

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Facultad de Medicina
Departamento de Histología y Anatomía Patológica

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE
CICLOOXIGENASA-2 EN PACIENTES CON CÁNCER AVANZADO DE
LARINGE SOMETIDOS A QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, CON
INTENCIÓN DE CONSERVAR LA FUNCIÓN FONATORIA.**

ÓSCAR E. CAZORLA RAMOS

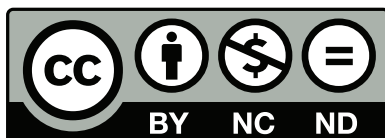
Málaga, 2008



SPICUM
servicio de publicaciones

AUTOR: Óscar Emilio Cazorla Ramos

EDITA: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga.

Dr. D. Antonio Rueda Domínguez, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital “Costa del Sol” de Marbella.

CERTIFICAN:

Que Don Óscar E. Cazorla Ramos, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral **“ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CICLOOXIGENASA-2 EN PACIENTES CON CÁNCER AVANZADO DE LARINGE SOMETIDOS A QUIMIOTERAPIA DE INDUCCIÓN, CON INTENCIÓN DE CONSERVAR LA FUNCIÓN FONATORIA”**, que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D Alfredo Matilla

Dr. Antonio Rueda

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Al **Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente**, Catedrático del Departamento de Histología y Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al **Dr. D. Antonio Rueda Domínguez**, Jefe de Servicio de Oncología Médica del Hospital “Costa del Sol”, por su tiempo y su dirección concisa y sincera que ha hecho posible esta tesis doctoral.

A la **Dra. Martina Álvarez Pérez** por su ayuda amable y constante en el estudio estadístico de esta tesis y por sus consejos.

A la **Dra. Lidia Pérez Villa** por la realización del estudio inmunohistoquímico de este trabajo y su disposición siempre agradable.

Al **Dr. D. Ignacio González de Gor** por la dirección de la suficiencia investigadora que precedió a este estudio y a la **Dra. Virginia Jiménez Oliver** por cederme los datos que la facilitaron.

Al **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por su colaboración en todo momento.

A los **Servicios de Oncología Médica y Oncología Radioterápica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por su labor en el tratamiento de los pacientes de este estudio.

A los compañeros del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por ser mi familia profesional y darme tantos momentos de alegría.

Al **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital General de Antequera** por su amistad y compañerismo durante el desarrollo de esta tesis.

A **Eva** por comprenderme y estar junto a mí.

A **mi familia** por todo.

A todos **los pacientes** oncológicos y sus familiares, que deben ser estímulo para una medicina honesta.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	2
1. EPIDEMIOLOGÍA.....	3
2. ANATOMÍA PATOLÓGICA	5
2.1. Carcinoma escamoso común.....	6
2.2. Carcinoma escamoso verrugoso.....	7
2.3. Carcinoma escamoso papilar.....	8
2.4. Carcinoma basaloide-escamoso.....	8
2.5. Carcinoma escamoso fusocelular.....	9
2.6. Carcinoma escamoso adenoide.....	9
2.7. Carcinoma adenoescamoso.....	9
2.8. Tumores neuroendocrinos.....	10
2.8.1. Tumor Carcinoide.....	10
2.8.2. Carcinoma de células pequeñas.....	10
2.9. Tumores malignos tipo glándula salivar.....	11
2.10. Carcinoma de células gigantes.....	11
2.11. Carcinoma linfoepitelial.....	11
3. TRATAMIENTO EN CÁNCER AVANZADO DE LARINGE.....	12
3.1. Cirugía.....	12
3.2. Radioterapia postoperatoria.....	14
3.3. Preservación de órgano.....	15
3.3.1. Quimioterapia de inducción y RT posterior.....	15
3.3.2. Quimio-radioterapia concomitante.....	16
4. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS.....	19
4.1. Factores celulares y moleculares.....	19

4.1.1. EGFR.....	19
4.1.2. VEGF.....	22
4.1.3. P53.....	23
4.1.4. Ki 67.....	24
5. CICLOOXIGENASA-2.....	26
5.1. COX-2 y cáncer.....	26
5.1.1. Angiogénesis.....	27
5.1.2. Apoptosis.....	29
5.1.3. Invasión.....	30
5.1.4. Inflamación e inmunosupresión.....	30
5.2. COX-2 y Cáncer de Cabeza y Cuello.....	31
II. OBJETIVOS.....	35
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE	37
1.1. Criterios de inclusión.....	38
1.2. Protocolo de conservación de laringe.....	38
1.3. Seguimiento.....	41
2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO.....	43
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
IV. RESULTADOS.....	51
1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	51
1.1. Características generales.....	51

1.2. Marcadores inmunohistoquímicos.....	52
1.3. Tratamiento y evolución clínica.....	54
2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA.....	58
2.1. Inmunohistoquímica.....	58
2.2. Evolución clínica y supervivencia.....	60
2.2.1. Supervivencia Global.....	60
2.2.2. Tiempo libre hasta la progresión.....	67
2.3. Conservación de órgano.....	71
V. DISCUSIÓN.....	73
1. COX2.....	78
2. EGFR.....	81
3. VEGF.....	83
4. KDR.....	84
VI. CONCLUSIONES.....	87
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	90
VIII. ANEXO I.....	112
XI. ANEXO II.....	125

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer de laringe es el tumor más frecuente en la región de la cabeza y el cuello, representando aproximadamente el 2% de todos los tumores malignos del organismo y el sexto lugar en frecuencia en varones. En España, existe la tasa de incidencia más alta de Europa ¹, constituyendo un importante problema sanitario en nuestro entorno, tanto por la mortalidad como por la morbilidad generadas.

Aproximadamente, el 40% de los pacientes afectados por carcinoma laríngeo son diagnosticados en estadios avanzados, y en éstos las tasas de curación son pobres y no se han modificado perceptiblemente en los últimos años.

El tratamiento clásico de estos tumores ha sido la cirugía seguida de radioterapia, pero hoy contamos también con distintas modalidades que combinan quimioterapia y radioterapia, con el objeto de evitar el carácter mutilante de la intervención quirúrgica y sus importantes repercusiones en la calidad de vida del paciente. Sin embargo, la supervivencia a los 5 años, con cualquiera de las opciones terapéuticas, se sitúa alrededor del 40 %.

Por otro lado, la heterogeneidad biológica de las neoplasias laríngeas conlleva que tumores similares puedan tener distinta historia natural y variabilidad en la respuesta al tratamiento, por lo que es necesario identificar marcadores que nos permitan predecir el comportamiento tumoral, grado de agresividad y la capacidad de respuesta frente a los distintos tipos de tratamientos para seleccionar a los pacientes que pueden responder más satisfactoriamente a una determinada opción terapéutica.

1. EPIDEMIOLOGÍA

Los tumores laríngeos son los más frecuentes en el área otorrinolaringológica. De ellos, los de estirpe maligna son los más importantes por su trascendencia clínica y elevada incidencia, ya que ocupan el sexto lugar entre las neoplasias malignas del sexo masculino, siendo el cáncer más frecuente de cabeza y cuello. El carcinoma laríngeo representa aproximadamente un 2% del total de tumores en varones y un 0.4% en las mujeres y ocasiona el 1% de las muertes por cáncer ¹.

El cáncer de laringe es una patología con un claro predominio por el sexo masculino en todos los rangos de edad, aunque la relación hombre-mujer se ha modificado de 15:1 a 4:1 en las últimas décadas ², probablemente debido al aumento de hábitos tóxicos en la población femenina. La incidencia máxima está en torno a los 60-70 años.

La variedad histológica más frecuente es el carcinoma escamoso (90%). En cuanto a la localización, la glótica es la más frecuente en los países mediterráneos, donde el 60% de los cánceres laríngeos se advierten en esta región ³; sin embargo, en España predomina la localización supraglótica ⁴. La localización subglótica primaria es muy rara, y la mayor parte de los tumores que asientan en esta zona se originan en glotis y supraglotis.

Los carcinomas de cabeza y cuello, en general, presentan unas incidencias notablemente diferentes entre unos países y otros. Esta variabilidad se explica fundamentalmente por los diferentes consumos de alcohol y tabaco en distintas áreas del mundo ⁵. En 1996, en Estados Unidos aparecían unos 12.500 nuevos casos anuales, según la American Cancer Society ⁶, estimándose unos 9800 aproximadamente en el 2005 ⁷. La incidencia en países escandinavos y anglosajones se ha doblado en los últimos 50 años, sin llegar a la mitad de la española. España presenta una de las tasas de incidencia más elevadas para varones, sobre todo en el norte del país, y así, en Asturias existe una de las más

altas del mundo (20.6 casos/100.000 habitantes/año) ⁸. La incidencia del cáncer de laringe estimada en España, en el año 2000, fue de 0.33 casos/100.000 habitantes para las mujeres y de 19.91 casos/100.000 habitantes para los varones, en éstos la más elevada de la Unión Europea ⁹. Durante 1998-1999, en la provincia de Málaga, el carcinoma laríngeo fue la 3ª localización en frecuencia en varones en los grupos de edad de 30-34 años (tras pulmón y linfomas-leucemias) y de 45-64 (tras pulmón y colo-rectal) ¹⁰. En este periodo, las tasas de incidencia ajustadas a la población estándar europea x 100000 fueron de 18'9 en varones y 0'6 en mujeres ¹⁰. En el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, se diagnosticaron 46 casos de carcinoma laríngeo durante el año 2000 (según datos extraídos del registro de tumores de este centro), suponiendo un 2'1 % del total de neoplasias malignas detectadas y ocupando el 5º lugar en frecuencia tras las de pulmón, colon-recto, vejiga y próstata. El número de carcinomas laríngeos diagnosticados en este mismo hospital, durante el año 2002, descendió a 30 casos, un 1.3 % del total de tumores registrados. De ellos, 27 se dieron en varones (1.2%) y 3 en mujeres (0.1%).

En cuanto a la mortalidad, en España es de 10 casos/100000 habitantes/año observándose una ligera disminución en los últimos años. En un estudio, realizado por Monge y cols. ¹¹, que analizó la tendencia temporal de la mortalidad entre 1952 y 1992, se situó en el sexto lugar en mortalidad por cáncer en varones y en el cuarto en cuanto a años potenciales de vida perdidos. En Andalucía, las tasas brutas de mortalidad por 100000 habitantes en 1999 fueron de 9'7 en varones y 0'3 en mujeres ¹².

Como se ha expuesto, esta patología afecta a una población no desdeñable y de estos datos se desprende la importante repercusión socio-económica de esta entidad.

2. ANATOMÍA PATOLÓGICA

En la laringe se puede observar un espectro de alteraciones madurativas epiteliales que, de un extremo a otro, se denominan hiperplasia, hiperplasia atípica, displasia, carcinoma in situ y carcinoma infiltrante. Cuando se observan por primera vez, los engrosamientos de carácter ordenado aparentemente no presentan potencial de transformación maligna, aunque el riesgo aumenta hasta el 1-2 % en un periodo de 5 a 10 años en la displasia leve y hasta el 5-10 % en la grave ¹³.

Considerando su aspecto externo, los tumores laríngeos pueden ser exofíticos, ulcerados o infiltrantes ¹⁴. Los tumores exofíticos crecen de forma vegetante, haciendo prominencia hacia la luz laríngea; los ulcerados presentan un cráter central y los infiltrantes (que en ocasiones son ulcerados) poseen gran capacidad proliferativa y crecen en profundidad, invadiendo el corion mucoso.

Los tumores exofíticos son en general neoplasias con mayor maduración biológica, mientras que los ulcerados y sobre todo los infiltrantes corresponden a tejidos más inmaduros.

La clasificación de las neoplasias laríngeas según su histología es básica para establecer el pronóstico y tratamiento de estas lesiones.

La última actualización de la clasificación de la O.M.S. ¹⁵ considera las siguientes variantes anatomoclínicas de carcinoma de laringe:

- Carcinoma escamoso común
- Carcinoma escamoso verrugoso
- Carcinoma escamoso-papilar
- Carcinoma basaloide-escamoso
- Carcinoma escamoso fusocelular

- Carcinoma acantolítico (escamoso adenoide)
- Carcinoma adenoescamoso
- Tumores neuroendocrinos
- Tumores malignos tipo glándula salivar
- Carcinoma de células gigantes
- Carcinoma linfoepitelial

2.1. Carcinoma escamoso común

Representa el 90 % de los tumores malignos de laringe.

Se origina a partir del epitelio laríngeo, bien del escamoso o del respiratorio cilíndrico ciliado, que previamente haya sufrido una metaplasia escamosa. Histológicamente, está constituido por la proliferación de células epiteliales atípicas que exhiben diferenciación escamosa, es decir, formación de queratina y/o presencia de puentes intercelulares así como tendencia a la infiltración del estroma ¹⁶.

Se clasifican según el grado de diferenciación:

- carcinoma escamoso bien diferenciado: histológicamente similar al epitelio escamoso normal; células poligonales y variable proporción de células de tipo basal, puentes celulares evidentes y diferentes grados de queratinización.
- Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado: mayor pleomorfismo nuclear y mayor número de mitosis, ocasionalmente atípicas; la queratinización suele ser menor.
- Carcinoma escamoso pobremente diferenciado: la queratinización y la presencia de puentes intercelulares es mínima.

Se atribuye mejor pronóstico a los bien diferenciados mientras que los pobremente diferenciados se consideran más agresivos. Sin embargo, existe desacuerdo sobre el significado de este aspecto, y así, para algunos será indicativo del poder metastásico ¹⁷, mientras que otros lo relacionan con el modo de crecimiento de la neoplasia.

2.2. Carcinoma escamoso verrugoso

También llamado tumor de Ackerman (por haber sido descrito por este autor en 1948). Su localización más habitual es la cavidad oral, seguida de la laringe. Supone un 5.2% de los carcinomas laríngeos y asienta preferentemente en cuerda vocal ¹⁸.

Se trata de un carcinoma escamoso bien diferenciado, con características clínico-patológicas propias. Su aspecto macroscópico es el de una lesión exofítica, verrugosa, de aspecto papilar y carácter infiltrante.

El virus del papiloma humano (VPH 16 y 18) se ha llegado a detectar hasta en más del 50% de los carcinomas verrugosos ¹⁹, por lo que muchos trabajos estudian su papel como cofactor en el desarrollo del tumor.

Histológicamente, la neoplasia está compuesta por cordones sólidos de células escamosas altamente diferenciadas y con marcada queratinización de capas superficiales. Típicamente en el estroma hay una reacción inflamatoria, a expensas de linfocitos y células plasmáticas, a veces con reacción granulomatosa de tipo “cuerpo extraño”.

El diagnóstico diferencial entre el carcinoma verrugoso y el papiloma, o incluso el carcinoma escamoso, puede ser muy difícil ²⁰, especialmente en biopsias pequeñas. Por esta razón la biopsia debe incluir la base de la lesión. La correlación clínica de la presentación y la apreciación del carácter exofítico, la fijación a estructuras normales y otros aspectos típicos de la entidad pueden ser de gran ayuda en el diagnóstico ²¹.

Se trata de un tumor de crecimiento lento que no metastatiza a distancia ²².

El pronóstico es bueno. Pueden coexistir focos de carcinoma escamoso común y en este caso su comportamiento es más agresivo.

Otro punto de gran controversia es la eficacia de la radioterapia contra estos tumores y la posibilidad de transformación anaplásica tras la misma. En general, se acepta la resección como tratamiento de elección para los carcinomas verrugosos de cabeza y cuello, reservándose la radioterapia para aquellos casos en los que la cirugía no es posible ²³. El vaciamiento ganglionar no está indicado sistemáticamente, ya que muy raramente se extienden a ganglios linfáticos regionales.

2.3. Carcinoma escamoso papilar

Se trata de una variante poco conocida por el escaso número de casos bien documentados. Presenta una apariencia similar al carcinoma escamoso verrugoso, pero se diferencian de éste en que carece de la prominente queratinización superficial y de atipia celular. El diagnóstico con biopsias superficiales puede ser difícil.

Su comportamiento es similar al carcinoma escamoso convencional.

2.4. Carcinoma basaloide-escamoso

Es un tumor con dos componentes, uno de células escamosas y otro basaloide, que preferentemente se desarrolla en supraglotis.

Su conducta biológica es análoga a un carcinoma escamoso convencional pobremente diferenciado, pero a menudo se presenta como una lesión en estadio avanzado ²⁰, muy agresiva localmente y con metástasis tempranas regionales o a distancia.

2.5. Carcinoma escamoso fusocelular

Su origen es controvertido, por lo que existen varios términos análogos como: carcinosarcoma, pseudosarcoma o carcinoma sarcomatoide o metaplásico. Se desarrolla preferentemente en región glótica (especialmente en comisura anterior) y su aspecto suele ser el de una masa polipoidea que con frecuencia se ulcera en superficie.

Su comportamiento biológico es el de un carcinoma escamoso convencional.

2.6. Carcinoma escamoso adenoide

También denominado carcinoma escamoso acantolítico. Se trata de una variedad muy rara de carcinoma escamoso en la que se identifican espacios pseudoglandulares y pseudovasculares, derivados de la extensa acantolisis de las células tumorales.

No hay que confundirlo con el carcinoma adenoescamoso, mucho más agresivo. El carcinoma escamoso adenoide es de bajo grado de malignidad y negativo para las tinciones de mucinas ²⁴.

2.7. Carcinoma adenoescamoso

Es un tumor muy poco frecuente en cabeza y cuello, con características histológicas de carcinoma escamoso (que suele ser el componente predominante) y de adenocarcinoma. Puede desarrollarse en cavidad oral, senos paranasales y laringe, donde supone el 0.4% de las neoplasias de esta ubicación.

Su pronóstico es infausto con tendencia a la recidiva local y las metástasis a distancia.

2.8. Tumores neuroendocrinos

2.8.1. Tumor Carcinoide

Existen dos variedades, el tumor carcinoide típico y el atípico.

Los carcinoides típicos son tumores de bajo grado excepcionales en laringe y no son funcionantes. Se presentan como nódulos sesiles, o polipoideos submucosos, que habitualmente asientan en supraglotis. Su comportamiento suele ser benigno aunque en ocasiones pueden metastatizar, principalmente en hígado.

Los carcinoides atípicos, también llamados carcinomas neuroendocrinos, son tumores de alto grado, mucho más frecuentes en laringe. Se diferencian histológicamente de los típicos en que comúnmente existe ulceración de la mucosa y presentan pleomorfismo nuclear, necrosis y mayor actividad mitótica. Son más agresivos, con tendencia a la infiltración local, a afectar a ganglios linfáticos regionales y a metastatizar en huesos, piel, pulmón o hígado.

2.8.2. Carcinoma de células pequeñas

Representa aproximadamente el 0.5 % de los carcinomas laríngeos ²⁵ y, aunque puede afectar a cualquier región laríngea, tiene cierta predilección por la supraglótica.

Puede presentar diferenciación neuroendocrina e incluso debutar con síndromes paraneoplásicos debidos a la secreción de sustancias bioactivas por la neoplasia.

Es altamente agresivo, con un pronóstico muy malo y un curso clínico rápidamente fatal. Las metástasis se desarrollan hasta en un 90% de los casos ²⁶, principalmente en ganglios linfáticos, huesos, piel, pulmón e hígado.

2.9. Tumores malignos tipo glándula salivar

Son neoplasias muy infrecuentes, originadas en las glándulas salivares menores laríngeas, que incluyen el carcinoma mucoepidermoide, carcinoma de células acinares, adenocarcinoma ductal y el carcinoma adenoide quístico.

El carcinoma adenoide quístico es el más frecuente y su localización habitual es subglótica. Crece lentamente, pero con un patrón local marcadamente infiltrativo y con tendencia a la invasión perineural.

2.10. Carcinoma de células gigantes

Es análogo al carcinoma pulmonar de células grandes. Es muy raro en laringe y en él se pueden apreciar células gigantes atípicas, sin evidencias de diferenciación escamosa o glandular. El pronóstico es malo.

