización tumoral de los pacientes con RT que siguen vivos sin tumor después del tratamiento era la laringe glótica (11/20), la supraglótica (5/20), el cavum (2/20), la mesofaríngeo (1/20) y la hipofaríngeo (1/20).

De los pacientes con recidiva de cáncer laringeo, 7 con cáncer glótico tratados con cirugía parcial fueron rescata-

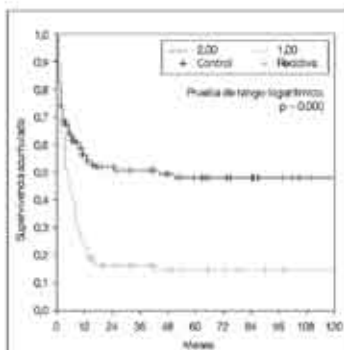


Figura 2. Impacto en la supervivencia de los pacientes con recidiva tumoral respecto a la muestra control de carcinomas escamosos de cabeza y cuello sin oca evolución.

dos con laringectomía total, y 5 de ellos están vivos y libres de tumor, otros 7 de igual localización, tratados con radioterapia radical, fueron rescatados también con laringectomía total, y también 5 permanecen vivos y libres de tumor; de 10 pacientes con RT de cáncer supraglótico tratados con laringectomía total, sobrevivieron 5.

Solo 2 pacientes con tumores de faringe sometidos a cirugía de rescate, de los 64 en los que se realizó, permanecen vivos sin tumor.

Los 3 casos restantes que sobrevivieron fueron tratados con radioterapia exclusiva, 1 con irradiación externa de la recidiva glótica y los otros 2 con braquiterapia en el cavum. Este último procedimiento se realizó en 3 pacientes, 2 de los cuales, como ya hemos indicado, siguen vivos.

El tiempo medio de supervivencia de los pacientes vivos sin tumor después de la RT es de 45 (intervalo, 8-84) meses, mientras que en los pacientes fallecidos se reduce a 6 (1-42) meses. La supervivencia también oscilaba con respecto a la localización y al tipo de recidiva. Así, era del 40,7% (11 de 27) en los tumores glóticos; el 27,5% (5 de 18) en los supraglóticos; el 28,5% (2 de 7) en el cavum; el 4% (1 de 23) en hipofaríngeo y sólo el 2% en mesofaríngeo (1 de 41). En los 20 pacientes que sobrevivieron a la RT, ésta era del tipo local en 19 y locoregional sólo en 1, no se observó supervivencia en las recidivas estables. Sobreviven 2 pacientes de los 19 que asociaban RT y STP y sólo 1 de 12 con RT y MT).

El impacto en la supervivencia por la aparición de una RT fue muy significativo a los 5 años con respecto a la muestra control (log-rank,  $p = 0,00$ ) (fig. 2). La mortalidad en el grupo con RT en todos los casos se debió a la progresión

de la enfermedad neoplásica. En el caso de la muestra control sin RT, la supervivencia fue del 50%, y las principales causas de mortalidad fueron las complicaciones postoperatorias (14,5%), los STP (12,8%; 17 de 25 pacientes con STP de la muestra control), las MD (12,8%; 17 de 17), las enfermedades intercurrentes (4,5%) y la persistencia tumoral (3,8%).

El antecedente de radioterapia previa al desarrollo de la RT se observó en 88 (68%) pacientes, mientras que en la muestra control este tratamiento se realizó en 29 (61%), sin diferencias significativas entre ambas muestras. En este grupo que recibió radioterapia antes de la recidiva, se administró como tratamiento radical en 23 (17,7%) casos, y en el resto fue complementaria. La indicación de la radioterapia radical se hizo sobre todo en los tumores glóticos (estadios I y II), y hubo RT en 7 (30%) de 26 pacientes con esta localización y este tipo de tratamiento recogidos en la serie inicial de 652 CECC. En esta misma serie inicial tenemos recogidos, además, otros 62 tumores glóticos en estadios I y II tratados exclusivamente con cirugía parcial, de los que recidivaron 9 (14,5%). Estas diferencias entre los tumores glóticos tratados con radioterapia radical y los tratados con cirugía no fueron significativas respecto al desarrollo de RT.