2.11. Carcinoma linfoepitelial

Se denomina también carcinoma indiferenciado y se desarrolla habitualmente en nasofaringe. Su presentación en laringe es inusual, obligando a descartar un proceso metastásico. La localización laríngea más frecuente es la supraglótica y especialmente el ventrículo laríngeo.

Es frecuente la afectación de los ganglios linfáticos y ocasionales las metástasis en pulmón, huesos y otros órganos.

3. TRATAMIENTO EN CÁNCER AVANZADO DE LARINGE

En el cáncer de cabeza y cuello, se entiende por enfermedad locoregional avanzada aquella en la que el tumor primario alcanza un considerable contenido clonogénico y/o una afectación ganglionar regional. Es decir, estadios III-IV.

Aproximadamente dos tercios de los pacientes con carcinoma de cabeza y cuello presentan esta situación en el momento del diagnóstico, apareciendo metástasis a distancia en un 10% de ellos ²⁷. En el caso de la laringe, alrededor del 40 % de las neoplasias se diagnostican en estadios III-IV ²⁸.

El tratamiento clásico de los carcinomas laríngeos en estos estadios ha sido una combinación de cirugía y radioterapia (RT), con unos resultados pobres, ya que la supervivencia no alcanzaba el 40% a los 5 años ²⁹. Según Al-Sarraf, un 60% de los pacientes sometidos a este tratamiento presentan recidiva local y un 20% aproximadamente desarrollan metástasis a distancia en los 5 primeros años a partir de la aplicación del mismo ³⁰.

La incorporación de la quimioterapia (QT) al arsenal terapéutico en los años 80, aunque no exenta de controversia, mejoró sustancialmente estos índices, y comenzaron a desarrollarse ensayos clínicos que avalaron la utilización de protocolos combinando QT con radioterapia (RT) como alternativa al tratamiento clásico.

3.1. Cirugía

La laringectomía total ha constituido el tratamiento más habitual para los pacientes con tumores laríngeos en estadios avanzados. No hay duda de que esta técnica quirúrgica, iniciada por Billroth en 1873 ³¹, ofrece una eficacia importante en el control oncológico de la enfermedad cuando su indicación es adecuada. Sin embargo, se trata de una

intervención muy mutilante que condiciona en distintos aspectos la calidad de vida posterior del paciente operado, ya que éste es portador de una traqueostomía permanente y no puede realizar una fonación fisiológica. Con el objeto de minimizar estos perjuicios, a lo largo de la historia, distintos cirujanos han ido desarrollando una serie de técnicas que se conocen como cirugía parcial o funcional y que pretenden conservar las funciones laríngeas de respiración, fonación y deglución, manteniendo el mismo control local de la neoplasia que la laringectomía total. Así pues, cirujanos como Bauers o Billroth iniciaron estas técnicas que se fueron perfeccionando en la segunda mitad del siglo XX, a manos de autores como Alonso, Labayle u Ogura ³², y que hoy en día se revisan con la incorporación de nuevas tecnologías como el láser.

Existen numerosos trabajos que analizan sus resultados funcionales y tasas de supervivencia, como los de Naudo ³³, Chevalier ³⁴ o Pearson ^{35,36}, pero su utilización en estadios avanzados es controvertida y no contamos con estudios randomizados que la respalden. Por otro lado, la RT postoperatoria, a menudo necesaria en carcinomas avanzados, provoca alteraciones en los tejidos que pueden llevar a un detrimento en la función laríngea, por lo que la utilidad de conservar el órgano mediante estas técnicas puede cuestionarse.

En cuanto al tratamiento quirúrgico de las adenopatías metastásicas cervicales, debe realizarse en los tumores glóticos avanzados y en todos los supraglóticos y el tipo de cirugía varía en función de la extensión y localización de las mismas. El vaciamiento radical es la técnica clásica y consiste en la extirpación de las áreas ganglionares de los niveles I-V además del nervio espinal, la vena yugular interna y el músculo esternocleidomastoideo. Existen modificaciones de esta intervención que permiten preservar algunas estructuras anatómicas y la más extendida, cuando las características de las adenopatías lo permiten, es el vaciamiento cervical funcional (o radical

modificado tipo III) que reseca las mismas áreas ganglionares respetando musculatura, nervio espinal y vena yugular interna.

3.2. Radioterapia postoperatoria

El grupo RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) llevó a cabo un ensayo aleatorio ³⁷ en el que se sometió a RT preoperatoria a 136 pacientes y a RT posoperatoria a 142 pacientes. Los autores afirmaron que el control local fue mayor en el segundo grupo, así como menor el número de complicaciones, y concluyeron que la RT posoperatoria ofrecía mayores ventajas que la preoperatoria. Una de estas ventajas es la posibilidad de seleccionar, en vista de los resultados de la cirugía y el estudio anatomopatológico, aquellos pacientes que pueden beneficiarse de recibir tratamiento radioterápico, evitándoles la toxicidad innecesaria a aquellos sin indicación tras la cirugía ³⁸. En su contra, la RT posoperatoria aumenta la morbilidad perioperatoria y actúa sobre tejidos hipóxicos con una radiosensibilidad disminuida.

En los tumores más pequeños, se reserva la RT posoperatoria para los casos en que el estudio anatomopatológico revela márgenes quirúrgicos positivos o libres pero muy próximos al tumor (a menos de 5mm) ²⁷. En cambio, los tumores T3 y T4 sometidos a cirugía deben recibir RT posoperatoria, incluso cuando los márgenes quirúrgicos sean libres, porque presentan gran tendencia a la recidiva local. La irradiación bilateral de cadenas cervicales está indicada siempre que se identifique más de un ganglio afecto tras el vaciamiento cervical.

Así pues, la combinación de laringectomía total y RT posoperatoria es el tratamiento clásico de neoplasias laríngeas en estadio avanzado. Pero, como alternativa, contamos con los protocolos de conservación de laringe que a continuación se exponen.

3.3. Preservación de órgano

Anteriormente, se ha mencionado el importante deterioro funcional y el perjuicio para la calidad de vida del paciente que conlleva la laringectomía total. En 1987 apareció el concepto de preservación de órgano ³⁹, como alternativa a la cirugía, con el objeto de evitar el carácter mutilante de estas intervenciones. Comenzó a promulgarse la utilización de RT aislada o combinada con quimioterapia como alternativa a la cirugía, reservándose ésta última como segunda maniobra. En las 2 últimas décadas aumenta la difusión de estas opciones.

La Sociedad Americana de Oncología Clínica (ASCO) revisó en el 2006 los ensayos clínicos más relevantes y no encontró diferencias significativas entre la tasa de supervivencia que ofrece la laringectomía total seguida de RT y el resto de alternativas de preservación de laringe ⁴⁰.

Existen principalmente dos tendencias actuales en el tratamiento conservador de laringe:

3.3.1. Quimioterapia de inducción y RT posterior

Protocolo terapéutico basado en la administración de quimioterapia neoadyuvante y posterior radioterapia a los pacientes con respuesta a la primera, reservándose la cirugía como segunda maniobra para aquellos enfermos sin respuesta a la quimioterapia.

Hasta principios de los 90, el tratamiento estándar de las neoplasias laríngeas era la combinación de cirugía y RT. Sin embargo, esta actitud comenzó a cambiar a partir del estudio llevado a cabo, con 322 pacientes afectados de carcinoma epidermoide laríngeo avanzado, por el Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group ⁴¹. En este ensayo de 1991, se comparó un grupo sometido a tratamiento convencional con otro introducido en un protocolo de QT neoadyuvante y RT posterior, obteniéndose un 68 % de tasa de supervivencia a los 2 años en ambos grupos, pero con una preservación

de laringe del 66 % en el segundo. Posteriormente, este mismo grupo ⁴² y otros muchos investigadores continuaron realizando ensayos randomizados, como el estudio fase III de la EORTC con 202 pacientes ⁴³, el de Andrés y cols. con 46 pacientes con carcinoma laríngeo en estadio III ⁴⁴ o el de Eisbruch y cols. ⁴⁵ entre otros ⁴⁶, que confirmaron la posibilidad de preservar el órgano sin disminución de la supervivencia mediante esta estrategia terapéutica.

Teniendo en cuenta los resultados de éstos y otros trabajos ⁴⁷, se puede afirmar que la quimioterapia de inducción, seguida de radioterapia (en los pacientes que responden al tratamiento quimioterápico), posibilita preservar las funciones laríngeas de respiración, fonación y deglución y disminuir la aparición de metástasis a distancia sin detrimento de la supervivencia, permitiendo además el rescate quirúrgico de las recidivas locoregionales.

3.3.2. Quimio-radioterapia concomitante (QT-RT)

Otra opción en la preservación de la laringe es la administración de radioterapia junto con quimioterapia, bien de forma continua durante el tratamiento radioterápico, o bien intermitente alternando con el mismo. En esta modalidad también son muy elevadas las respuestas completas, entre el 60-85% aproximadamente ⁴⁸.

Solo contamos con un estudio prospectivo randomizado que evalúe esta combinación limitándose al cáncer de laringe avanzado; es el llevado a cabo por Forastiere y cols ⁴⁹. Estos autores compararon en su estudio estos 2 protocolos y no encontraron diferencias significativas en la supervivencia ni en la toxicidad, aunque sí una mayor preservación de órgano en la aplicación de QT-RT concomitante. Y resultados similares encontró el RTOG en un ensayo con 547 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello ⁵⁰.

Sin embargo, la mayoría de los estudios que avalan esta modalidad, como el de Taylor⁵¹ o Adelstein⁵² entre otros⁵³, incluyen pacientes con tumores de distintas localizaciones de cabeza y cuello, tanto resecables como irresecables, por lo que es difícil alcanzar conclusiones definitivas.

Según la ASCO⁴⁰, la QT-RT concomitante ofrece una tasa de conservación de la laringe mayor que la QT neoadyuvante seguida de RT o la RT aislada. También establece que, en aquellos pacientes no susceptibles de recibir QT, la RT aislada obtiene una tasa de supervivencia similar aunque un menor éxito de preservación de laringe. Su guía clínica no encuentra marcadores consistentes que puedan predecir los resultados de estas terapias, pero recomienda la laringectomía total para aquellos tumores con infiltración de cartílago y partes blandas.

En ambos protocolos se recurre a la laringectomía total como segunda maniobra cuando no hay una buena respuesta del tumor primario, realizándose además vaciamiento cervical bilateral. En el caso de que exista una buena respuesta del tumor primario pero no cervical, se puede tratar aisladamente el cuello mediante vaciamiento ganglionar.

En los últimos años, se están investigando estrategias que emplean la QT de inducción seguida de QT-RT concomitante basándose en la capacidad de la quimioterapia neoadyuvante para reducir las metástasis a distancia y la posibilidad de reducción de recurrencias locales con la concomitante⁵⁴. Autores como Hitt y cols. han comunicado resultados prometedores⁵⁵, aunque todavía son necesarios más ensayos que evalúen esta opción.

Hoy en día, es evidente que no se puede obviar la existencia de estas alternativas al tratamiento quirúrgico que ofrecen unos resultados similares pero una sustancial mejora en la calidad de vida del paciente. Se lleva a cabo un esfuerzo constante por definir

protocolos que alcancen resultados óptimos y, desde la fecha en que fueron tratados los pacientes de nuestra serie hasta hoy, nuevas combinaciones de agentes terapéuticos han sido evaluados con resultados esperanzadores. Así un ensayo randomizado fase III, comunicado por Calais y cols.⁵⁶ en la reunión anual del 2006 de la ASCO, analiza el papel del docetaxel en el tratamiento conservador de carcinomas avanzados de laringe e hipofaringe. Estos autores evalúan una serie de pacientes sometidos a un protocolo de preservación de órgano basado en QT de inducción mediante Fluouracilo- Cisplatino seguida de RT y demuestran una mejor tasa de respuesta y mayor tasa de preservación de órgano en los casos en los que se añade docetaxel a esta combinación de fármacos. Otros autores, como Vermorken y cols.⁵⁷ o Posner y cols.⁵⁸, han analizado el papel de este fármaco en combinación con Cisplatino-Fluouracilo en tumores irresecables de cabeza y cuello demostrando la mejora de la supervivencia global.

Existen otras líneas de investigación que se centran en agentes biológicos y entre ellos se encuentran fármacos como el cetuximab, un anticuerpo monoclonal anti-EGFR, que combinado con RT parece aumentar el control locoregional y reducir la mortalidad en pacientes con carcinoma avanzado de cabeza y cuello⁵⁹.

En cualquier caso, no hay que olvidar que la elección de una u otra modalidad terapéutica debe ser una decisión multidisciplinaria que dependerá de distintos factores como la histología, localización o el estado general entre otros muchos y, por supuesto, de la voluntad del propio paciente y de las posibilidades y experiencia del medio hospitalario.

4. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS

Entre los datos que nos permiten predecir la evolución del carcinoma de laringe se encuentran, como en el resto de localizaciones, una serie de factores que pueden estar relacionados con el paciente, la neoplasia o el tratamiento al que se somete. Clásicamente, la estadificación clínica, la histología y el grado de diferenciación del tumor, así como el estado físico del paciente, se consideran los principales factores pronósticos en el cáncer de laringe. Estos son factores bien conocidos que aportan una información precisa sobre la historia natural de la enfermedad, pero neoplasias con el mismo tipo histológico e idéntico TNM pueden presentar evoluciones diferentes debido a las distintas características biológicas de las células tumorales. Por lo tanto, las características morfológicas de los tumores no pueden explicar el diferente comportamiento, así como la respuesta al tratamiento, en pacientes con el mismo estadio. Surge entonces la necesidad de encontrar nuevos indicadores de progresión tumoral que nos ayuden a comprender el por qué de una mayor o menor supervivencia y las posibilidades de recaída de la enfermedad para, en definitiva, elegir un tratamiento individualizado.

Así, en los últimos años se está intentando identificar factores biológicos para predecir la evolución del tumor y planificar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la supervivencia. De este modo, son muchos los factores pronósticos biológicos estudiados en el cáncer de laringe, entre los que se encuentran el índice de proliferación celular, la ploidía de DNA y la expresión de proteínas y oncogenes.

4.1. Factores celulares y moleculares

Estos son los factores en los que se realiza un mayor esfuerzo investigador en la actualidad y aunque no están introducidos de manera rutinaria en estudios clínicos, ni son determinantes todavía en la selección de pacientes con carcinoma laríngeo para ser incluidos en protocolos terapéuticos, cada vez hay mayor certeza de su importancia futura en la predicción de la evolución de estos tumores.

Entre los múltiples factores que intervienen a nivel molecular en el proceso de desarrollo y proliferación celular, y consecuentemente en el proceso de transformación neoplásica, los oncogenes juegan un papel destacado. Los oncogenes son los genes celulares que en condiciones normales codifican las proteínas que intervienen en el control de la proliferación celular; cuando sufren alguna alteración, se produce una modificación de su función, ya sea por exceso o por defecto, que comporta o facilita el desarrollo neoplásico. Los oncogenes realizan sus funciones a través de las proteínas que sintetizan y pueden ser estimuladores o supresores, existiendo un equilibrio que hace que la célula se reproduzca al ritmo y en el momento adecuado. Mutaciones, reordenamientos, amplificaciones y deleciones conducen a aumentos o pérdidas de la expresión o de la actividad, tanto de unos como de otros, rompiéndose este equilibrio y posibilitándose el desarrollo neoplásico.

A continuación se comentan algunos de los oncogenes, y las proteínas que codifican, habitualmente estudiados en relación al cáncer de laringe.

4.1.1. EGFR

El factor de crecimiento epidérmico ejerce su efecto a través de un receptor tirosinquinasa en la membrana de la célula diana. Este receptor (EGFR), codificado por el gen c-erb-1, está presente en muchas estirpes celulares, encontrándose niveles

especialmente altos en las células epiteliales. Su activación tiene como efecto último la replicación del ADN para la división y proliferación celular, por lo que es el primer escalón en la regulación del crecimiento y diferenciación de las células en que se expresa. Por ello, desarrolla un papel muy importante en la generación y desarrollo de neoplasias, puesto que participa en la proliferación celular y en otros procesos cruciales, como la angiogénesis, la diseminación metastásica y la inhibición de la apoptosis. Este protagonismo se produce por sobreexpresión del receptor o por disminución de los mecanismos de inhibición.

Son muchos los trabajos que han demostrado que las células de diversas neoplasias escamosas ⁶⁰⁻⁶⁴, entre ellas las del cáncer de laringe ^{65,66}, presentan sobre-expresión del EGFR. Se estima que esta sobreexpresión está presente en el 90-100% de los carcinomas de cabeza y cuello ⁶⁷. Al igual que en otras localizaciones, muchos autores han descrito en el carcinoma laríngeo la asociación de un nivel elevado de EGFR con peor pronóstico ⁶⁸⁻⁷³, aunque otros como Wen y cols. ⁷⁴ no han encontrado esta relación. Christensen y cols. ⁷⁵ describieron una mayor presencia de EGFR en células de carcinoma de laringe en relación con un menor grado de diferenciación celular. Almadori y cols. ⁷⁶, en cambio, encontraron sobreexpresión de EGFR en tumores bien diferenciados, coincidiendo con otros trabajos en tumores de cabeza y cuello ⁷⁷, asociándola con mayor índice de recidivas y menor intervalo libre de enfermedad, y estableciendo esta sobreexpresión como un factor pronóstico independiente. Estos mismos autores, en un trabajo posterior, relacionaron significativamente niveles altos de EGFR con un mayor riesgo de metástasis cervicales ⁷⁸. Pivot ⁷⁹ analizó distintos factores pronósticos para la supervivencia global y el intervalo libre de enfermedad en carcinomas avanzados de laringe, tratados con cirugía o preservación de órgano mediante QT seguida de RT, y estableció un importante valor predictivo de la

determinación de EGFR en el segundo grupo, aunque no en los pacientes sometidos a cirugía.

Hay que tener en cuenta que muchos trabajos han sido realizados sobre muestras con pocos pacientes y, con frecuencia, escasamente homogéneas. Morrison y cols.⁸⁰ realizaron un análisis inmunohistoquímico de 100 carcinomas avanzados de laringe y señalaron la dificultad para estandarizar la cuantificación antigénica por inmunohistoquímica (IHQ), lo cual explica que no esté ampliamente establecida la cuantificación del EGFR para la estrategia terapéutica del carcinoma laríngeo.

4.1.2. VEGF

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) juega un papel fundamental en la angiogénesis^{81,82}, promocionando la proliferación celular y el aumento de permeabilidad vascular. Es inducido por situaciones de hipoxia y se une a receptores tirosinquinasa (VEGFR) para estimular a factores angiogénicos. El VEGF se sobreexpresa en carcinomas de cabeza y cuello^{83,84}, y en distintos trabajos se ha relacionado con disminución de la supervivencia en estos tumores⁸⁵, como se confirmó en un reciente metaanálisis⁸⁶.

En cuanto al cáncer de laringe, Parikh y cols.⁸⁷ encontraron una relación significativa entre la sobreexpresión de VEGF y la disminución de la supervivencia en pacientes con carcinomas laríngeos en estadios precoces sometidos a RT, aunque no con la recidiva local ni con el grado histológico, coincidiendo con otros autores⁸⁸. Neuchrist y cols.⁸⁹, en su estudio inmunohistoquímico de tumores laríngeos, no correlacionaron la sobreexpresión de VEGF con el tamaño tumoral ni con la afectación ganglionar, pero observaron una tendencia a mayor riesgo de recidivas y menor supervivencia. Tampoco

encontraron correlación significativa, a pesar de observar esta misma tendencia, Teknos y cols.⁹⁰ en su trabajo con carcinomas avanzados de laringe.

Como se ha comentado, el VEGF se une a receptores tirosincinasa para desempeñar su función, y estos receptores pueden ser de 3 tipos: VEGFR-1, VEGFR-2 o VEGFR-3. El VEGFR-2 o KDR se expresa, junto con el VEGFR-1, específicamente en células endoteliales vasculares y es el receptor principal en la regulación de la permeabilidad, proliferación y diferenciación de las células endoteliales, por lo que se estudia su expresión y el uso de sus inhibidores como posibles agentes terapéuticos.

4.1.3. p53

La p53 es una proteína nuclear localizada en el cromosoma 17 encargada de la regulación negativa de la proliferación celular y de la supresión del fenotipo maligno. Por distintos mecanismos puede perder su función, y el más común es la mutación de su gen, que provoca su inactivación y prolonga su vida media, acumulándose en el núcleo celular y posibilitando su detección mediante inmunohistoquímica.

Estas mutaciones son frecuentes en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, como han demostrado muchos estudios, y puede ser que la inactivación de la proteína sea responsable de mayor resistencia a la apoptosis y, por tanto, a agentes citotóxicos como los empleados en radio o quimioterapia. Apoyando esta hipótesis, existen estudios en los que se ha comprobado la inducción de apoptosis y la sensibilización a estos agentes en tumores de cabeza y cuello tras la introducción de p53 en líneas con déficit de la misma^{91,92}. De acuerdo con ésto, muchos trabajos se ocupan de investigar la implicación que puede tener la p53 en la respuesta al tratamiento con estos agentes de tumores de cabeza y cuello y, por lo tanto, en su utilidad para predecir los resultados de protocolos de conservación de órgano en el carcinoma de laringe. En esta línea, Osman

y cols.⁹³ valoraron la posibilidad de que la inactivación de la vía de la p53 confiriese al tumor resistencia a la apoptosis inducida por la quimioterapia y estudiaron a 170 pacientes sometidos a protocolo de conservación. Los autores, coincidiendo con otros trabajos similares⁹⁴, apreciaron una disminución del control local y de la supervivencia en los casos en que la IHQ detectaba un acumulo nuclear de p53 mayor. Sin embargo, otros estudios establecieron correlación significativa entre la acumulación nuclear de p53 y el éxito de protocolos de conservación; así, el llevado a cabo por Bradford y cols.⁹⁵, con 172 pacientes afectos de carcinoma avanzado de laringe, demostró una preservación del órgano significativamente mayor en el grupo de pacientes con tumores que sobreexpresaban p53. Esta divergencia en las conclusiones puede deberse a la variedad de factores implicados en las determinaciones inmunohistoquímicas de la p53 y a que su sobreexpresión puede no corresponderse siempre con la alteración de su gen, como lo demostró este mismo grupo en un trabajo posterior⁹⁶ en acuerdo con otros⁹⁷. La elección de los umbrales es a menudo arbitraria, existiendo un alto número de falsos positivos y falsos negativos cuando se recurre a esta técnica para correlacionar los niveles de proteína p53 con alteraciones de su gen.

En cuanto a la posible relación entre la COX2 y la p53, existen investigaciones que señalan la contribución de las mutaciones de p53 en el incremento de expresión de COX2 observado en tejidos malignos, apuntando la posibilidad de que la inducción de la misma por parte de oncogenes, factores de crecimiento, etc. pueda ser potenciada por estas mutaciones^{98,99}.

4.1.4. Ki 67

Ki 67 es un marcador de proliferación celular y su expresión es más elevada en los carcinoma laríngeos que en el tejido normal o las lesiones premalignas¹⁰⁰. Hay trabajos

¹⁰¹ que han estudiado el Ki67 como posible marcador de transformación maligna en displasias laríngea, pero no han sido concluyentes.

Urpegui y cols. ¹⁰² relacionaron la sobreexpresión de Ki 67 en el carcinoma laríngeo con el grado histológico y la afectación de ganglios linfáticos, coincidiendo con Golusinski y cols. ¹⁰³ que además encontraron, en su estudio de 120 casos, correlación significativa con el estadio T y propusieron al Ki67 como factor pronóstico independiente. Mielcarek-Kuchta y cols. ¹⁰⁴ también relacionaron la sobreexpresión con el estadio T, aunque no con el resto de la clasificación TNM.

Otros trabajos, como el de Roland y cols. ¹⁰⁵, no encontraron valor predictivo en la expresión de Ki 67 en carcinomas de cabeza y cuello.

Se han investigado también marcadores habituales en otras neoplasias, como MYC, Ras ¹⁰⁶, bcl-1 y ciclina D1 ¹⁰⁷, bcl -2 ¹⁰⁸ o cadherina E entre otros, pero los trabajos sobre su valor como factor pronóstico en el carcinoma laríngeo son contradictorios y poco reveladores.

5. CICLOOXIGENASA-2

La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico. Existen 2 tipos de ciclooxigenasa: la COX1 y la COX2, que se diferencian en distintos aspectos.

La COX1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y media la producción de PG que controlan funciones fisiológicas. La COX2, en cambio, es indetectable en la mayoría de tejidos y su actividad es inducida por estímulos proinflamatorios y mitógenos, como citoquinas o factores de crecimiento, incrementando la síntesis de PG en tejidos inflamatorios y neoplásicos.

Se han demostrado incrementos en la expresión de la COX2 en enfermedades inflamatorias ¹⁰⁹⁻¹¹² y en distintas neoplasias como carcinomas de colon ¹¹³, estómago ^{114,115}, esófago ¹¹⁶⁻¹²¹, mama ¹²²⁻¹²⁶, pulmón ¹²⁷, hígado, ovario ¹²⁸ y páncreas. En cambio, los niveles de COX1 son muy similares en tejidos normales y tejidos tumorales ¹¹³⁻¹¹⁶.

Willoughby y colaboradores describen una tercera enzima, la COX-3, responsable de la producción de prostanoïdes antiinflamatorios ¹²⁹.

5.1. COX2 y cáncer

Puesto que existen estas evidencias de que la COX2 se encuentra comúnmente sobreexpresada en tumores, se piensa que está implicada en el desarrollo de cáncer a través de los efectos de oncogenes, factores de crecimiento y promotores tumorales que son conocidos inductores de la actividad de esta enzima.

Se han demostrado incrementos importantes de COX2 en neoplasias malignas, y también en tejidos premalignos, por lo que se piensa que la enzima puede estar implicada en las etapas iniciales del proceso carcinogénico.

En las últimas décadas, se han realizado numerosos estudios que investigan la relación entre la sobreexpresión de COX2 y la carcinogénesis. Muchos datos proceden de experimentos genéticos, como los llevados a cabo por Liu y cols.¹³⁰ con ratones transgénicos que sobreexpresaban el gen de la COX2 humano en glándulas mamarias; estos autores detectaron una alta frecuencia de hiperplasia, displasia y transformaciones neoplásicas malignas en hembras multíparas. También existen planteamientos farmacológicos que apuntan hacia esta dirección¹³¹, y así, se ha reducido la formación de tumores en diferentes localizaciones (intestino, vejiga o amígdala) en animales tratados con inhibidores selectivos de la COX2, como celecoxib o rofecoxib. Sin embargo, la mayoría de autores recurren a la inmunohistoquímica para esclarecer esta relación.

Por otro lado, también puede existir una relación causal entre el aumento de la actividad de la COX2 y la progresión tumoral. A continuación se exponen distintos procesos que son importantes en ésta y en los que se investiga la implicación de la COX2.

5.1.1. Angiogénesis

En el crecimiento de un tumor es fundamental la capacidad de angiogénesis. La vascularización angiogénica de neoplasias epiteliales de mama, pulmón, colon, próstata, páncreas y escamosas de cabeza y cuello expresa COX2. También en vasos sanguíneos de metástasis de carcinoma de colon y en ganglios linfáticos con metástasis de carcinoma pancreático se ha detectado COX2.

La importancia potencial de la COX2 en la angiogénesis se ha comprobado en células tumorales que la expresan, cuyo crecimiento es mayor en comparación con otras que no lo hacen ¹³². La inmunohistoquímica revela la expresión de COX1 solo en endotelio de vasos normales, en reposo, mientras que la de COX2 en células que participan en la angiogénesis responsable de cáncer ¹³³.

La angiogénesis no depende de un solo mediador o tipo de célula; de hecho diferentes células, enzimas y pequeñas moléculas interactúan en secuencia, a menudo iniciada por la liberación de factores de crecimiento angiogénicos. El factor de crecimiento vascular (VEGF) es el más importante de ellos. Muchos trabajos proponen una interacción entre la COX2 y el VEGF en el desarrollo de la angiogénesis. Así, Cheng y cols. ¹³⁴ afirmaron que las PG pueden regular la expresión de VEGF y demostraron la importante relación entre la actividad de la COX2 y éste último en la estimulación del proceso angiogénico, coincidiendo con otros autores ^{135,136}. Tsujii y cols. ¹³² comprobaron in vitro que la sobreexpresión de COX-2 en células de carcinoma de colon aumentaba la producción de factor de crecimiento endotelial, la migración de células endoteliales a través de la matriz de colágeno y la formación de neocapilares.

Así pues, la COX2 parece jugar un importante papel en la liberación y activación de factores proangiogénicos, aumentando la producción de eicosanoides como TXA2, PGI2 y PGE2 que estimulan la migración de células endoteliales y la angiogénesis ¹³⁷. Como el crecimiento de los tumores y metástasis parece depender de ésta ^{138,139}, los inhibidores de la COX2 podrían suponer un arma útil en la terapéutica contra el cáncer. La indometacina, inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas, bloquea la angiogénesis en modelos experimentales ¹⁴⁰⁻¹⁴². Masferrer y cols. ¹⁴³ comprobaron este efecto del fármaco en el estroma de córneas de ratones y ratas; después analizaron los resultados tras utilizar inhibidores selectivos de la COX1 y la COX2 (SC-560 y SC-236

respectivamente) y encontraron que los primeros se mostraron totalmente ineficaces en el bloqueo de la angiogénesis (aunque inhibieron la acción sobre plaquetas y mucosa gástrica de la COX1 en estos roedores), mientras que los inhibidores selectivos de la COX2 fueron muy efectivos.

Según Sawaoka y cols.¹⁴⁴, el crecimiento tumoral y la angiogénesis pueden ser detenidos con inhibidores selectivos de la COX2 sólo cuando las células tumorales expresan el enzima, y ésto refuerza la hipótesis que implica la COX2 en la angiogénesis tumoral.

5.1.2. Apoptosis

La progresión de la población celular maligna depende del balance entre la proliferación y la muerte celular. Según trabajos como los de Fosslien¹⁴⁵ o Tsujii y cols.¹⁴⁶, la sobreexpresión de COX2 en las células tumorales podría conferir resistencia a la apoptosis rompiendo este equilibrio.

Así, en tejidos mamarios tumorales de ratas transgénicas, se han detectado cantidades bajas de proteínas proapoptoicas e incrementos de proteínas antiapoptoicas, como la Bcl-2, uno de los inhibidores de apoptosis más conocidos, en presencia de sobreexpresión de COX2¹³⁰.

Además, en trabajos con animales de experimentación, se ha comprobado que los inhibidores selectivos de la COX2 inducen la apoptosis e inhiben el crecimiento de varios tipos de células cancerígenas^{147,148}. Sheng y cols.¹⁴⁹ pensaron que la reducción de Bcl-2 podía ser uno de los mecanismos de la actividad proapoptoica de estos fármacos.

Estos datos sugieren la relación entre la COX2 y la disminución de la muerte celular, prolongando la supervivencia de células anormales y, por lo tanto, incrementando la progresión tumoral.

5.1.3. Invasión

La COX2 es importante en la modulación de las propiedades invasivas de los tumores. Cuando se sobreexpresa la COX2 en líneas de células tumorales, aumenta la producción de PG y las células se hacen más invasivas.

En un trabajo, llevado a cabo por Dohadwala y cols.¹⁵⁰, se asoció la sobreexpresión de COX2 en neoplasias pulmonares con cantidades elevadas de CD44 (receptor celular de superficie para hialuronato), y el bloqueo específico del mismo disminuyó significativamente la capacidad de invasión de las células tumorales.

La enzima también aumenta la producción de metaloproteinasas que digieren el colágeno y que confieren mayor capacidad invasiva y de metástasis a las células tumorales¹⁵¹.

5.1.4. Inflamación e inmunosupresión

La inflamación crónica es un conocido factor de riesgo para la aparición de un carcinoma epitelial. La inflamación está asociada al incremento de síntesis de PG, mediante la inducción de la COX2, y esto podría proporcionar una base teórica para la relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis.

La inmunosupresión también se asocia clásicamente a la aparición de neoplasias. Factores secretados por células tumorales inducen la síntesis de PGE2, principal producto de la COX2, por parte de monocitos y macrófagos, y ésta inhibe la inmunoregulación de linfocitos, la proliferación de células T y B, la actividad de

células NK y la producción de factores de necrosis tumoral, mientras que estimula la producción de interleucina (IL) 10, con efectos inmunosupresores. Se piensa que los inhibidores selectivos de la COX2 podrían restablecer el balance entre IL 10 e IL12.

En conclusión, muchos autores analizan la implicación de la COX2 en el desarrollo y progresión de neoplasias. Sus inhibidores podrían frenar el crecimiento tumoral a través de los distintos mecanismos ya comentados, principalmente mediante la disminución de la angiogénesis y la actividad proapoptoica ¹¹⁸, si bien no está establecido el protagonismo real de cada uno. De este modo, diversos estudios ¹⁵¹⁻¹⁵⁷ los consideran posibles agentes terapéuticos beneficiosos en el tratamiento y prevención del cáncer y analizan los efectos de la combinación de los inhibidores selectivos de la COX2 con agentes citotóxicos o con radioterapia fraccionada ¹⁵⁸. Si esto fuese así, sería fundamental la búsqueda de biomarcadores que permitiesen seleccionar los pacientes susceptibles de un mayor beneficio con el uso de estos fármacos.

5.2. COX-2 y Cáncer de cabeza y cuello

Aunque en los años 80 comenzaron a aparecer publicaciones que se ocupaban del papel de las prostaglandinas en los carcinomas de cabeza y cuello y de la sobreexpresión de la COX2 ^{159,160}, la bibliografía disponible sobre la participación de la enzima en los procesos tumorales de este territorio es más escasa que en otras localizaciones, como en la mama o el colon, donde existen numerosas investigaciones que la relacionan con factores clínicopatológicos bien conocidos. Esta bibliografía es aun más reducida en el caso del cáncer de laringe.

Un trabajo realizado por Lee y cols. ¹⁶¹ reveló un incremento estadísticamente significativo de la expresión de la COX2 en carcinomas escamosos de cabeza y cuello,

demostrando además una inhibición en el crecimiento de estos tumores mayor con NS-328 (inhibidor selectivo de COX2) que con indometacina. En esta línea, Gallo y cols.¹⁶² seleccionaron 52 pacientes con carcinoma escamoso de cabeza y cuello y consideraron la sobreexpresión de la COX2 como un factor pronóstico de menor supervivencia. Estos mismos autores demostraron posteriormente la correlación significativa entre los niveles de COX2 y la vascularización tumoral y densidad de microvasos, así como con el VEGF en tumores de este territorio¹⁶³. Peng y cols.¹⁶⁴ confirmaron la sobreexpresión de COX2 en los carcinomas escamosos de hipofaringe y relacionaron su incremento con la invasión linfática mediante un estudio que recurrió a la inmunohistoquímica y la detección de RNAm de COX2. También en lesiones premalignas de esta región, se han evidenciado incrementos de COX2 mediante inmunohistoquímica¹⁶⁵ o técnicas moleculares (hibridación in situ, PCR), como las llevadas a cabo por Robinson y cols.¹⁶⁶ en casos de papilomatosis recurrente de laringe.

En cuanto a los tumores laríngeos, como se ha mencionado, las investigaciones en relación a la COX2 son escasas y poco concluyentes. Ranelletti y cols.¹⁶⁷ realizaron un estudio inmunohistoquímico de tumores laríngeos y lograron resultados contradictorios con los obtenidos en otras localizaciones. Estos autores relacionaron la sobreexpresión de la enzima con una mayor diferenciación histopatológica (grados 1-2) y con una mayor supervivencia, lo que sugirió un comportamiento más agresivo en las neoplasias COX2 negativas. Bayazit y cols.¹⁶⁸ también recurrieron a la inmunohistoquímica para detectar sobreexpresión de la enzima en distintos grados en una serie de 39 carcinomas laríngeos, sin encontrarla en el tejido sano. Sin embargo, no establecieron una correlación entre ésta y parámetros clínicos como la localización, el estadio o la supervivencia.

En el 2004, Nix y cols.¹⁶⁹ estudiaron un grupo de pacientes diagnosticados de cáncer laríngeo en estadios I-II y establecieron relación entre la sobreexpresión de la COX2 y la radioresistencia. Estos autores apuntaron la posibilidad de su utilización para recomendar tratamiento quirúrgico a los pacientes con positividad en el estudio inmunohistoquímico de la enzima y el uso de inhibidores selectivos para favorecer la respuesta a la radioterapia. También ese año, Cho y cols.¹⁷⁰ se ocuparon de tumores laríngeos en estos estadios tratados con radioterapia primaria y observaron relación significativa entre la sobreexpresión de la COX2 y la recidiva local, aunque no con la supervivencia global.

En definitiva, la actividad de la COX2 en el carcinoma laríngeo no está lo suficientemente analizada y no contamos con conclusiones establecidas de la posible utilidad del enzima como marcador biológico o de sus inhibidores como agentes útiles en su tratamiento, y de ahí el interés del presente estudio en investigar la correlación de su expresión con los distintos factores clinicopatológicos y con otros conocidos marcadores.

II.OBJETIVOS.

El propósito de este estudio es valorar el papel pronóstico y/o predictivo de la sobreexpresión de la ciclooxigenasa-2 en un grupo de pacientes con cáncer avanzado de laringe tratados homogéneamente, con un protocolo de conservación mediante la combinación de QT de inducción seguida de RT secuencial, con los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar la incidencia de sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 en el carcinoma avanzado de laringe.
- 2.- Analizar el papel de ciclooxigenasa-2 como marcador biológico de progresión tumoral (grado de diferenciación histológica, estadio clínico, etc.).
- 3.- Establecer el significado pronóstico de ciclooxigenasa-2 en parámetros de eficacia terapéutica del protocolo de conservación como la respuesta a la QT, la posibilidad de recidiva/progresión, la preservación de la laringe y la supervivencia global.
- 4.- Valorar la interrelación de ciclooxigenasa-2 con otros conocidos factores biológicos que participan en la génesis y progresión del cáncer de laringe (receptor del factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento del endotelio vascular y su receptor KDR).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE

En este estudio se han incluido 59 pacientes consecutivos diagnosticados de carcinoma escamoso de laringe en los servicios de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Virgen de la Victoria de Málaga, Hospital de la Serranía de Ronda y Hospital Costa del Sol de Marbella entre 1988 y 2003. Todos ellos cuentan con una confirmación histológica mediante estudio en hematoxilina-eosina de biopsias obtenidas bajo microcirugía endolaríngea.

Todos los pacientes fueron evaluados en el Comité Oncológico de Tumores de Cabeza y Cuello, constituido en el Hospital Virgen de la Victoria de Málaga, que reúne a especialistas de Otorrinolaringología (ORL), Oncología Médica, Oncología Radioterápica y Anatomía Patológica con el objeto de tomar decisiones multidisciplinarias sobre la actitud terapéutica en cada caso clínico de neoplasia en este territorio. Tras valoración en este Comité y con el diagnóstico de cáncer de laringe avanzado (estadios III y IV) resecable, se incluyeron en un protocolo de conservación de laringe implantado en nuestro centro, siguiendo posteriormente un programa establecido de revisiones periódicas y exploraciones complementarias en los Servicios de ORL y Oncología Médica. El periodo de seguimiento fue el comprendido desde el momento del diagnóstico histológico hasta su fallecimiento o hasta el 31 de Diciembre del 2006, fecha de la última actualización de la base de datos confeccionada para este estudio.