El resto de las indicaciones de radioterapia exclusiva o combinada con quimioterapia, mencionó aparte de los 7 tumores iniciales de cáncer que luego recidivaron, correspondían a 9 casos de tumores irresecables por su extensión o porque el paciente rechazó o fue rechazado para la intervención.

## DISCUSIÓN

Las RT influyen decisivamente en la supervivencia de los pacientes con CECC. A diferencia de los STP y las MD, sin un aspecto insuficientemente estudiado en la historia natural del CECC, como lo refleja la escasez en el número de artículos publicados al respecto. Se ha hablado mucho del pronóstico y el tratamiento individual en el CECC, pero el protocolo diagnóstico es similar para casi todas las localizaciones, tanto en la evaluación preoperatoria como en el seguimiento<sup>6</sup>. Nosotros partimos de una base de datos ajustada a las características clínicas y de supervivencia de los pacientes con CECC en nuestro entorno, donde predominan los tumores de laringe supraglótica y faringe. Nuestros 652 casos, aunque con menor número que el de otras series publicadas, corresponden a una población muy controlada con un seguimiento exhaustivo, de la que sólo hay perdidos 25 (3,8%) casos. Los pacientes remitidos a otros centros para completar el tratamiento (radioterapia, quimioterapia, reconstrucciones complejas) siguen revisiones en nuestro centro o se les ha llamado para conocer su posterior evolución<sup>11</sup>. La frecuencia de RT en los CECC es similar a la de otros autores, aunque pocas series presentan los datos con estos totales<sup>1</sup>. El número absoluto de casos con RT ha ido disminuyendo de forma paralela a la reducción de los CECC que hemos observado en los últimos años, sobre una po-

blación total que ronda los 100.000 habitantes, aunque con un descenso poblacional y un envejecimiento progresivos. Esa tendencia no es tan manifiesta en el número de STP y MD, que según nuestra experiencia mantienen otros estándares<sup>14,15</sup> (fig. 1).

Una localización ampliamente citada en la bibliografía respecto a las RT es la cavidad oral<sup>16-18</sup>. Si desglosamos nuestros resultados, en la cavidad oral obtenemos un 20,6% de recidivas, porcentaje inferior al de otras series, que las estiman en un 25-50%, aunque ofrecen una casuística más amplia. Es de destacar que la mayoría de esos autores clasifican las RT como de tipo local (38%), como también nosotros hemos observado<sup>19,21</sup> (tabla II).

Los tumores de faringe son en nuestra serie los más recidivantes (el 49,2% de todos las RT). Esto es muy llamativo en mesofaringe e hipofaringe, que presentan los porcentajes más altos, hecho ya constatado por otros autores que incluso llegan al 95%<sup>8</sup>.

El tipo de recidiva no está bien tipificado en todos los estudios, aunque en algunos se usa una clasificación similar a la nuestra<sup>22</sup>. Preferimos separar los tipos local y locoregional haciendo una distinción en este último al considerar la recidiva en el traqueostoma. En nuestra serie predominaban las RT locoregionales, lo que sería aún más potente si incluyéramos entre ellas las estomales.

En el tumor inicial había un predominio de los estadios III/IV (71,6%), como también observamos otros autores<sup>8</sup>. Es un dato similar al observado por nosotros cuando estudiamos las MD, pero contrasta con el del primer tumor en los STP, donde predominan, según nuestra experiencia, los estadios I-II<sup>13</sup>. Para algunos autores, el estadio del tumor inicial parece guardar relación con la supervivencia después de la RT en la cavidad oral, pero el estudio de la recidiva no, aunque en esto discrepamos<sup>5</sup>.

La mayoría de nuestras RT se diagnostican en el primer año de seguimiento, sobre todo en el primer semestre. En algunos trabajos se dice que los tumores que recidivan en el primer año, sobre todo en el primer semestre después del tratamiento inicial, tienen muy mal pronóstico, pero en nuestra serie no hemos observado estas diferencias en relación con el momento de aparición de las RT<sup>23</sup>.