1.1. Criterios de inclusión

Los criterios de selección de esta serie han sido los siguientes:

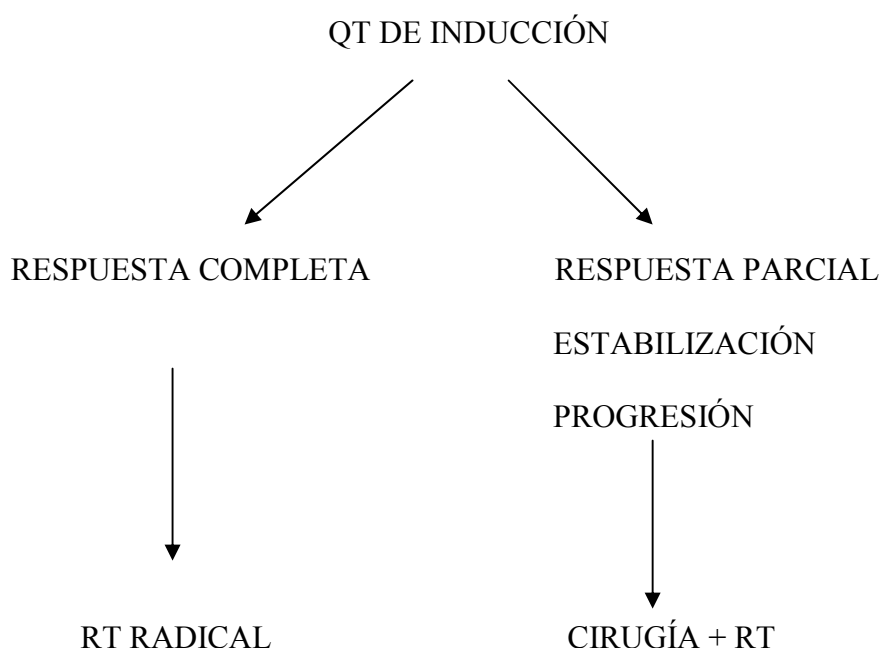
- 1- Diagnóstico de carcinoma de laringe no tratado previamente.
- 2- Estadios avanzados (III-IV) resecables.
- 3- Pacientes incluidos en protocolo de conservación de laringe en fechas previas al 30 de Junio del 2003.

Por lo tanto, se han excluido tumores en estadios iniciales, lesiones irresecables y neoplasias avanzadas resecables no sometidas a protocolo de conservación de órgano. Se estableció el 30 de Junio del 2003 como fecha límite de inclusión en la base de datos con el objeto de conseguir un seguimiento mínimo de 42 meses para todos los pacientes.

1.2. Protocolo de conservación de laringe

El protocolo de conservación de laringe implantado en nuestro centro se basó en el descrito en el estudio sobre el cáncer de laringe del Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group ⁴¹ modificando la actitud recomendada en caso de respuesta parcial a la QT. En el ensayo realizado por este grupo, se sometió a RT a los pacientes que obtuvieron al menos una respuesta parcial a la quimioterapia, mientras en nuestro protocolo se recurrió a la cirugía siempre que la respuesta no fue completa.

Así, nuestro protocolo consistió en la aplicación de quimioterapia de inducción como primera maniobra terapéutica, eligiendo la segunda en función de la respuesta a estos agentes según la siguiente secuencia:



De acuerdo con esto, aquellos pacientes seleccionados en el comité oncológico de nuestro centro para ser sometidos a protocolo de preservación de órgano recibieron quimioterapia de inducción durante 3 ciclos de 5 días cada uno separados 3 semanas entre sí según el siguiente esquema terapéutico:

- Cisplatino (CDDP) 100 mg/m² intravenoso (el primer día del ciclo) + 5-Fluoruracilo 1000 mg/m² / día en infusión continua (durante los 5 días del ciclo).

Las respuestas a la QT fueron valoradas a las 4 semanas del fin de la misma y catalogadas como respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), estabilización o progresión según los criterios de la OMS ¹⁷¹.

Los pacientes que alcanzaron una respuesta completa recibieron tratamiento con RT radical. La dosis de irradiación sobre el tumor primario y ganglios clínicamente

positivos fue de 70 Gy administrados en 35 fracciones de 2 Gy cada una durante un período de siete semanas. Todo el cuello, incluyendo las áreas supraclaviculares y la región cervical posterior, fue irradiado con un mínimo de 50 Gy. La dosis para los ganglios clínicamente positivos se suplementó con campos de electrones que cubrían el tumor primario o con campos tangenciales antero-posteriores.

Los pacientes que presentaron respuesta parcial, estabilización o progresión de la enfermedad fueron sometidos a cirugía radical + RT postoperatoria.

La cirugía radical consistió en laringectomía total, excepto en los tumores T3 localizados en el vestíbulo laríngeo sin extensión al tercio posterior de bandas, ventrículo, aritenoides, comisura anterior o plano glótico y sin antecedentes que pudieran predecir posteriores alteraciones de la deglución o posibles aspiraciones, en los que se realizó laringectomía horizontal supraglótica ¹⁷².

Además, se practicó vaciamiento cervical extirpando las áreas ganglionares de los niveles I-V y el tejido conjuntivo circundante. La técnica empleada fue el vaciamiento cervical funcional bilateral (o vaciamiento radical modificado tipo III) en las neoplasias N0 o aquellas N1 o N2 sin sospecha de metástasis ganglionar extracapsular ¹⁷³, reservándose el vaciamiento cervical radical para el resto de los casos ¹⁷⁴.

La RT postoperatoria se administró en dosis fraccionadas de 2 Gy en 5 sesiones semanales. Los tratamientos fueron realizados con un acelerador lineal de 4 a 6 MV utilizando técnicas isocéntricas. El tumor primario y las cadenas linfáticas con riesgo de afectación recibieron una dosis de más de 54 Gy en 27 fracciones en un periodo de 5 semanas y media. Las regiones con alto riesgo de diseminación maligna, o con márgenes de resección afectos, recibieron una sobreimpresión de 12 Gy (66 Gy en total) en 33 fracciones en un periodo de seis semanas y media. La dosis sobre médula espinal fue limitada a 45 Gy.

El protocolo contemplaba la opción de cirugía radical para aquellos pacientes, con respuesta completa a la quimioterapia, que rechazasen el tratamiento radioterápico como 2ª maniobra.

A aquellos pacientes que presentaron respuesta parcial y se negaron a ser intervenidos, se les propuso la opción de recibir RT radical. A partir de 1999, a los enfermos en esta situación, siempre que fueran menores de 70 años y con ECOG 0-1, se les administró también QT concomitante. La secuencia terapéutica en estos casos fue la siguiente:

- RT concomitante con CDDP 100 mg/m² los días 1, 22, 43 de la misma.

El tratamiento de la recidiva/progresión en pacientes con laringe conservada fue cirugía de rescate, recurriendo de nuevo a la laringectomía con vaciamiento cervical bilateral en las locales y al vaciamiento cervical en aquellos donde la recidiva/progresión fue regional.

Los pacientes laringectomizados que presentaron recidiva/progresión fueron sometidos a RT si no habían sido irradiados previamente.

1.3. Seguimiento

Durante la aplicación del protocolo de conservación de laringe, se realizó exploración física y endoscópica por ORL después de cada ciclo de QT y una TAC cervical tras el tercer ciclo y a los 3 meses del fin de la RT.

Tras la finalización del protocolo, todos los pacientes siguieron revisiones rutinarias en las consultas de ORL y Oncología que incluyeron valoración endoscópica así como la realización de exploraciones complementarias, tanto de laboratorio como de imagen, según la siguiente periodicidad:

Año 1º:

- Exploración física y endoscópica cada 2 meses.
- Radiografía (Rx) de tórax y analítica general anuales.
- TAC cervical si existía duda de recidiva ganglionar.

Año 2º:

- Exploración física y endoscópica cada 4 meses.
- Rx tórax y analítica general anuales.
- TAC cervical si existía duda de recidiva ganglionar.

Año 3-4º:

- Exploración física y endoscópica cada 6 meses.
- Rx tórax y analítica general anuales.

A partir del 5º:

- Exploración física y endoscópica anuales.
- Rx tórax y analítica general anuales.

2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

Se practicaron cortes a 5 micras, de cada uno de los casos incluidos en el estudio, en portas silanizados DAKO ChemMate™, capilares, con 75 micras de espacio entre dos portas contrapuestos. La tinción inmunohistoquímica se realizó en un teñidor automático (DAKO TechMate Horizonte) a través de capilaridad.

Se utilizaron diversos anticuerpos, que a continuación se especifican, y un sistema de visualización (Universal LSAB, DAKO) constituido por un anticuerpo secundario biotinilado (frente a Ig de ratón o conejo, dependiendo del tipo de anticuerpo), enzima peroxidasa conjugada con estreptavidina y diaminobencidina como cromógeno.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- EGFR: para su detección inmunohistoquímica se recurrió a un anticuerpo monoclonal de ratón, clona 2-18C9, prediluido, de DakoCytomation SA, Barcelona.
- VEGF: para la cuantificación de VEGF se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón, clona C-1, SC7269, de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, que se corresponde con los aminoácidos 1-140 de la molécula de VEGF humano. Para este anticuerpo se usó una dilución 1:900 y se precisó incubación overnight en una habitación a 4°C.
- KDR: para su detección inmunohistoquímica se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón, clona sc-6251, de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA con una dilución 1:500 e incubación overnight en una habitación a 4°C.
- Ciclooxygenasa-2: para su detección inmunohistoquímica se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón, COX2, diluido a 1:900, de Cayman Chemical, Montigny le Bretonneux.

El protocolo aplicado fue el siguiente:

1. Desparafinado mediante xilol e hidratación con alcoholes decrecientes hasta agua destilada.
2. Técnica de recuperación antigénica mediante olla a presión ultrarrápida con tampón citrato a pH 6.
3. Mantener las preparaciones en agua destilada, para atemperar a temperatura ambiente los cortes.
4. Colocación de los portaobjetos, con sus controles correspondientes, en el teñidor automático, en donde siguen el siguiente proceso:
 - Lavado con buffer (PBS) durante 3 minutos.
 - Incubación con anticuerpo primario durante 20 minutos.
 - Lavado con PBS durante 4 minutos.
 - Incubación con anticuerpo secundario biotinilado durante 20 minutos.
 - Lavado con PBS durante 20 minutos.
 - Inmersión en solución peroxidasa bloqueante durante 7'5 min.
 - Lavado con PBS durante 2 minutos, 45 segundos.
 - Incubación con conjugado estreptavidina – peroxidasa durante 25 minutos.
 - Lavado con PBS durante 4 minutos.
 - Incubación con cromógeno (DAB) durante 5 minutos.
 - Lavado con PBS durante 2 minutos, 15 segundos.
 - Incubación con cromógeno durante 5 minutos.
 - Lavado con PBS durante 2 minutos, 15 segundos.
 - Incubación con cromógeno durante 5 minutos.
 - Lavado con PBS durante 1 minutos, 50 segundos.
 - Contratinción con hematoxilina durante 1 minutos.

- Lavado con PBS durante 4 minutos, 50 segundos.
 - Lavado con agua destilada 1,5 minutos.
5. Deshidratación en alcoholes de gradación creciente, inmersión en xilol y montaje permanente con DPX.

Valoración de los resultados inmunohistoquímicos:

La expresión de EGFR en las células tumorales se valoró de 0 a 3+:

0: ausencia de tinción

1+: débil tinción

2+: moderada tinción

3+: tinción fuerte

Se consideraron dos grupos:

- Menos de +++
- +++

La expresión de VEGF en las células tumorales se valoró de 0 a 3+:

0: ausencia de tinción

1+: débil tinción

2+: moderada tinción

3+: tinción fuerte

Se consideraron dos grupos:

- Ausencia de tinción o tinción débil
- Tinción moderada o intensa

La expresión de KDR en las células tumorales se valoró de 0 a 3+:

0: ausencia de tinción

1+: débil tinción

2+: moderada tinción

3+: tinción fuerte

Se consideraron dos grupos:

- Ausencia de tinción o tinción débil
- Tinción moderada o intensa

Para la cuantificación de COX-2 utilizamos el método descrito por Davies y cols.¹⁷⁵. La expresión de COX-2 fue evaluada, de manera semicuantitativa, valorando la intensidad de tinción citoplásmica clasificada en:

- 0: Ausencia de tinción
- 1: débil tinción
- 2: moderada tinción
- 3: fuerte tinción

Posteriormente se realizó una estimación del porcentaje de células positivas para cada intensidad en 10 campos de gran aumento. Se multiplicó el porcentaje de células que presentaba cada intensidad de tinción, y el resultado se sumó obteniendo un valor que oscilaba de 0 a 300. Finalmente, se consideró:

- Negativo: 0 a 100
- Positivo: 101 a 300

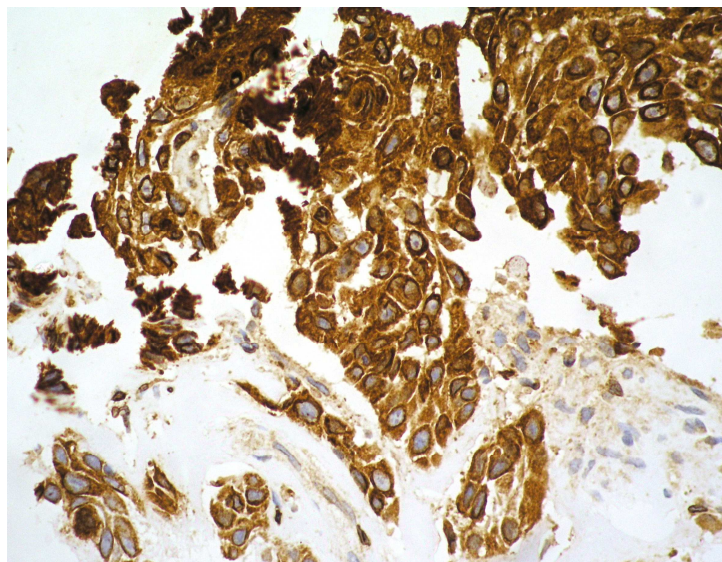


Imagen: Tinción positiva para COX2

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La serie consta de 59 pacientes que se han introducido en una base de datos confeccionada en el programa Access 2003 incluyendo un total de 69 variables referentes al paciente, neoplasia y estudio inmunohistoquímico de las biopsias, así como del tratamiento administrado, tasas de respuesta al mismo y estado final. A cada paciente se le asignó un número identificador incluido en un formulario principal denominado “Datos Personales”, al que se vincularon el resto de los subformularios que recogen las distintas variables cuantitativas, cualitativas y tipo fecha o texto con sus respectivas categorías. Los datos recabados se procesaron mediante el programa SPSS 15.0 para su análisis estadístico.

Todas las variables consideradas se sometieron previamente a un estudio estadístico descriptivo básico. Las variables cuantitativas fueron evaluadas por su valor numérico real, tomando la media aritmética y la desviación típica como parámetros de centralización y dispersión respectivamente. Las variables cualitativas se distribuyeron en categorías calculando las frecuencias absolutas y relativas de cada una de ellas.

Posteriormente, mediante aplicación de métodos estadísticos univariantes, se asociaron las distintas variables entre sí con el objeto de conocer la interrelación entre las principales características tumorales y del propio paciente con los aspectos clínico-terapéuticos más relevantes y, por supuesto, con la COX2 y resto de marcadores detectados por IHQ (EGFR, VEGF, KDR). Las variables cualitativas se evaluaron por medio de tablas de contingencia, aplicando el test de Chi cuadrado o mediante la prueba del estadístico exacto de Fisher, considerando siempre que las celdas tuviesen una frecuencia esperada mayor de 5 (porcentaje inferior al 30%). En las variables cuantitativas, para comparar la igualdad o no de los valores en los grupos analizados, se

comprobó previamente la normalidad e igualdad de la varianza. Si se aceptaba la hipótesis nula (de igualdad de estadísticos), se aplicó el test de la T de Student (en todos los casos la variable categórica tenía dos grupos). Del mismo modo, para establecer la correlación entre variables continuas se empleó el coeficiente de Pearson. En todos los casos, se tomó como valor estadísticamente significativo $p < 0.05$ o nivel de confianza del 95%.

En todos los pacientes, se estudió mediante curvas de Kaplan-Meier la supervivencia global (SVG), considerando el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta la muerte del paciente y el tiempo hasta la primera recidiva y/o progresión (TLP). Estos tiempos se relacionaron con variables clínico-terapéuticas y tumorales seleccionadas, y las curvas resultantes se compararon mediante los test de Long-Rank y Wilcoxon con el objeto de conocer las diferencias significativas.

No se llevaron a cabo estudios multivariantes por el pequeño tamaño de la muestra y amplio número de variables.

IV.RESULTADOS

1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

1.1. Características generales

Esta serie consta de 59 pacientes con un claro predominio de varones (57 pacientes) y una edad media en el momento del diagnóstico histológico de 58 años (mediana de 58 años con rango de 39 a 73).

Todas las neoplasias corresponden a carcinoma escamoso de laringe, siendo la localización supraglótica la más frecuente (68%) seguida de la glótica (31%).

Según el sistema de estadificación propuesto por la AJCC ¹⁷⁶, 28 de los tumores se encontraban en estadio III mientras que 31 en estadio IV.

Tabla 1: Estadio tumoral

ESTADIO III	28 (47%)
ESTADIO IV	31 (53%)

Si consideramos el estadio T de la clasificación TNM de la AJCC ¹⁷⁶, el 68% de las neoplasias fueron catalogadas como T3, seguidas por un 25 % de T4, siendo escasos los tumores en estadios T1 y T2.

Tabla 2: Categoría T

T1	3 (5%)
T2	1 (2%)
T3	40 (68%)
T4	15 (25%)

En cuanto a la afectación ganglionar, la mayoría de los tumores (48%) no presentaba adenopatías en el momento del diagnóstico.

Tabla 3: Categoría N

NO	28 (47%)
N1	6 (10%)
N2A	8 (13%)
N2B	2 (3%)
N2C	9 (15%)
N3	6 (10%)

Atendiendo al grado histológico, en nuestra muestra los pobremente diferenciados han sido algo más frecuentes (39%) que los moderadamente (25%) o bien diferenciados (36%).

Tabla 4: Grado histológico

GRADO 1	21 (36%)
GRADO 2	15 (25%)
GRADO 3	23 (39%)

1.2. Marcadores inmunohistoquímicos

Las variables hacen referencia al estudio inmunohistoquímico de las piezas de biopsia obtenidas bajo microcirugía endolaríngea y al análisis de la sobreexpresión de los distintos factores incluidos en el estudio según la metodología previamente descrita.

La presencia de COX2 fue analizada en las biopsias de todos los pacientes de la serie, encontrándose una expresión positiva en el 44 % frente al 56 % que no la presentaron.

El escaso material biológico, obtenido mediante microcirugía endolaríngea, imposibilitó la valoración del resto de marcadores de este estudio en todas las biopsias por falta de tejido, y así, la detección de EGFR y VEGF sólo fue posible en 49, mientras que el KDR (VEGFR-2) pudo ser analizado en 52 muestras.

VEGF presentó una expresión moderada-intensa en 30 de las 49 piezas examinadas (61%). Su receptor KDR lo hizo en 30 de las 52 biopsias en que pudo ser estudiado (58%).

En cuanto al EGFR, en 9 muestras se constató ausencia de tinción, en 6 una tinción débil y en otras 6 una tinción moderada, mientras 28 de las 49 biopsias analizadas (57%) presentaron una tinción intensa (+++).

Tabla 5: Expresión de COX-2

COX2 NEGATIVO	33 (56%)
COX2 POSITIVO	26 (44%)

Tabla 6: Expresión de VEGF

VEGF nula-baja	19 (39%)
VEGF moderada-intensa	30 (61%)

Tabla 7: Expresión de KDR

KDR nula-baja	22 (42%)
KDR moderada-intensa	30 (58%)

Tabla 8: Expresión de EGFR

EGFR menor de +++	21 (43%)
EGFR +++	28 (57%)

1.3. Tratamiento y evolución clínica

Al finalizar la quimioterapia, 29 pacientes (49%) presentaron una respuesta completa y 19 (32%) una respuesta parcial. En 6 pacientes (10%) se constató estabilización de la enfermedad y en 5 progresión tumoral (8%).

Tabla 9: Respuesta a Quimioterapia

RC	29 (49%)
RP	19 (32%)
ESTABILIZACIÓN	6 (10%)
PROGRESIÓN	5 (8%)

Todos los pacientes con respuesta completa a la QT recibieron RT radical como segunda maniobra terapéutica, obteniendo una remisión completa de la enfermedad evaluada 3 meses tras la última sesión radioterápica en el 93% (27 pacientes). El 41 % (11 pacientes) de estos pacientes fueron diagnosticados posteriormente de recidiva tumoral.

Tabla 10: Respuesta a RT radical (tras respuesta completa a QT)

2ª MANIOBRA tras RC a la QT	REMISIÓN COMPLETA	RECIDIVA tras RC (% del grupo con RC)
RT RADICAL (29 PACIENTES)	27 (93 %)	11 (41 %)

De los 19 pacientes con respuesta parcial y, por lo tanto, candidatos a cirugía, ésta solo se llevó a cabo en 7 por negativa a la misma del resto, que fueron sometidos a RT +/- CDDP concomitante. El 75 % (9 pacientes) de los enfermos sometidos a esta secuencia terapéutica, por rechazo a la cirugía, alcanzaron remisión completa evaluada 3 meses tras el fin de dicho tratamiento frente al 86 % (6 pacientes) de los pacientes intervenidos que se encontraron en esta circunstancia. El 33 % (3 pacientes) del primer grupo desarrolló una recidiva posteriormente mientras tan solo el 14 % (1 paciente) del segundo lo hicieron.

Tabla 11: Respuesta a 2ª maniobra tras respuesta parcial a QT

2ª MANIOBRA tras RP a la QT	REMISIÓN COMPLETA	RECIDIVA tras RC (% del grupo con RC)
CIRUGÍA (7 PACIENTES)	6 (86%)	1 (17 %)
RT +/- CDDP (12 PACIENTES)	9 (75%)	3 (33%)

Todos los pacientes con estabilización de la enfermedad tras QT fueron sometidos a cirugía radical +/- RT postoperatoria, evaluándose una respuesta final de remisión completa en el 83 % (5 pacientes), si bien el 60% (3 pacientes) desarrolló posteriormente una recidiva local.

En cuanto a los 5 pacientes con progresión neoplásica, 1 fue operado sin éxito, 3 se consideraron irresecables, por lo que recibieron RT paliativa, y 1 no recibió tratamiento alguno.

En resumen, la respuesta final evaluada 3 meses tras la última maniobra terapéutica fue de remisión completa en el 80% (47 pacientes) de los casos, mientras que el 20 % presentó progresión de la enfermedad. El 38% (18) de los pacientes con respuesta final de remisión completa desarrolló recidiva/progresión posteriormente. De este modo, el 51% de la serie (30 pacientes) presentó recidiva/progresión durante el seguimiento. Sólo 3 de estos pacientes respondieron favorablemente a un nuevo tratamiento de rescate.

Tabla 12: Recidiva / progresión

local	15 (25%)
Ganglionar	2 (3%)
Local + ganglionar	8 (14%)
Metástasis a distancia	5 (8%)
Total	30 (51%)

Se realizaron 14 laringectomías (12 totales y 2 supraglóticas) como segunda maniobra tras la quimioterapia de inducción, todas ellas acompañadas de vaciamiento ganglionar cervical bilateral. Solo se realizó vaciamiento cervical unilateral aislado por persistencia ganglionar tras la QT en una ocasión (procediéndose posteriormente a RT ya que se acompañó de una RC a nivel local). Tras la radioterapia se efectuaron 6 laringectomías de rescate, una por progresión tumoral y 5 por recidivas (3 dentro del primer año postratamiento y 2 tardías).

Al término de este estudio, 22 pacientes (37%) se encontraban vivos y libres de neoplasia laríngea (VSE) frente a 28 que habían fallecido por causa directa del tumor (47%). Se habían producido 9 exitus por causas ajenas al cáncer de laringe y todos ellos se encontraban en remisión completa. Cinco de estas muertes fueron consecuencia de segundas neoplasias pulmonares.

Dos pacientes que se encontraban libres de enfermedad interrumpieron el seguimiento, por lo que no fue posible la actualización de su situación a fecha de cierre del estudio, pero ambos se encontraban vivos y sin evidencia de enfermedad más de 5 años después de la última maniobra terapéutica.

Tabla 13: Estado en el último control

VSE	22 (37%)
FALLECIDOS POR NEOPLASIA	28 (47%)
FALLECIDOS POR OTRAS CAUSAS	9 (15%)

2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

En esta etapa del estudio, se exponen los resultados obtenidos al interrelacionar distintas variables entre sí según la metodología señalada anteriormente. Se ha realizado una selección de las variables a comparar con el objeto de obtener información útil y evitar la posibilidad de acumular error que provocaría un enfrentamiento indiscriminado de todas las variables entre sí.

2.1. Inmunohistoquímica

Nos centraremos en la interrelación de los marcadores biológicos detectados mediante IHQ, fundamentalmente en la COX2 (variable principal de este trabajo) con otras variables seleccionadas.

Los test de Chi cuadrado no revelaron relación significativa entre la expresión de COX2 y variables relativas al tumor como el grado de diferenciación histológica, categoría T, categoría N o el estadio (tablas 14-17; Anexo I). Este último tampoco se correlacionó significativamente con EGFR, VEGF o KDR (tablas 18-20; Anexo I).

No se encontró asociación significativa entre la expresión de la enzima y parámetros de la evolución clínica como la respuesta a QT, la respuesta global o la aparición de recidiva/progresión (tablas 21-23; Anexo I). Tampoco el resto de detecciones inmunohistoquímicas obtuvieron una p significativa en su asociación con estas variables (tablas 24-31; Anexo I), excepto el VEGF, cuya expresión se relacionó significativamente con la respuesta a QT con una p de 0.02.

Tabla 32: Expresión VEGF / respuesta a quimioterapia

VEGF/RESP QT n (%)	Respuesta completa (RC)	No RC	Total
VEGF Nula-baja	14 (29%)	5 (10 %)	19 (39%)
VEGF Moderada-intensa	12 (24%)	18 (37%)	30 (61%)
Total	26 (53%)	23 (47%)	49 (100%)

En cuanto al estado del último control de los pacientes (vivos sin enfermedad o fallecidos por la neoplasia), no se encontró una p significativa en su asociación con COX2 (tabla 33; Anexo I) ni con los demás marcadores inmunohistoquímicos (tablas 34-36; Anexo I).

En el análisis de la relación entre la expresión de COX2 y el resto de marcadores inmunohistoquímicos, no se halló significado estadístico (tablas 37-39; Anexo I). Sí se encontró una relación cercana a la significación estadística ($p=0.096$) al asociar EGFR y VEGF (tabla 40; Anexo I), aunque no con las comparaciones de EGFR y KDR (tabla 41; Anexo I). Como era de esperar, sí se comprobó una correlación total entre la expresión de VEGF y la de su receptor, KDR (tabla 42; Anexo I).

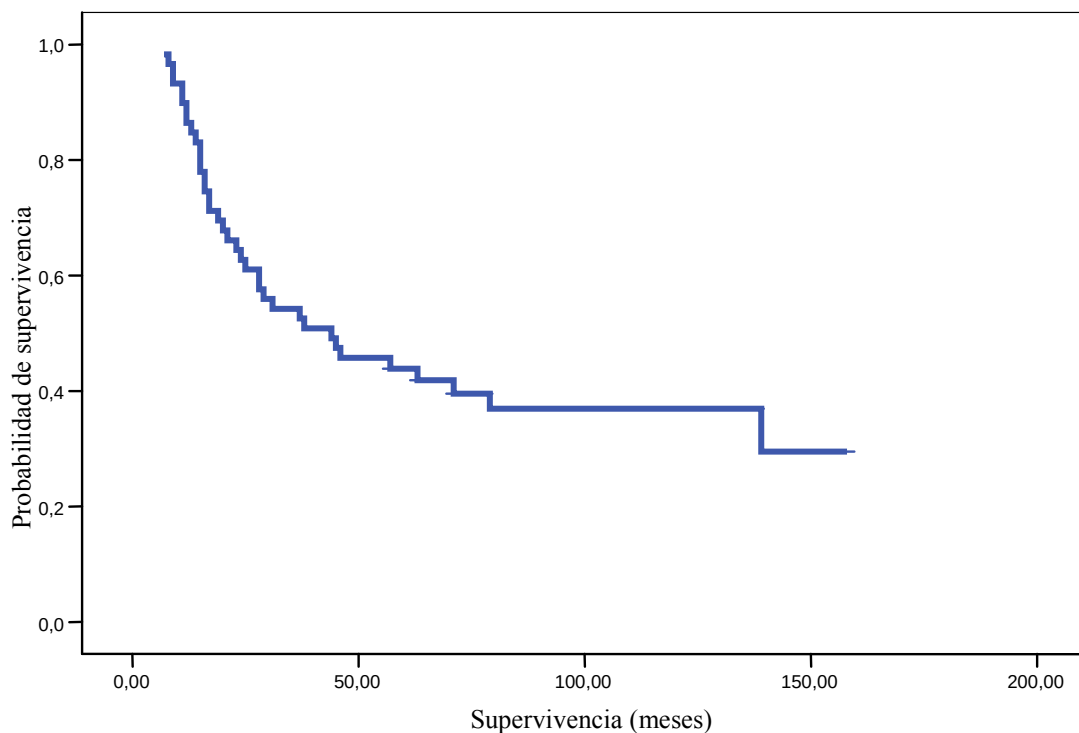
2.2. Evolución clínica y supervivencia

2.2.1. Supervivencia Global (SVG)

En el momento del cierre del periodo de estudio, el seguimiento medio de toda la serie fue de 55 meses (mediana de 44 meses, rango de 7 a 158) y de 99 meses (mediana de 97, rango de 50 a 158 meses) en los pacientes vivos. De los 59 pacientes de la serie, 37 habían fallecido mientras que 22 permanecían vivos y sin enfermedad (37%).

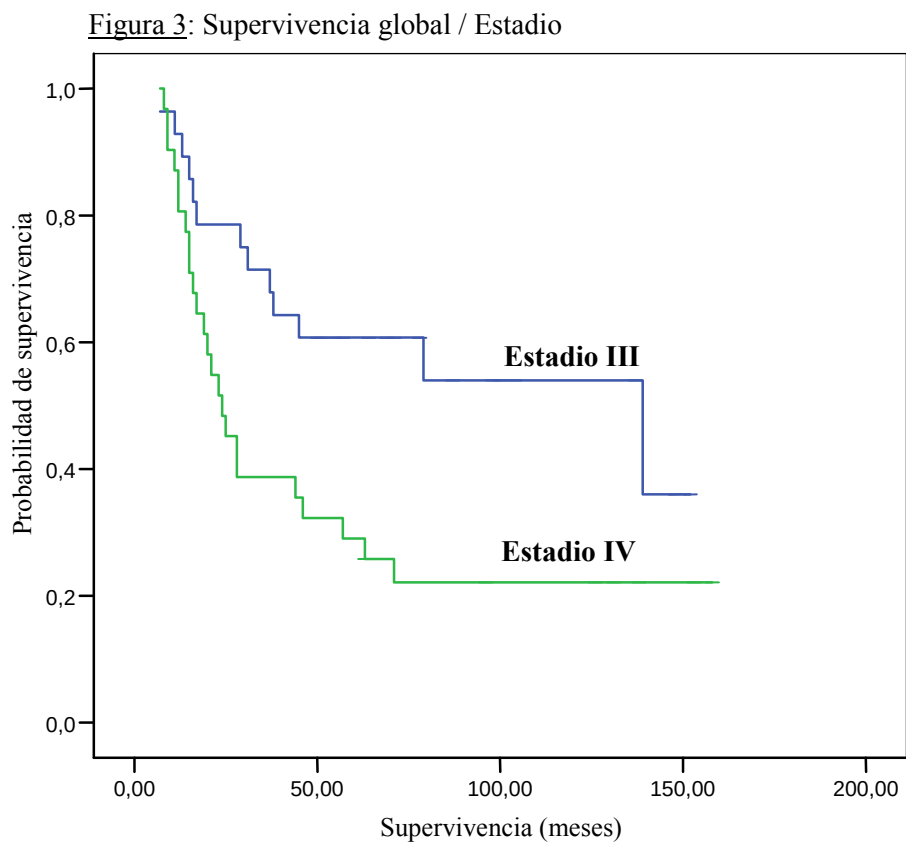
La mediana de SVG de la serie es de 44 meses y la probabilidad de supervivencia a los 2 años se estima en 63% descendiendo al 44% a los 5 años.

Figura 1: Supervivencia global

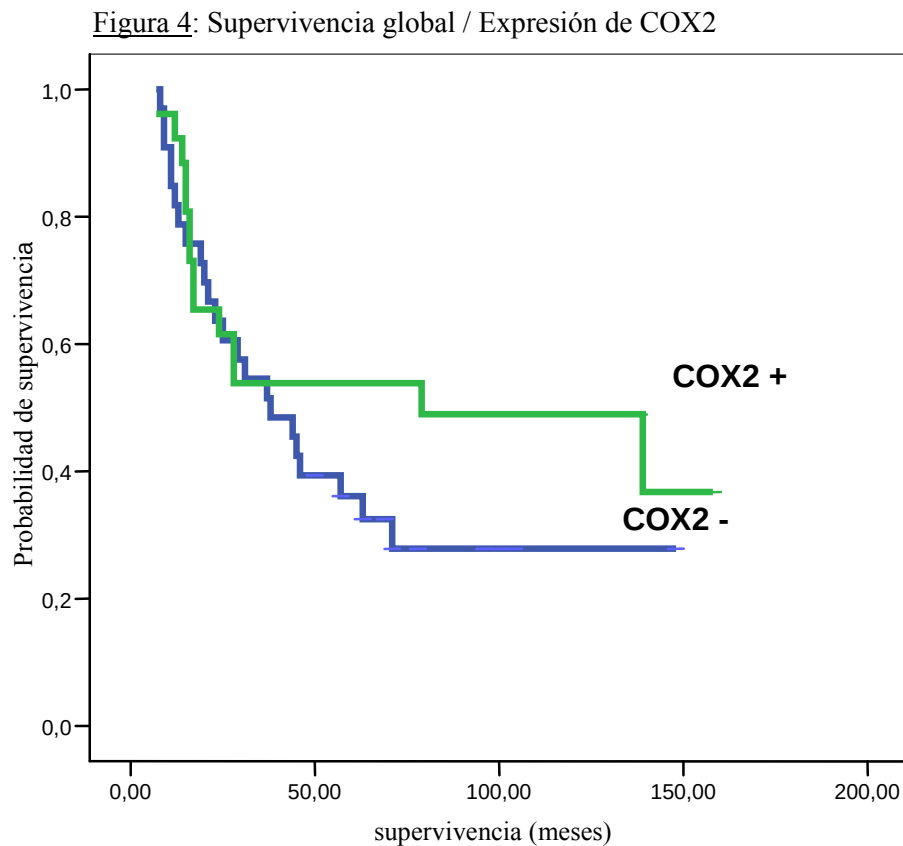


La supervivencia específica (SVE), es decir obviando los pacientes fallecidos por causas ajenas a la neoplasia laríngea, presenta una mediana de 71 meses con una probabilidad de supervivencia a los 2 años del 65 % y del 52% a los 5 años (figura 2; Anexo II).

La mediana de SVG para los estadios III es de 139 meses frente a los 24 meses de los estadios IV, y esta diferencia es estadísticamente significativa según el test de Long-Rank ($p = 0.014$)



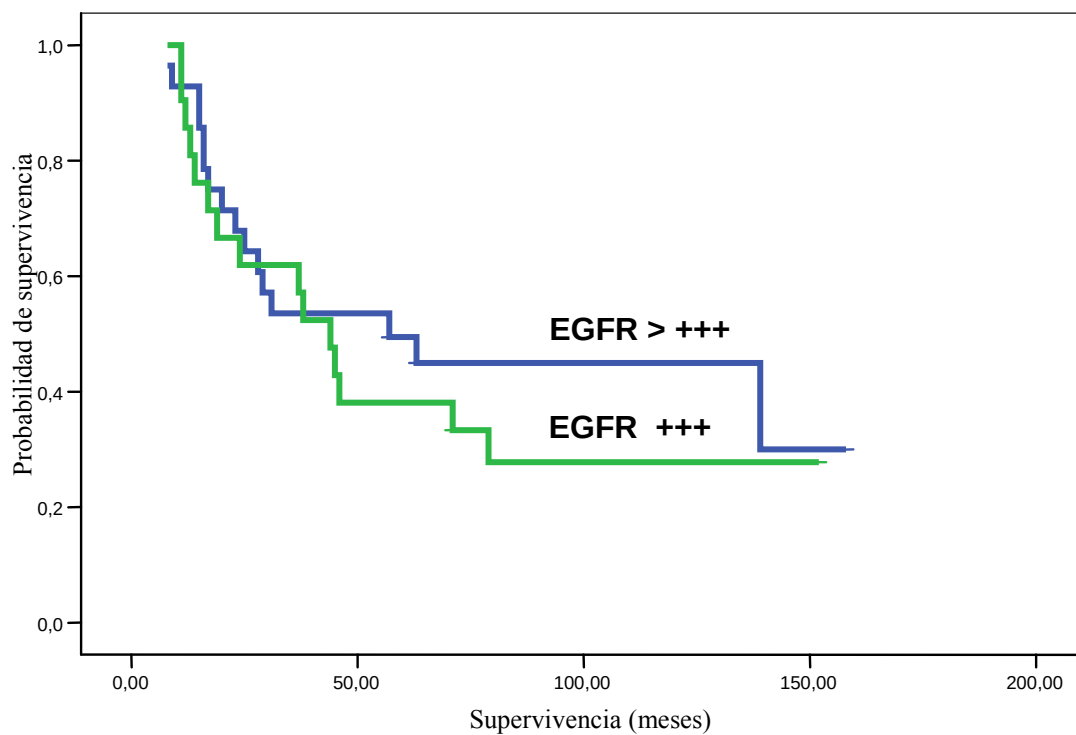
La mediana de SVG en los pacientes que expresan COX2 es 79 meses, mientras que en los pacientes COX2 - disminuye a 38 meses. Esta diferencia no es significativa ($p=0.2$), probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra.



Esta SVG también es mayor en COX2 positivos si dividimos las neoplasias de la serie en estadios III y IV y comparamos en cada uno de ellos los que sobreexpresan la enzima con aquellos que no lo hacen (figuras 5-6; Anexo II), y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p=0.016$).