Se ha tratado de establecer puntos de control en el seguimiento con endoscopia y técnicas de imagen (TC y RM) que, aunque son útiles para determinar la extensión del tumor, planificar el tratamiento y comprobar su respuesta, no permiten el diagnóstico precoz (vé las recidivas debido a la distorsión anatómica por la cirugía previa o la fibrosis tras radiación<sup>24,25</sup>). El diagnóstico precoz y el seguimiento estrecho han sido indicados por muchos autores como cruciales para mejorar la supervivencia<sup>14,19</sup>. Un hecho llamativo, que se ve reflejado en nuestros resultados, es que el número de revisiones y su periodicidad no determinan el diagnóstico precoz, además de suponer un importante coste económico<sup>26</sup>. En nuestros pacientes observamos que el tiempo medio que transcurre entre la última revisión normal y el diagnóstico evidente de RT es de sólo 1,2 meses. Este elevado número de recidivas locoregionales observadas poco tiempo después de una revisión normal indica un fallo en el diagnóstico que podría deberse a que la RT se

desarrolla en un territorio alterado por la cirugía y la radioterapia previas que la reanunciarán, aunque no descartamos recidivas de crecimiento explosivo. Es muy frecuente en nuestra serie que los pacientes acudan por propia iniciativa, antes de la fecha señalada, por la aparición de un síntoma llamativo (masa o inflamación cervical, disfagia...). No obstante, otros pacientes esperaron a la siguiente revisión porque estaba próxima la fecha y el síntoma era tolerable<sup>26</sup>. Recordamos que en nuestro centro se practica el protocolo clásico de seguimiento en el primer año al mes, en el segundo cada 2 meses, en el tercero cada 3, en el cuarto cada 4 y en el quinto cada 5-6 meses. Algunos autores ponen en duda la efectividad de los métodos habituales en el diagnóstico precoz de las recidivas, sobre todo cuando son tardías<sup>27</sup>. En nuestra serie sólo el 4% de los pacientes con RT estaban asintomáticos y la exploración clínica fue decisiva para su diagnóstico, casi siempre tumores de cavidad. Este dato sorprendente coincide con lo observado por otros autores en el cáncer de laringe<sup>28</sup>.

Se han propuesto como alternativas que completen el seguimiento clínico la realización de tomografía por emisión de positrones (PET) 18-fluorodesoxiglucosa (FDG) y la determinación seriada de algunos marcadores tumorales séricos (anticuerpos anti-p53, metaloproteínas...)<sup>29,30</sup>, sobre todo en los primeros meses, cuando el riesgo de recidivas es mayor y sería factible el diagnóstico precoz<sup>30,31</sup>. Así, se podría plantear una alternativa a las RT en los tumores laringeos, donde los pobres resultados obtenidos en la supervivencia, el elevado coste económico y la pésima calidad de vida nos empujan a un esfuerzo adicional para su diagnóstico precoz<sup>32</sup>. La aparición de una masa cervical es lo que motiva la sospecha clínica de RT en muchos casos (54%), pero en la mayoría se trataría ya de una recidiva locoregional (74%), con amplia extensión del tumor y muy escasa supervivencia.

Una vez sospechada la RT, se debe realizar el diagnóstico citohistopatológico de confirmación. La biopsia ambulatoria y la IAAF fueron las pruebas más realizadas, y destaca el alto rendimiento de esta última. Las técnicas de linaje se indicaron para determinar la extensión de la enfermedad y planificar la cirugía, se hicieron a la mayoría de los pacientes, aunque el 35% sólo recibió tratamiento paliativo, de forma similar a lo publicado<sup>33</sup>. En ningún caso se utilizaron PET ni marcadores séricos durante el seguimiento.

Los bordes quirúrgicos están más afectados en los tumores laringeos, quizá porque la resección se hace más apurada con el fin de preservar la función vocal. Consecuentemente, si comparamos su afectación con la muestra control sin RT, están más afectados en esta última, pero sin que aparentemente este hecho influya en la supervivencia, posiblemente porque se hizo un control adecuado de esos bordes al indicar la radioterapia posterior<sup>34</sup>.