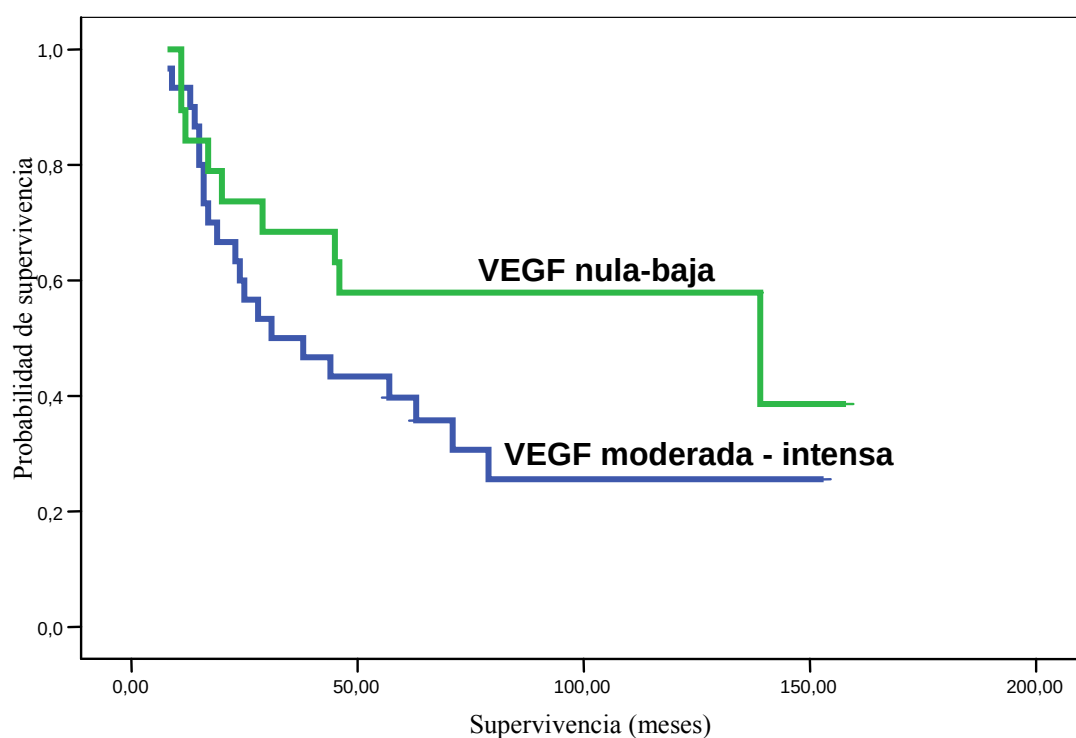
La mediana de SVG en pacientes con tumores donde se detecta EGFR de +++ es de 57 meses frente a los menores de ++, cuya mediana es de 44 meses ($p=0.4$).

Figura 7: Supervivencia global / Expresión EGFR



Los pacientes con expresión baja o nula de VEGF presentan una mediana de SVG de 139 meses frente a los 31 meses de los casos con expresión moderada-intensa y, aunque se obtiene una p mayor de 0.05, las curvas expresan la diferencia más evidente en la correlación de SVG y marcadores inmunohistoquímicos.

Figura 8: Supervivencia global / Expresión VEGF



En relación al KDR, la mediana de SVG es de 45 meses en los pacientes con baja o nula expresión y de 38 meses en los pacientes con expresión moderada-intensa, diferencia que nuevamente no es estadísticamente significativa ($p=0.46$)

Figura 9: Supervivencia global / Expresión KDR

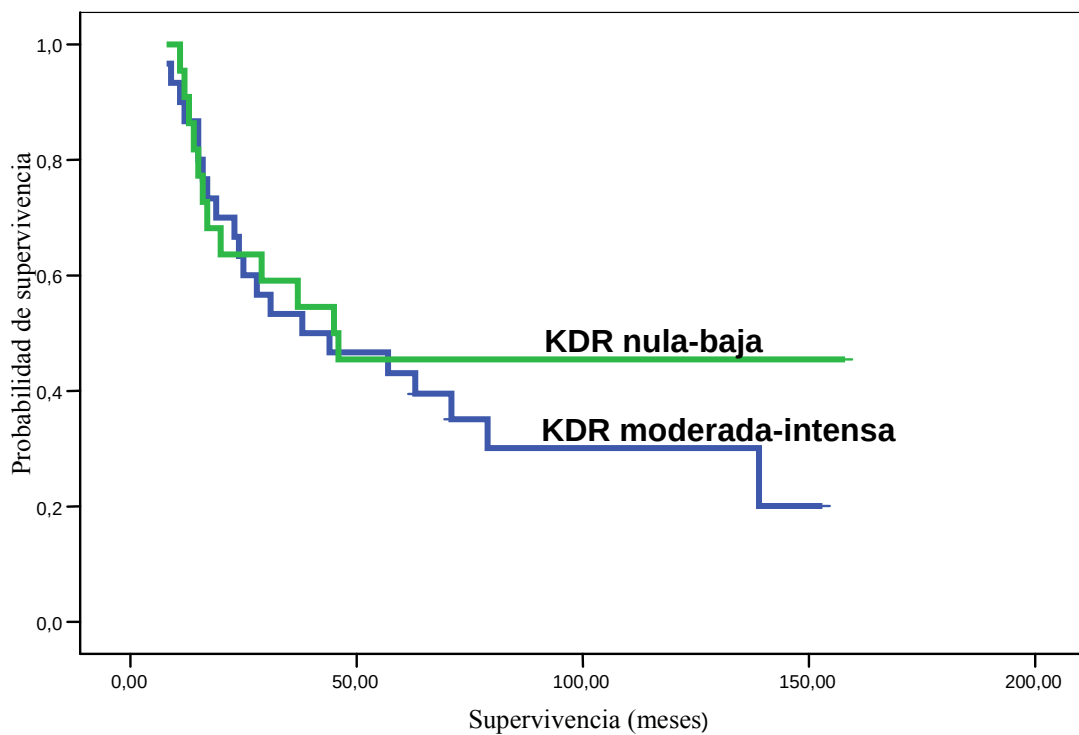


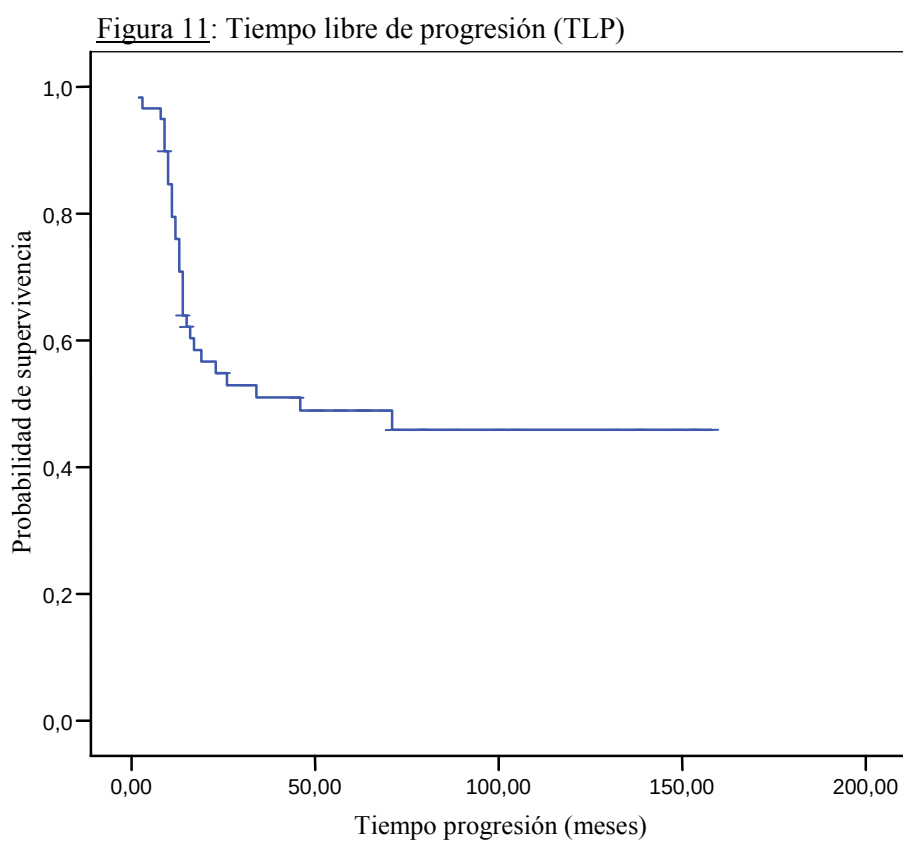
Tabla 43: Supervivencia global / Marcadores inmunohistoquímicos

	SVG a los 2 años	SVG a los 5 años	Significación
COX2 -	64%	36 %	No significativo
+	61.5%	54%	p= 0.23
EGFR <++++	62%	38 %	No significativo
>++++	68%	49.5%	p= 0.45
VEGF			No significativo
Nula-baja	74%	58%	p= 0.12
Mod-intensa	60%	40%	
KDR			No significativo
Nula-baja	64%	45.5%	p= 0.46
Mod-intensa	63%	43%	

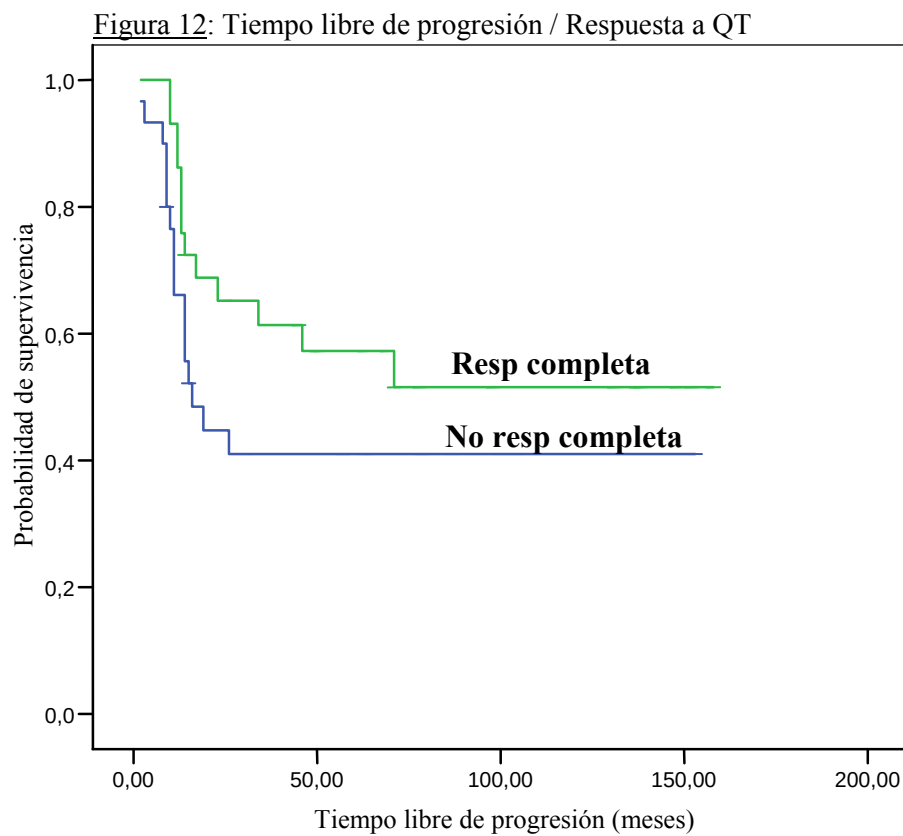
Como se puede comprobar en la tabla nº 44 del anexo I, características de la neoplasia como la categoría T, categoría N y el estadio global se relacionan de forma estadísticamente significativa con la SVG, no obteniéndose esta significancia en el caso del grado histológico. En esta misma tabla, se relaciona la respuesta a la QT de inducción con una mayor supervivencia con una p de 0.04 (figura 10; Anexo II).

2.2.2. Tiempo libre de recidiva / progresión (TLP)

La mediana de TLP de la serie es de 46 meses, estimándose una probabilidad de estar libre de recidiva/progresión a los 2 y 5 años del 55% y 49% respectivamente.

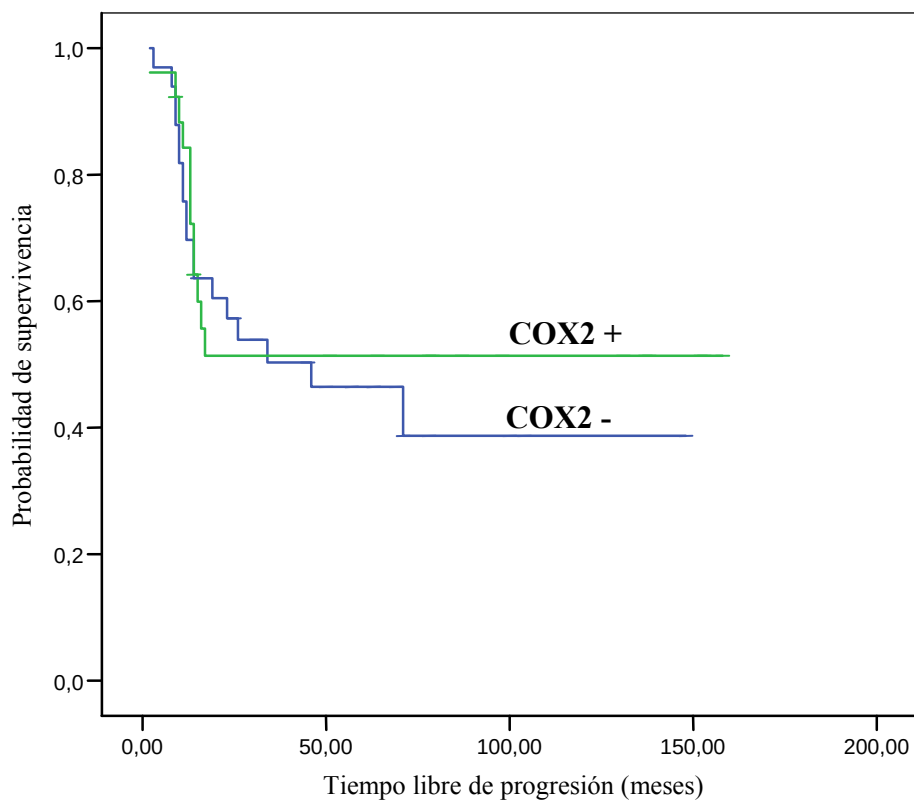


El TLP es menor en los enfermos que no obtuvieron respuesta tras la QT (tabla 30; Anexo I), presentando una mediana de 11 meses, mientras que aquellos pacientes que lograron una respuesta completa o parcial no alcanzan la mediana. El test de Long-Rank encuentra significado estadístico con una p de 0.008.



Al estudiar el TLP en relación a la expresión COX2, encontramos una mediana de 46 meses en las neoplasias COX2 -, mientras que en los tumores que expresan la enzima no se alcanza, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa según el test de Long-Rank ($p=0.6$).

Figura 13: Tiempo libre de progresión / Expresión de COX2



Tampoco en el estudio de la relación entre el TLP y la expresión del resto de marcadores inmunohistoquímicos se obtiene una p menor de 0.05, como se puede comprobar en la tabla mostrada a continuación y en las figuras correspondientes en el anexo II (figuras 14-16).

Tabla 45: Tiempo libre de progresión / Marcadores inmunohistoquímicos

	Mediana TLP	TLP 2 años	TLP 5 años	Significación
COX2 -	46 meses	57%	51%	No significativo p= 0.6
+	No alcanzada	46%	51%	
EGFR <+++	34 meses	52%	41%	No significativo p= 0.17
>+++	No alcanzada	67%	62%	
VEGF				No significativo p= 0.4
Nula-baja	No alcanzada	68%	63%	
Mod-intensa	46 meses	54%	50%	
KDR				No significativo p= 0.98
Nula-baja	71 meses	63%	54%	
Mod-intensa	No alcanzada	55%	51%	

La categoría T de la neoplasia y el estadio global se relacionan en nuestra serie con el TLP de un modo significativo, al igual que con la SVG, aunque no se encuentra una p significativa al relacionarlo con la categoría N. Tampoco el grado histológico se correlaciona de modo significativo (tabla 46; Anexo I).

2.3. Conservación de órgano

Al finalizar la secuencia terapéutica de este protocolo de conservación de órgano, se había conseguido preservar la laringe en 47 pacientes, mientras 12 habían sido sometidos a laringectomía total (se realizaron 2 laringectomías supraglóticas). Se ha encontrado una correlación total ($p=0.0$) entre la respuesta a la QT y esta preservación de órgano (tabla 47; Anexo I), presentando el mayor porcentaje (49 %) de la misma aquellos casos con respuesta completa. No se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre esta preservación y la categoría T o el estadio global (tablas 48,49; Anexo I).

En el estudio de la relación entre la conservación de laringe y la expresión de COX2, no se ha obtenido una p significativa (tabla 50; Anexo I). Tampoco en el resto de los factores inmunohistoquímicos se ha encontrado significación estadística (tablas 51-53; Anexo I).

A 6 pacientes, que recibieron RT tras quimioterapia de inducción, se les realizó posteriormente una laringectomía total por recidiva/progresión (el 67% en el primer año postratamiento), por lo que la laringe fue conservada en el 69% (41 pacientes).

Finalmente, 14 (64%) de los 22 pacientes vivos, y sin evidencia de enfermedad al término de este estudio, conservan una laringe funcionante.

V. DISCUSIÓN

El tratamiento clásico de los carcinomas laríngeos en estadios avanzados es una combinación de cirugía y radioterapia. La laringectomía total es una técnica que permite un excelente control local de la enfermedad y, seguida de RT postoperatoria, fue considerada el tratamiento estándar de los carcinomas de laringe hasta principios de los años 90. Sin embargo, el carácter mutilante de esta intervención condiciona seriamente la calidad de vida del paciente operado, ya que éste es portador de una traqueostomía permanente y no puede realizar una fonación fisiológica. Debido a este importante deterioro funcional que conlleva la laringectomía total, la preservación de la laringe es uno de los temas de mayor investigación en esta área en las últimas décadas. La cirugía parcial, con la incorporación de nuevas tecnologías como el láser de CO2, y la radioterapia radical, con el desarrollo de nuevas técnicas de fraccionamiento, son opciones en la conservación de órgano, pero fue la quimioterapia, introducida en el inicio de los años 80, la que combinada con RT revolucionó este campo, comenzando a aparecer estudios que avalaron su utilidad en el tratamiento de los carcinomas de cabeza y cuello ³⁹ y su papel en protocolos de preservación de órgano. Así, el ensayo clínico llevado a cabo en 1991 por el Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group (VALGS) ⁴¹ marcó un hito en el tratamiento de estos pacientes al desarrollar un protocolo de preservación de laringe basado en la combinación de QT de inducción y RT. Éste y otros muchos ensayos randomizados ⁴⁹ soportan la posibilidad de conservar la laringe en carcinomas avanzados, sin perjuicio sobre la supervivencia global. Hoy en día, es evidente que no se puede obviar la existencia de estas alternativas al tratamiento quirúrgico que ofrecen unos resultados similares, pero con una sustancial mejora en la calidad de vida del paciente.

Sin embargo, este tratamiento conservador plantea distintos problemas, ya que por un lado, un porcentaje importante de pacientes fallece por la enfermedad y, por otro, existe

un grupo que no responde al tratamiento conservador o que recae tras una primera respuesta positiva al mismo, requiriendo posteriormente cirugía de rescate. Es por ésto que, a pesar de los múltiples estudios que se han ocupado del tema, no existe un consenso general sobre la estrategia terapéutica y la selección de los pacientes que deben someterse a estos protocolos. Es evidente que el objetivo es individualizar el tratamiento y elegir la opción más adecuada para cada paciente afecto de carcinoma de laringe. Por ello, el esfuerzo actual está dirigido a intentar conocer “a priori” qué pacientes pueden beneficiarse de un tratamiento conservador, evitando un retraso de la cirugía a aquellos en los que no se prevea un buen resultado así como las toxicidades propias de la QT y RT, con las consiguientes dificultades añadidas para la cirugía de rescate. En este intento de seleccionar los pacientes candidatos a preservación de órgano, se están estudiando distintas vías:

- Evaluación precoz de la respuesta a QT. Urba y cols.¹⁷⁷ atribuyen a la velocidad de respuesta tumoral a la QT de inducción un importante valor pronóstico para las posibilidades de éxito de preservación de órgano y proponen recurrir a la cirugía en aquellos pacientes que no logren al menos una respuesta parcial tras un primer ciclo de QT neoadyuvante, reduciendo así el tiempo total de tratamiento. Estos autores demostraron que los pacientes que no responden al primer ciclo tienen la misma supervivencia que aquellos que responden cuando se hace un rescate quirúrgico precoz.

- Búsqueda de factores pronósticos y/o predictivos biológicos.

Es bien conocido que neoplasias con el mismo tipo histológico e idéntico estadio TNM presentan variabilidad en la respuesta al tratamiento y evoluciones diferentes. Por ello, en los últimos años, muchos estudios han tratado de identificar factores biológicos que

permitan predecir la sensibilidad de un tumor a la QT y a la RT ¹⁷⁸ y las posibilidades de preservar el órgano sin detrimento de la supervivencia ¹⁷⁹. Hasta la fecha, no se han encontrado unos marcadores consensuados, aplicables a la práctica clínica, que permitan esta selección de pacientes. Nuestra investigación se centra en este camino. Como se ha explicado en el capítulo correspondiente, numerosos estudios han demostrado, por medio de técnicas moleculares e inmunohistoquímicas, incrementos importantes de COX2 en tumores de múltiples regiones como la mama ¹²³⁻¹²⁶, el pulmón ¹²⁷ o el colon ¹¹³. Dada esta evidencia de la sobreexpresión del enzima en neoplasias malignas y tejidos premalignos, muchos autores afirman su implicación en la carcinogénesis e investigan su papel en procesos como la angiogénesis ^{132,133} o la apoptosis ¹⁴⁵⁻¹⁴⁶.

Aunque la bibliografía existente sobre la participación de COX2 en neoplasias de cabeza y cuello es más reducida, diversos estudios han revelado su sobreexpresión en tumores de esta localización ¹⁸⁰.

La literatura en el caso de las neoplasias laríngeas es aun más escasa y con resultados poco concluyentes; su actividad en estos tumores no está lo suficientemente analizada y no contamos con conclusiones establecidas. Por ello, decidimos centrar este trabajo en la sobreexpresión de la COX2 en el cáncer de laringe, con objeto de analizar su valor como marcador biológico y su posible poder pronóstico en la preservación de este órgano. Con este fin, se diseñó este estudio retrospectivo en base a una serie de pacientes tratados homogéneamente con un protocolo de conservación, mediante la combinación de QT de inducción seguida de RT secuencial.

Otros factores, como EGFR y VEGF, son frecuentemente estudiados en tumores de cabeza y cuello con objeto de analizar su papel en el comportamiento de las neoplasias de esta región. Sin embargo, aunque son mejor conocidos que la COX2, existen

contradicciones entre las conclusiones de los distintos estudios, y no se han alcanzado resultados que permitan su uso rutinario, por lo que decidimos incorporarlos a nuestro estudio con el fin de contribuir a su mayor conocimiento y de estudiar su posible interrelación con la COX2 como apuntan algunos investigadores ¹⁶³. Además, incluimos el receptor 2 del VEGF (KDR), cuya expresión en estos tumores es poco conocida.

Como se ha descrito en el capítulo de “material y métodos”, el protocolo de preservación de nuestro estudio se basó en el desarrollado por el Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group ⁴¹, modificando la actitud en el caso de las respuestas parciales. Este ensayo clínico es de gran relevancia porque introdujo la QT neoadyuvante en el tratamiento conservador del carcinoma laríngeo, y sus resultados son un referente en este campo. En nuestra serie, el 49 % de los pacientes alcanzó una remisión completa clínica tras 3 ciclos de quimioterapia, tasa de respuesta que coincide con la publicada por este grupo siendo algo menor en el caso de las respuestas parciales (32% y 49% respectivamente). La probabilidad de supervivencia a los 2 años de nuestro estudio (63%) es similar a la de los pacientes sometidos al protocolo de preservación del VALGS (68%), debiéndose considerar nuestro mayor porcentaje de estadios IV y la significancia estadística que hemos encontrado entre el estadiaje y la supervivencia global. A diferencia del VALGS, también hemos encontrado una mayor SVG en los pacientes que respondieron al tratamiento quimioterápico ($p=0.04$).

En cuanto a la preservación de órgano, la laringe fue conservada en el 64% de los pacientes del Grupo de Veteranos, mientras nosotros hemos obtenido una tasa de preservación de 69%. En este punto, no hay que olvidar que los pacientes con respuesta parcial tras la QT de inducción fueron candidatos a laringectomía en nuestro protocolo.

Finalmente, el 64% de los pacientes vivos a término del presente estudio conservaba la laringe, coincidiendo con el mismo porcentaje que el del VALGS, si bien es necesario tener en cuenta que el seguimiento medio de nuestra investigación (55 meses) es mayor que el de este grupo (33 meses) así como el extenso seguimiento de los pacientes vivos de nuestra serie (99 meses).

Forastiere y cols.⁴⁹ realizaron un ensayo clínico con tumores laríngeos en estadios III-IV y, en su brazo de 172 pacientes seleccionados aleatoriamente para seguir un protocolo de QT de inducción similar al nuestro, obtuvieron una tasa de preservación algo mayor (72%), pero el seguimiento de los pacientes vivos en nuestra serie (8 años) duplica al de estos autores (casi 4 años). También analizaron la preservación de la laringe, aunque en una serie más reducida, De Andrés y cols.⁴⁴ que aplicaron un protocolo de 3 ciclos de QT de inducción y posterior RT a 46 pacientes en estadios III, alcanzando una tasa de conservación de 55% tras 4 años de seguimiento.

En el estudio fase III llevado a cabo por el grupo EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)⁴³ con tumores de seno piriforme candidatos a laringectomía total (incluye estadios II, III y IV), los autores publicaron una SVG y una supervivencia libre de progresión a los 5 años de 30 % y 25% respectivamente en el brazo de 97 pacientes randomizados para recibir QT de inducción seguida de RT. Estas cifras son menores a las obtenidas en nuestra serie (44% y 49%), aunque hay que considerar el peor pronóstico de los tumores hipofaríngeos.

Así pues, nuestros resultados son equiparables a los recogidos en los estudios con grupos similares sometidos a protocolos de preservación de laringe. Por otro lado, se debe considerar el largo periodo de seguimiento de nuestra serie (que alcanza una mediana de 99 meses en los pacientes vivos), superior al de estas investigaciones.

1. COX2

En nuestro estudio, se detecta sobreexpresión de la COX2 en el 44 % de los tumores, mientras que el 56 % restante no la presenta.

Cho y cols.¹⁷⁰ analizaron la expresión de COX2 en una serie de 123 tumores laríngeos en estadios iniciales, encontrando positividad en el 46%, porcentaje muy similar al nuestro. También Nix y cols.¹⁶⁹ analizaron la expresión del enzima en carcinomas laríngeos en estos estadios y, en una serie de 122 pacientes, encontraron sobreexpresión en el 54%. Raneletti y cols.¹⁶⁷, por su parte, detectaron sobreexpresión de COX2 en el 31% de su serie de 61 tumores laríngeos en estadios iniciales y avanzados.

Al observar estos resultados, no se encuentran diferencias muy llamativas en los porcentajes de sobreexpresión de COX2 entre las distintas series y la nuestra, pero sin embargo, no son fácilmente comparables, ya que en la revisión de la bibliografía existente sobre la COX2 en carcinomas de cabeza y cuello en general y de laringe en particular, existe una evidente ausencia de estandarización en la medición de su expresión. La metodología para la detección inmunohistoquímica del enzima difiere de unos estudios a otros, y se observan distintos criterios, tanto en la valoración de la detección como en el punto de corte, para establecer la positividad. Esto refleja claramente la necesidad de unanimidad en los métodos de valoración de la detección inmunohistoquímica con la que actualmente no contamos.

En nuestros resultados, no encontramos una relación significativa entre la COX2 y variables relativas al tumor, como la localización o la categoría T o N, coincidiendo con autores como Cho y cols.¹⁷⁰ o Bayazit y cols.¹⁶⁸; estos últimos, en su serie de 39 carcinomas escamosos de laringe, no establecieron una correlación entre el enzima y estos parámetros a pesar de incluir también estadios iniciales. En esta línea, tampoco Nix y cols.¹⁶⁹ encontraron relación significativa con la localización tumoral o la

categoría T y además, al igual que nosotros, no lo hicieron con el grado de diferenciación histológica. En cambio, Raneletti y cols.¹⁶⁷ no hallaron relación con la localización tumoral, la categoría T o el estadiaje global, pero sí con la categoría N, y encontraron además una distribución significativa de la COX2 con respecto al grado de diferenciación histológica, asociando su positividad a neoplasias mejor diferenciadas, ya que observaron que esta expresión se perdía cuando los tumores progresaban a fenotipos más agresivos y menos diferenciados. También Maggiano y cols.¹⁸¹ asociaron la sobreexpresión de COX2 a tumores laríngeos de bajo grado y menor agresividad.

Si nos centramos en la evolución clínica, la mediana de SVG en los pacientes de nuestra serie que expresan COX2 es 79 meses, mientras que en los pacientes COX2 - disminuye a 38 meses. Esta diferencia no es significativa ($p=0.2$), pero las curvas de Kaplan-Meier apuntan en la misma dirección que las de Ranelletti y cols.¹⁶⁷, que sí establecieron esta relación significativa entre la positividad para COX2 y una mayor supervivencia.

Bayazit y cols.¹⁶⁸ no encontraron relación significativa entre la expresión de COX2 y la SVG; los autores atribuyeron este hecho al corto periodo de seguimiento de su serie, que no permite evaluar la supervivencia a los 5 años, situación que no se da en la nuestra, donde el seguimiento medio en los pacientes vivos supera los 8 años. Tampoco Cho y cols.¹⁷⁰ demostraron una correlación estadísticamente significativa entre la COX2 y SVG, aunque estos autores sí contaron con un considerable periodo de seguimiento (media de casi 10 años).

En este estudio no encontramos relación significativa entre la COX2 y el tiempo libre de recidiva/progresión, coincidiendo con Bayazit. Ranelletti y cols.¹⁶⁷ difieren en este punto puesto que documentaron que sus biopsias con baja expresión de COX2, junto con una menor SVG, presentaron un menor intervalo libre de enfermedad y encontraron

significado estadístico en estas relaciones. Cho y cols.¹⁷⁰ también relacionaron la expresión de la enzima con la posibilidad de recidiva/progresión, pero en dirección opuesta, ya que asociaron la positividad de los tejidos con una mayor probabilidad de recidiva y un menor TLP.

En cuanto a la preservación de la laringe, no encontramos correlación entre la expresión de COX-2 y este parámetro. Este resultado no es contrastable con el de otras investigaciones, ya que no hay disponibles en la literatura series sometidas a protocolo de conservación que evalúen esta relación.

En resumen, en nuestro estudio no establecemos una relación entre la sobreexpresión de COX2 y características tumorales (localización, categoría T, estadiaje global), coincidiendo con la escasa bibliografía sobre esta línea de investigación en cáncer de laringe. Algunos autores han sugerido que esta ausencia de relación se debe a una contribución cuestionable de la enzima en la progresión de la enfermedad a pesar de su participación en la carcinogénesis de las neoplasias escamosas de laringe¹⁶⁸.

Un punto más controvertido es la influencia de COX-2 en la evolución clínica de estas neoplasias, ya que aquí difieren los distintos autores. Nosotros no obtenemos una asociación significativa de la COX2 con la SVG (aunque sí una tendencia a mayor supervivencia en COX 2 +) ni con el TLP. Revisando los resultados sobre este aspecto de otros autores, es difícil establecer unas conclusiones fiables, sobretudo del segundo parámetro, puesto que unos sostienen un menor tiempo hasta la recidiva/progresión cuando existe positividad para la COX2, mientras otros lo asocian a la baja detección de la misma.

Probablemente, las escasas investigaciones sobre el papel de la enzima en el cáncer de laringe, y la heterogeneidad de las series, contribuyan a esta variabilidad. Las series de estos estudios constan de un pequeño número de pacientes y difieren en el estadio de los

tumores incluidos, lo que, junto con periodos de seguimiento muy variables y distintos procedimientos terapéuticos, puede condicionar la controversia en los resultados. Por último, no hay que olvidar la mencionada disparidad en los métodos de medición de la expresión de la COX2.

2. EGFR

El EGFR es uno de los factores biológicos más estudiados en las neoplasias escamosas, y su sobreexpresión a menudo se ha asociado con peor pronóstico en tumores de distintos territorios como la mama, el ovario ⁶⁴ o el esófago ⁶¹ entre otros ⁶⁰. Su papel en el carcinoma de cabeza y cuello ha sido frecuentemente analizado y distintos autores se han centrado en su participación en el desarrollo de los tumores laríngeos, pero ésta no está totalmente esclarecida. Aunque varios autores ^{65,66} afirman la sobreexpresión de EGFR en neoplasias de laringe, las conclusiones de estos estudios varían según la localización, histología del tumor o el tratamiento recibido y nuevamente existen divergencias evidentes en los métodos empleados para evaluar la expresión del factor. Por otro lado, el número de pacientes de las series de estas investigaciones es habitualmente reducido.

Wen y cols. ⁷⁴, por ejemplo, estudiaron una serie de 68 pacientes con cáncer de laringe en estadios iniciales sometidos a RT y detectaron sobreexpresión de EGFR en el 43% de los casos. Wei y cols. ¹⁸², en cambio, analizaron las piezas quirúrgicas de 40 pacientes con carcinomas laríngeos avanzados sometidos a laringectomía y vaciamiento linfático cervical y las clasificaron de 0 a 3 + según la expresión de EGFR, detectando un 87% de neoplasias 2 o 3 +. Estos autores atribuyeron este alto porcentaje a las características de su serie, compuesta por tumores avanzados con metástasis

ganglionares. Morrison y cols.⁸⁰, por su parte, valoraron la expresión de EGFR de 0 a 4 según los porcentajes de tinción celular y consideraron alta expresión los valores correspondientes a 4 según esta escala, suponiendo un 16% de su serie de 59 tumores avanzados. Estos autores señalaron la dificultad de estandarización en la cuantificación antigénica como probable causa de esta variabilidad en las tasas de sobreexpresión publicadas por los distintos investigadores.

En nuestro estudio, se clasificaron las biopsias de 0 a 3+ según la expresión de EGFR. Posteriormente, tras observarse una gran homogeneidad en la alta expresión del factor en la mayoría de las muestras, se decidió crear 2 grupos catalogados como < +++ y +++ con el propósito de obtener mayor información de nuestro análisis. De este modo, el 57% de las biopsias presentan valores de +++.

Al igual que en otras localizaciones, muchos autores han descrito en el carcinoma laríngeo la asociación de sobreexpresión de EGFR con peor pronóstico⁷², y así, Maurizi y cols.⁶⁸ analizaron la expresión de EGFR, mediante radioreceptores, en una serie de 140 neoplasias en estadios iniciales y avanzados de laringe y encontraron una menor SVG e intervalo libre de recidiva en los tumores que sobreexpresaron el factor. También Almadori y cols.⁷⁸ la relacionan con mayor índice de recurrencias y menor intervalo libre de enfermedad. Sin embargo, Wen y cols.⁷⁴ no encontraron relación significativa entre la expresión de EGFR y SVG en un estudio de 68 tumores laríngeos en estadios iniciales sometidos a RT.

Es interesante el estudio de Pívor y cols.⁷⁹, que analizaron la expresión de EGFR en una serie de 155 neoplasias de faringe y laringe subsidiarias de laringectomía total, y encontraron correlación significativa entre la sobreexpresión de este factor y la disminución de la SVG (y el intervalo libre de enfermedad) en aquellos pacientes sometidos a QT neoadyuvante seguida de RT. Estos autores sugieren la relación entre la

expresión de EGFR y la sensibilidad a QT y RT, ya que no observaron este valor pronóstico en el grupo de pacientes sometidos a cirugía, aunque al igual que nosotros, no encontraron relación entre la expresión del factor y la respuesta a QT.

En nuestro estudio, no hemos encontrado una relación estadística entre la expresión de EGFR y la SVG o el TLP y creemos que esta ausencia de correlación podría deberse al pequeño tamaño de la muestra. Morrison y cols.⁸⁰ analizaron en su serie de carcinomas avanzados de laringe (con el mismo número de pacientes que la nuestra) la expresión de EGFR mediante IHQ y, al igual que nosotros, tampoco obtuvieron correlación significativa entre ésta y la SVG. Sin embargo, sí hallaron esta relación con la amplificación de su gen analizada mediante técnicas moleculares, por lo que los autores sostienen la mencionada dificultad para estandarizar la cuantificación antigénica.

3. VEGF

Como se ha comentado en el capítulo correspondiente de la introducción, el VEGF se sobreexpresa en neoplasias de cabeza y cuello, por lo que numerosos trabajos se ocupan del análisis de su expresión y su posible valor como factor pronóstico. Muchos de estos estudios apuntan la disminución del intervalo libre de enfermedad y de la SVG en tumores de este territorio que sobreexpresan el VEGF^{85, 86}.

Nosotros hemos detectado una expresión moderada-intensa en el 61% de nuestra serie, sin encontrar una correlación significativa con el TLP ni con la SVG. Sin embargo, observamos una tendencia al detrimento de la supervivencia en neoplasias con expresión moderada-intensa, apreciando una relación de la expresión de VEGF con la supervivencia global mayor que con en el resto de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados. Este hallazgo se manifiesta de forma evidente en la comparación de las curvas de Kaplan-Meier (figuras 4, 7-9; Anexo II), apuntando en la misma dirección

que otros autores ⁸⁸⁻⁹⁰ que se han ocupado de la expresión del factor en tumores laríngeos y han observado esta misma tendencia.

Quizás, el escaso número de pacientes de la serie condicione una vez más la ausencia de significado estadístico en los test de Long-Rank, significado que sí obtuvieron Parikh y cols. ⁸⁷ en su serie de 123 pacientes afectados de tumores laríngeos T1 y T2, más en la línea de investigaciones que incluyen otras localizaciones de cabeza y cuello.

Si nos centramos en parámetros de la evolución clínica que puedan condicionar estas curvas de TLP o SVG, no observamos significación estadística entre la sobreexpresión de VEGF y la recidiva/progresión o respuesta final al protocolo de conservación, pero sí con la respuesta a la QT de inducción, donde encontramos mayor tasa de respuesta completa en los casos con expresión nula-baja de VEGF ($p=0.02$). A su vez, la aparición de RC a la QT neoadyuvante es un factor clínico que se relaciona en nuestro estudio con una mayor SVG, de forma estadísticamente significativa ($p=0.04$), por lo que podríamos suponer que la sobreexpresión de VEGF condiciona una menor respuesta a la QT disminuyendo la SVG.

En un estudio reciente realizado por Cheng y cols. ¹⁸³, mediante técnicas moleculares, se demostró una alta correlación positiva entre el VEGF y la COX2 en carcinomas epidermoides de laringe, pero los resultados de nuestro estudio inmunohistoquímico no corroboran este dato.

4. KDR

La expresión de KDR en los carcinomas de cabeza y cuello ha sido poco estudiada y sólo recientemente algunos autores se han ocupado de ella. Giatromanolaki y cols. ¹⁸⁴ no encontraron relación entre esta expresión y la respuesta a QT-RT, o la supervivencia, en una serie de 104 tumores inoperables de esta región. Kyzas y cols. ¹⁸⁵ encontraron

relación significativa entre la sobreexpresión de KDR y una peor supervivencia en carcinomas orales y laríngeos, pero su estudio incluyó tan solo 9 casos de los últimos.

El único estudio disponible en la bibliografía centrado en carcinomas laríngeos es el realizado por Marioni y cols.¹⁸⁶. Estos autores analizaron la expresión de KDR en 62 carcinomas de laringe, en estadios iniciales y avanzados, sometidos a laringectomía y detectaron su sobreexpresión en el 31%, sin obtener relación significativa con la categoría T, categoría N, el estadio o las recidivas locoregionales. En nuestra serie, detectamos expresión moderada-intensa en el 58% de los tumores, pero no establecemos relación significativa entre esta expresión y el estadio tumoral, ni con parámetros de eficacia terapéutica de este protocolo de conservación (respuesta a QT, respuesta global, conservación de órgano). Tampoco encontramos relación con la SVG o el TLP.

Estos resultados son interesantes dada la escasez de investigaciones centradas en la expresión de KDR en neoplasias de cabeza y cuello, aunque no podemos contrastarlos, ya que este estudio es pionero en la detección del receptor en carcinomas avanzados de laringe sometidos a tratamiento conservador y nuestra serie es la única de estas características disponible en la bibliografía.

VI. CONCLUSIONES

1.- La expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX2) es un evento frecuente en pacientes con carcinoma de laringe. En nuestra serie, un 44% de pacientes con carcinomas avanzados de laringe la sobreexpresaron.