El tratamiento realizado con más frecuencia con fin curativo en las RT fue la cirugía de rescate y la reconstrucción funcional, como también indican la mayoría de los autores, dependiendo del tipo de recidiva, la localización y el estado general del paciente<sup>35-37,38</sup>. Así, en la cavidad oral la supervivencia de las RT tratadas con cirugía alcanza el

21%, superior a la de la radioterapia y la quimioterapia<sup>39</sup>. Hay que considerar que después de la radioterapia radical avanzada, sólo el 23% de los pacientes con RT son candidatos a la cirugía de rescate, por lo que habría que extremar su diagnóstico precoz para indicarla en un primer momento. También se precoriza el uso del lúser, tanto en estadios precoces como avanzados del cáncer glótico recidivante tras radioterapia, con resultados oncológicos (el 53% a los 5 años) y funcionales muy buenos. El número de complicaciones es menor que con cirugía abierta, aunque sólo en manos expertas, y se reserva la laringectomía total para sus fracasos (29%)<sup>40</sup>.

La laringectomía total tras radioterapia o cirugía parcial tiene para nosotros resultados aceptables en los tumores glóticos (71.4%), mientras que se reduce al 50% en los supraglóticos, como también se ha publicado<sup>41,42</sup>.

Algunos autores desaconsejan la cirugía de rescate en los tumores de laringe después de radioterapia o quimioterapia, tanto por el reducido número de indicaciones quirúrgicas (menos del 50%) como por la escasa supervivencia (menos del 30%), además de una pésima calidad de vida<sup>43,44</sup>.

Esta diferencia entre los tumores laringeos y faríngeos quizá se deba a que en los primeros predominan las recidivas locales, mientras que en los laringeos lo hacen más locoregionales, aunque esta relación no ha estadísticamente significativa. Así, se ha visto que los mejores resultados se obtienen en las recidivas locales cuando se practica cirugía (35%), y se reducen en las regionales (18%) y del traqueobronquio (16%)<sup>45</sup>. Nuestra serie pone en evidencia locoregionales unas cifras de supervivencia bajas, lo que corrobora los datos publicados.

En las RT avanzadas, con tan escasa supervivencia, se precoriza el uso de la radioquimioterapia, reirradiación posquirúrgica de rescate, quimioterapia y terapia biológica<sup>46</sup>. En nuestro centro no tenemos suficiente experiencia en su uso, aunque hay casos singulares. Así, un paciente con recidiva regional y metástasis pulmonares tratado con cirugía y radioquimioterapia permaneció vivo 49 meses después. El empleo de esta terapia híbrida (cirugía de rescate, quimioterapia y reirradiación) ha sido propuesta en las RT y STI, con una supervivencia general del 22% y mejora del control local y las MD, pero se limita su uso a ensayos clínicos por sus efectos secundarios (17%), entre los que se incluye la rotura de cirugía (4%)<sup>47,48</sup>. Otros autores si observan mayor radiotoxicidad con la reirradiación, pero no encuentran modificaciones sustanciales en las cuestiones de calidad de vida<sup>49</sup>. Sería, por lo tanto, una alternativa a la cirugía de rescate en los tumores laringeos, desde habría que replantear el protocolo de la preservación de órgano por los malos resultados oncológicos y funcionales<sup>50</sup>.

El uso de la braquiterapia tiene interés en los tumores de cavidad oral y olvívica, con resultados aceptables para nosotros en esa última localización. Incluso como tratamiento combinado o alternativo en el caso de bordes afectados después de la cirugía en los tumores de cavidad oral, con menos efectos secundarios que la radioterapia convencional<sup>51</sup>.

Por lo tanto, una posible estrategia en las RT, sobre todo en los tumores laringeos, es tratar de hacer un diagnóstico

peccos de la RT por medio de PET-FDG y algunos marcadores tumorales séricos (anticuerpos anti-p53, MMP-13), además de una terapia más completa que considere la cirugía de escote, la quimioterapia y la irradiación<sup>16,17,23,24</sup>.

En cuanto al seguimiento de los pacientes, nuestros datos estiman que la mayoría de las recidivas ocurren en el primer año, y la supervivencia media en caso de mala evolución es de ocho a meses<sup>25</sup>. En las recidivas estomacales, al contrario que lo presentado por otros autores, no observamos el antecedente de traqueostomía previa, al igual es cierto que en los últimos años casi siempre se ha podido evitar<sup>26</sup>.

Aunque hemos asistido a una reducción en el número absoluto de RT en los últimos años, puede deberse a la disminución general de los CECC, pues la frecuencia relativa es similar (Fig. 1). Este hecho contrasta con la estabilidad en el número de STP y MD que sí aumentan su frecuencia relativa respecto a los CECC. Es un hecho reflejado en la bibliografía el descenso paulatino en la incidencia de CECC, sobre todo el de laringe<sup>27</sup>, que en nuestra serie de CECC conlleva un descenso paralelo en el número de recidivas.

Nuestra supervivencia general (15%) es inferior a la de otras series, que la sitúan en un 22-44%<sup>28,29,30</sup>, aunque se refieren a una localización concreta (cavidad oral) o son casos tratados con radioterapia y quimioterapia o reirradiación y excluyen el tratamiento paliativo, que en nuestros casos representa el 35%. Si separáramos localizaciones, los tumores de laringe y cóvum tienen mayor supervivencia, mientras que en la faringe y la cavidad oral es muy mala. En esta última localización contrasta la supervivencia de la RT con la de los STP que tenemos recogidos en otro estudio, entre los que sobreviven el 60% de los pacientes<sup>31</sup>. No hay ninguna duda del impacto negativo que representan las RT en la supervivencia, como hemos observado al compararla con la muestra control (Fig. 2). En esta muestra sin RT la supervivencia es del 50%, y la mortalidad la causan las frecuentes complicaciones posquirúrgicas, STP y MD. Hay que tener en cuenta que la muestra control tiene el 25% de los casos en estadios avanzados (III-IV) (tabla III), que precisan tratamientos más agresivos y presentan complicaciones más graves, la mortalidad de las MD es del 100% y la de los STP del 88%. La supervivencia general que se cita en la bibliografía para el CECC está alrededor del 45%, de cualesquier localizaciones y estadios, aunque es inferior al 54,9% observado en nuestra serie de CECC<sup>32,33</sup>.

El escaso número de pacientes que sobreviven a la RT nos permite concluir con seguridad si se ejerce en la actualidad un mejor control local de la enfermedad, aunque 13 de los 30 pacientes vivos sin tumor lo han hecho en el último decenio del estudio.

Ciertas conclusiones a nuestro trabajo podemos decir que:

- Las RT son frecuentes y tienen un impacto muy negativo en la supervivencia de los pacientes.
- Los protocolos actuales de seguimiento no son útiles para hacer el diagnóstico precoz, sobre todo en los tumores laringeos, que presentan la mayoría de las veces una RT de tipo locoregional.

- La cirugía de rescate y la braquiterapia obtienen resultados aceptables en las RT de laringe y cóvum. Sin embargo, se debe buscar otras alternativas terapéuticas a los tumores de laringe por su baja supervivencia.
- Aunque estas dos alternativas en el diagnóstico y el tratamiento supondrán un gasto importante no exento de riesgos, en pacientes muchas veces asintomáticos, no es tan claro que el gasto actual es también elevado, pero con un pobre resultado en la calidad de vida y la supervivencia de los pacientes.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Shingai EM, Wei CT, Taylor MB. Electroporation-mediated gene delivery to head and neck cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1031:276-85.
2. Qian M, Lator A, Shih CC, Barber A, Gao B, Ardich J. 2004. In vivo transfection of cells in vivo. *In vivo Gene and Cell Delivery*. 2004;2:203-5.
3. Lator A, Ardich J, Gao B, Shih CC. In vivo transfection for oncogene activation in head and neck cancer. *Oncology (Head Neck Surg)*. 2005;27:11-19.
4. Yonemoto F, Ishiguro H, Yoshimura K, Miura M. Site specific depression of survival: primary cancer in early stage head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2004;94:2307-14.
5. Spencer R, Anderson DC, Hargrave RH, Chen DS, Bergquist J, Kelly K, et al. Delayed regional recurrences, distant metastases, and second primary malignancies in squamous cell carcinomas of the larynx and hypopharynx. *Laryngoscope*. 2002;112:1273-87.
6. Wang LC, Wei WT, Foss LA, Yoon SP. Salvage of the recurrent head and neck squamous cell carcinoma after primary curative surgery. *Head Neck*. 2004;26:353-61.
7. Henson S, Goss G. Multiple primary malignant tumors: a survey of the literature and a meta-analysis. *Ann Oncol*. 2003;14:1306-11.
8. Saitoh YH, Watanabe C, Ueda K. TNM classification of malignant tumours. 7<sup>th</sup> ed. New York: 2004;4:202.
9. Gohak AJ, Herrington K, Nottberg C. Incidence of second head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology and Rhinology*. 2003;129:28-37.
10. Basso C, Galardi F, Kowalski P, Van den Broeke P, Verbeek AL, Meekens PLA. Value of routine follow-up for patients cured of laryngeal carcinoma. *Cancer*. 2008;114:130-6.
11. Cozzetta TR, Stoyanov AE. In vivo electroporation after curative radiotherapy for advanced head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2009;135:279-82.
12. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
13. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
14. Schwartz CE, Mittal BH, Duggal B, Hargrave C, Tompsett LC. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck*. 2000;22:54-61.
15. Agui JM, Carricho AJ, Pintos L, De Campos F, Gilibert JS, Miguez J, et al. Postoperative lymphadenectomy after free salvage surgery for head and neck cancer. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2003;129:1197-21.
16. Pastor LA, Brunell F, Mackay M, Smith H, Pridon H, Whitman CB, et al. Prediction of recurrence-free and neck squamous cell carcinoma-free radiotherapy in early-stage laryngeal cancer: a randomized controlled trial. *Laryngoscope*. 2010;120:1800-6.
17. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
18. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
19. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
20. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
21. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
22. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
23. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
24. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
25. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
26. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
27. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
28. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
29. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
30. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
31. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
32. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.
33. Al-Jarrah M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, El-Hayek M, et al. Efficacy of radiotherapy in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma after radiotherapy. *Archives of Otolaryngology and Head Neck Surg*. 2006;132:30-5.

22. Lippman M, Hollinger S, Frazier D, Cawert S, Major E, DeVore C, et al. Postoperative brachytherapy alone for T3-T4b squamous cell carcinomas of the oral tongue and floor of mouth with low or positive margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;65:742.
23. Tani S, Qian M, Orita C, Lopez M, Cize JR, Waga M. Results of salvage surgery for head and neck squamous cell carcinoma progression with radiotherapy chemotherapy and radiotherapy. *Head Neck*. 2004;27:121-8.
24. Shirai H, Vogt P, Andriantsi F, Kwon M. Postoperative carbon dioxide laser micro-surgery for recurrent glottic carcinoma after radiotherapy. *Head Neck*. 2004;26:427-44.
25. Gallo A, Mid R, Biondelli M, Viochi D, Floridi ML, Mariani V, et al. Salvage resection after previous laryngectomy: total laryngectomy 50% or 100% resection of the remaining recurrent sites. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129:786-9.
26. Kasperis N, Wilson RL, Laramie CE, De Rosier J, Dormanier F, Langenfeld JA. Results of postoperative resection for recurrent or second primary head and neck carcinoma. *Cancer*. 2006;99:1339-47.
27. Chenais S, Millon-Nig, Hane CE. Reevaluation of recurrent head and neck cancers with results in French. *Statist Science*. 2004;17:106-22.
28. Fatafcher M, Wilson RL. Chemotherapy for recurrent or second primary squamous cell carcinomas of the head and neck. *South Med J*. 2004;97:805-18.
29. Yoshino JR, Vitek PE, Christian SE, Milano MT, Kao L, Sherman RM, et al. Long-term outcome of recurrent laryngectomy and radiotherapy for recurrent and second primary head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;66:93-9.
30. Hattaroy W, McCook M. Second recurrences following temporary tracheostomy. *J Laryngol Otol*. 2001;119:202-4.
31. Schwanz DA, Butler T, Chaudhri K, Vashi B, Kuchel C, Hodge P, et al. Post laryngectomy surveillance practice for head and neck squamous cell carcinoma: a study for the United Kingdom. 2005;25:930-9.
32. Kerkhof GJ, Lippman M, Dierendonck AJ, Sigmond CE, Frensch HJ, van HJ, et al. Progress in chemoprevention drug development: the promise of bio-molecular biomarkers for prevention of upper-airway neoplasia and cancer. A plan to move forward. *Curr Cancer Res*. 2006;12:363-67.