2.- El papel de la enzima ciclooxigenasa-2 en la génesis y progresión del cáncer de laringe no está bien definido. En nuestra serie de pacientes con cáncer avanzado, su sobreexpresión no se relacionó con la agresividad histológica (grado de diferenciación tumoral), con factores pronósticos clínicos (estadio local y ganglionar) ni con eficacia del tratamiento conservador (respuesta tumoral, supervivencia libre de progresión y conservación de laringe). Sin embargo, hay que destacar que los pacientes con sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 presentaron mejor supervivencia global, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Este dato merece ser evaluado en nuevos estudios con mayor número de pacientes.

3.- En pacientes con cáncer avanzado de laringe, nuestros datos indican que no parece existir correlación entre la sobreexpresión de ciclooxigenasa-2 por inmunohistoquímica y la de otros marcadores biológicos que participan destacadamente en la génesis y progresión del cáncer de laringe, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor 2 (KDR).

4.- La expresión inmunohistoquímica del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en las células tumorales parece tener relación con la eficacia del tratamiento conservador del cáncer avanzado de laringe. Los pacientes con expresión baja-nula respondieron significativamente mejor a la quimioterapia de inducción y presentaron mejor supervivencia global que los pacientes con expresión moderada-intensa.

Desafortunadamente, el pequeño tamaño muestral de nuestro estudio ha podido influir en que esta diferencia en la supervivencia no alcanzara significación estadística.

5.- En nuestro estudio, el 58% de los pacientes con cáncer avanzado de laringe expresan de manera moderada-intensa el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (KDR) en las membranas de las células tumorales. Este dato no había sido previamente comunicado en la literatura.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodrigo Tapia JP. Incidencia y etiología de los carcinomas de cabeza y cuello. En: Suárez Nieto C. Oncología de cabeza y cuello. Barcelona: Medicina stm; 2002. p. 1-14.
2. Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1996. CA Cancer J Clin 1996; 46: 5-27.
3. Parkin DM, Muir CS, Whelan SL et al. Cancer incidence in five continents. Vol VI. IARC Scientific Publications No. 120. Lyon: IARC, 1992.
4. Merino E, Hellín D, Girona et al. Cáncer de laringe en Murcia. Acta Otorrinolaringol Esp 1994; 45:37-40.
5. Quer M, León x, Orús C et al. Análisis de 2500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Acta Otorrinolaringol Esp 2001; 52: 201-205.
6. Murphy GP, Lawrence W Jr, Lenhard RE Jr. Oncología clínica. Manual de la American Cancer Society. 2ª ed. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, 1996.
7. Jemal A, Murria T, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55:10-30.
8. Cáncer en España. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 1993.
9. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, version IARC CancerBase No. 5. Lyon: IARC Press, 2001. <Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>>. [Fecha de consulta: 2 de Junio de 2003].
- 10- Calbo F, Oña S, Fernández I. Registro abierto de tumores. Memoria de actividades 2002. Málaga: Asociación Española Contra el Cáncer.

11. Monge Álvarez JJ, Sacristán T. Cáncer de laringe, tendencia temporal de la mortalidad (1952-1992) y predicción futura en España. En: Monge Álvarez JJ, Sacristán T. Cáncer de laringe. Madrid. Jarpyo editores, 1996. p. 15-19.
12. Plan Integral de Oncología 2002-2006. Junta de Andalucía. Consejería de Salud; 2002.
13. Robbins et al. Cabeza y cuello: patología estructural y funcional. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, 2000.
14. Bartual MJ, Sacristán T. Cáncer laríngeo y faringolaríngeo. Ponencia oficial de IX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Otorrinolaringología y patología cérvicofacial; Málaga; 1975.
15. Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.): World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.
16. Cardesa A, Alos LL, Nadal J et al. Avances en Anatomía patológica del carcinoma laríngeo. En: Álvarez, Sacristán. Cáncer de laringe. Madrid. Jarpyo editores, 1996. p. 21-40.
17. Kirchner JA, Cornog JL y Holmes RE. Transglottic cancer. Its growth and spread within the larynx. Arch Otolaryng 1974; 99: 247-251.
18. Lundgren JA, Van Nostrand AWP, Harwood AR, et al. Verrucous carcinoma (Ackerman's tumor) of the larynx: diagnostic and therapeutic considerations. Head Neck Surg 1986; 9: 19-26.
19. Alvarez C, Llorente JL. Tumores de laringe: oncología de cabeza y cuello. Barcelona: Medicina STM, 2002.

20. Mills SE, Gaffey MJ and Frierson HF. Tumours of the upper aerodigestive tract and ear. Maryland: Armed Forces Institute of Pathology, 2000.
21. Kirchner J, Carter D. Pathology of the Larynx. En: Diagnostic surgical pathology. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 1999. p. 925-947.
22. Luna MA, Tortoledo ME. Verrucous carcinoma. En: Gnepp DR, ed. Pathology of the head and neck. New York: Churchill Livingstone, 1988. p. 497-515.
23. Tharp ME, Shidnia H. Radiotherapy in the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck. Laryngoscope 1995; 105: 391-6.
24. Zaatari GS, Santoniani RA. Adenoid squamous cell carcinoma of the nasopharynx and neck region. Arch Pathol Lab Med 1986; 110: 542-6.
25. Ferlito A, Friedman I. Review of neuroendocrine carcinomas of the larynx. Ann Otol Rhinol Laryngol 1989; 98: 780-90.
26. Gnepp DR. Small cell neuroendocrine carcinoma of the larynx. A critical review of the literature ORL. J Otorhinolaryngol Relact Spec 1991; 53: 210-9.
27. García-Puche JL, Castillo I, Cueto J. Tratamiento de la enfermedad locoregional avanzada. En: González M. Cáncer de cabeza y cuello. 1ª ed. Madrid: Ergon; 1995. p. 121-138.
28. Myers EN, Suen JY, Myers JN et al. Cancer of the Head and Neck 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2003.
29. Schantz SP, Harrison LB, Forastiere AA. Tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity and oropharynx. En: De vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds): Principles of oncology, 5º ed. Philadelphia, PA: Lippincott, 1997. p. 741-801.

30. Al Sarraf M. Head and neck cancer treatment: present status and future direction. En: Benzet P, Holland JF, Khayat D, Weil M eds. Cancer treatment. An update. Paris: Springer-Verlag, 1994. p. 185-190.
31. Schwartz AW. Dr Theodore Billroth and the first laryngectomy. *Ann Plast Surg* 1978; 1: 513.
32. Ogura JH, Sessions DG, Spector GJ: Conservation Surgery for epidermoid carcinoma of the supraglottic larynx. *Laryngoscope* 1975; 85: 1808.
33. Naudo P, Laccourreye O, Weinstein G et al. Functional outcome and prognosis factors after supracricoid partial laryngectomy with cricohyoidopexy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 291-296.
34. Chevalier D, Laccourreye O, Brasnu D et al. Cricohyoidoepiglottopexy for glottic carcinoma with fixation or impaired motion of the true vocal cord: 5-year oncologic results with 112 patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106: 364-369.
35. Pearson BW, Woods RD, Hartman DE et al. Extended hemilaryngectomy for T3 glottic carcinoma with preservation of speech and swallowing. *Laryngoscope* 1980; 90: 1950- 1954.
36. Pearson BW, De Santo LW, Olsen KD et al. Results of near-total laryngectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998; 107: 820-825.
37. Thupchong L, Phil D, Scott CB et al. Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21-28.

38. Amdur RJ, Parson JT, Mendenhall WM. Postoperative irradiation for squamous cell carcinoma of the head and neck: an análisis of treatment results and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 16: 25-36.
39. Jacobs C, Goffinet DR, Goffinet L, et al. Chemoterapy as a substitute for surgery in the treatment of advances resectable head and neck cancer. A report from the Northern California Oncology Group. *Cancer* 1987; 60: 1178-1183.
40. Pfister DG, Laurie SA, Weinstein GS, et al. Clinical practice guideline for the use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3693-704.
41. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiotherapy compared with surgery plus radiotherapy in patients with advances laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1685-1690.
42. Spaulding MB, Fisher SG, Wolf GT. Tumor response, toxicity, and survival after neoadjuvant organ-preserving chemotherapy for advanced laryngeal carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 1592-1599.
43. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B et Al. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 890-899.
44. De Andrés L, Brunet J, López-Pousa A et al. Function preservation in stage III squamous laryngeal carcinoma: results with an induction chemotherapy protocol. *Laryngoscope* 1995; 105: 822-826.
45. Eisbruch A, Thortnon AF, Urba S et al. Chemotherapy followed by accelerated fractionated radiation for larynx preservation in patients with advanced laryngeal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2322-2330.

46. Urba SG, Forastiere AA, Wolf GT et al. Intensive induction chemotherapy and radiation for organ preservation in patients with advanced resectable head and neck carcinoma. *J Clin Oncol* 1994; 12: 946-53.
47. Karp DD, Vaughan CW, Carter R et al. Larynx preservation using induction chemotherapy plus radiation therapy as an alternative to laryngectomy in advanced head and neck cancer. A long-term follow-up report. *Am J Clin Oncol* 1991; 14: 273-9.
48. Cruz Hernández JJ. Tratamiento del cáncer localmente avanzado, resecable de cabeza y cuello. En: Documentos Consenso Oncología Cabeza y Cuello. Madrid: Nova Sidonia Oncológica, 2000: 43-65.
49. Forastiere AA, Goepfert H, Maor M et al. Concurrent Chemotherapy and Radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *N Eng J Med* 2003; 349: 2091-8.
50. Fu KK, Pajak TF, Trotti A et al. A Radiation Therapy Group (RTGO) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: First report of RTGO 9003. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 48: 7-16, 2000.
51. Taylor S, Murphy AK, Vannetzelj M. Randomized comparison of neoadjuvant cisplatin and fluouracil infusion followed by radiation versus concomitant treatment in advanced head and neck cancer. *J Clin Oncol* 1994; 312: 385-395.
52. Adelstein DJ, Scharan VM, Earle AS et al. Simultaneous versus sequential combined technique therapy for squamous cell head and neck cancer. *Cancer* 1990; 65: 1685-1691.

53. Brizel DM, Albers ME, Fisher SR et al. Hyperfractionated irradiation with or without concurrent chemotherapy for locally advanced head and cancer. N Engl J Med 1998; 16: 1310-7.
54. Rinehart J, Ruff T, Cheung A et al. Neoadjuvant and concomitant chemotherapy and radiation therapy in patients with advanced head and neck carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg. 2005; 132:69-74.
55. Hitt R, Grau J, Lopez-Pousa A, et al. Randomized phase II/III clinical trial of induction chemotherapy (ICT) with either cisplatin/5-fluorouracil (PF) or docetaxel/cisplatin/5-fluorouracil (TPF) followed by chemoradiotherapy (CRT) vs. CRT alone for patients (pts) with unresectable locally advanced head and neck cancer (LAHNC). J Clin Oncol, 2006; 24: 5515.
56. Calais G, Pointreau Y, Alfonsi M et al. Randomized phase III trial comparing induction chemotherapy using cisplatin (P) fluorouracil (F) with or without docetaxel (T) for organ preservation in hypopharynx and larynx cancer. Preliminary results of GORTEC 2000-01. J Clin Oncol 2006 ; 24: 5506.
57. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. N Engl J Med 2007; 357:1695-704.
58. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. N Engl J Med. 2007; 357: 1705-15.
59. Bonner JA, Harare PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus Cetuximab for Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. N Engl J Med 2006; 354: 567-578.
60. Neal D, Sharples L, Smith K. The epidermal growth factor receptor and the prognosis of bladder cancer. Cancer 1990; 65: 1619-25.

- 61- Mukaida H, Toi M, Hirai T. Clinical significance of the expression of epidermal growth factor and its receptor in esophageal cancer. *Cancer* 1991; 68: 142-8.
62. Battaglia F, Scambia G, Benedetti P. Epidermal growth factor receptor expression in gynecological malignancies. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 27:42-44.
63. Baucknecht T, Runge M, Schwall M. Occurrence of epidermal growth factor receptors in human adnexal tumours and their prognostic value in advanced ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 1988; 29: 147-57.
64. Scambia G, Benedetti P, Battaglia F. Significance of epidermal growth-factor receptor in advanced ovarian cancer. *Clin Oncol* 1992; 10:529-35.
65. Scambia G, Panici P, Battaglia F, Ferrandina G. Receptors for epidermal growth factor and steroid hormones in primary laryngeal tumors. *Cancer* 1991; 67: 1347-51.
66. Lee CS, Redshaw A, Boag. Epidermal growth factor receptor immunoreactivity in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathology* 1997; 29: 251-4.
67. Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, et al. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Int* 1998; 90: 824-32.
68. Maurizi M, Almadori G, Ferrandina G et al. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 1253-7.
69. Maurizi M, Almadori G, Cadoni G. Expression of receptor for epidermal growth factor in cancer of larynx. *Act Med Rom* 1992; 30: 89-96.
70. Maurizi M, Scambia G, Benedetti P. Egf receptor expression in primary squamous laryngeal cancer: correlation with clinico-pathological features and prognostic significance. *Int J Cancer* 1991; 52: 862-6.

71. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist H. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in severe dysplasia and carcinoma in situ of the vocal cords. *Acta Otolaryngol* 1991; 111: 149-52.
72. Miyaguchi M, Olofsson J, Hellquist H. Expression of epidermal growth factor receptor in epiglottic carcinoma and its recurrence after radiotherapy. *Clin Otolaryngol* 1991; 16: 466-9.
73. Santini J, Formento JL, Francoul M, Milano G. Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck* 1991; 13: 132-9.
74. Wen QH, Niwa T, Yoshizaki, et al. Prognostic value of EGFR and TGF-alpha in early laryngeal cancer treated with radiotherapy. *Laryngoscope* 1996; 106: 884-88.
75. Christensen M, Therkildsen M, Hansen B, et al. Immunohistochemical detection of epidermal growth factor receptor in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1992; 112: 734-8.
76. Almadori G, Cadoni G, Maurizi M et al. Oncogenes and cancer of the larynx. EGFR, p21 ras and HPV-DNA infections. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1995; 15: 1-22.
77. Eriksen JG, Steiniche T, Askaa J et al. The prognostic value of epidermal growth receptor is related to tumor differentiation and the overall treatment time of radiotherapy in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Radiant Oncol Biol Phys* 2004; 58: 561-6.
78. Almadori G, Cadoni G, Galli J et al. Epidermal growth factor receptor expresión in primary laryngeal cancer: independent prognostic factor of neck node relapse. *Int J Cancer* 1999; 84: 188-91.

79. Pivot X, Magne N, Guardiola E et al. Prognostic impact of the epidermal growth factor receptor levels for patients with larynx and hypopharynx cancer. *Oral Oncol* 2005; 41: 320-7.
80. Morrison LE, Jacobson KK, Friedman M et al. Aberrant EGFR and chromosome 7 associate with outcome in laryngeal cancer. *Laryngoscope* 2005; 115:1212-8.
81. Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E. Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest.* 1993; 91: 2235-43.
82. Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 768-72.
83. Homer JJ, Prentice MG, Cawkcwell L, Birchall M, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factors A and C in squamous cell carcinoma of the piriform fossa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2003; 129: 1110-4.
84. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. Angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2000 Jun; 25: 169-80.
85. Smith BD, Smith GL, Carter et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2046-2052.
86. Kyzas PA, Cunha IW, Ionnidis JP. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinoma: a metaanalysis. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1434-1440.

87. Parikh RR, Yang Q, Haffty BG. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in T1-2 no laryngeal cancer treated with primary radiation therapy. *Cancer*. 2007;109: 566-73.
88. Homer JJ, Greenman J, Stafford ND. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in early laryngeal cancer: relationship with radioresistance. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2001; 26: 498-504.
89. Neuchrist C, Quint C, Pammer A, Burian M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and microvessel density in squamous cell carcinomas of the larynx: an immunohistochemical study. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 732-8.
90. Teknos TN, Cox C, Yoo S, Chepeha DB, Wolf GT, Bradford CR, Carey TE, Fisher SG. Elevated serum vascular endothelial growth factor and decreased survival in advanced laryngeal carcinoma. *Head Neck*. 2002; 24: 1004-11.
91. Liu TJ, Naggar AK, McDonnell TJ et al. Apoptosis induction mediated by wild-type p53 adenoviral gene transfer in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55: 3117-3122.
92. Pirollo KF, Hao Z, Rait A et al. p53 mediated sensitisation of squamous cell carcinomas of the head and neck to radiotherapy. *Oncogene* 1997; 14: 1735-1746.
93. Osman I, Sherman E, Bhuvanesh S et al. Alteration of p53 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck: impact on treatment outcome in patients treated with larynx preservation intent. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2980-2987.
94. Temam S, Flahault A, Perie S et al. P53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol* 2000; 18: 385-394.

95. Bradford CR, Zhu S, Wolf GT, et al. Overexpression of p53 predicts organ preservation using induction chemotherapy and radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 113: 408-412.
96. Bradford CR, Zhu S, Poore J et al. P53 mutation as a prognostic marker in advanced laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123: 605-9.
97. Koch WM et al. P53 Mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88: 1580-6.
98. Khota S, Nasser A, Jing W et al. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Gene Expression by p53. *J Biol Chem* 1999; 274: 10991-10915.
99. Gallo O, Schiavone N, Papucci L et al. Down-Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Cyclooxygenase-2 Pathways by p53 in Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol* 2003; 163: 723-32.
100. Chatrath P, Scott IS, Morris LS et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*. 2003; 89: 1048-54.
101. Mirza S, Jeannon JP, Soames J, Wilson JA. Is Ki67 a marker for the transformation of laryngeal dysplasia to carcinoma?. *Acta Otolaryngol* 2006; 126: 418-21.
102. Urpegui García AM, Morandeira García MJ, Soria Navarro J, et al. Immunohistochemical markers of cell proliferation in laryngeal carcinoma. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2000; 51: 279-87.
103. Golusiński W, Olofsson J, Szmeja Z, Majewski P. P53, PCNA and Ki67 in laryngeal cancer. *Pol J Pathol*. 1996; 47: 175-82.

104. Mielcarek-Kuchta D, Olofsson J, Golusinski W. p53, Ki67 and cyclin D1 as prognosticators of lymph node metastases in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260: 549-54.
105. Roland NJ, Caslin AW, Bowie GL, Jones AS. Has the cellular proliferation marker Ki67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck?. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1994; 19: 13-8.
106. Jackel MC, Mitteldorf C, Schweyer S et al. Clinical relevance of Fas (APO-1/CD95) expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 646-52.
107. Yoo SS, Carter D, Turner BC, et al. Prognostic significance of cyclin D1 protein levels in early-stage larynx cancer treated with primary radiation. *Int J Cancer* 2000; 90: 22-8.
108. Yuen AP, Lam KY, Choy JT et al. The clinicopathological significance of BCL-2 expression in the surgical treatment of laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol* 2001; 26: 129-33.
109. Kang R, Freire MJ, Sigal E, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human and animal model of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996; 35: 711-718.
110. Khan KNM, Masferrer JL, Woerner BM et al. Enhanced Cyclooxygenase-2 Expression in Sporadic and Familial Adenomatous Polyposis of the Human Colon. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 865-869.
111. Sawaoka H, Kawano S, Tsuji M, et al. Helicobacter pylori infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot. Essent Fatty Acids* 1998; 59: 313-316.

112. Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase expression in *Helicobacter pylori* associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am Pathol* 2000; 57: 729-735.
113. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, et al. Expresión of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3789-3789.
114. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1276-1280.
115. Sung JJ, Leung WK, Go MY, et al. Cyclooxygenase expression in *Helicobacter pylori* associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am Pathol* 2000; 57: 729-735.
116. Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA et al. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 198-204.
117. Awad A, Yamamoto H, Doki Y, et al. Up-regulation of Cyclooxygenase-2 in Squamous Carcinogenesis of the Esophagus. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 1229-1238.
118. Souza RF, Shewmake K, Beer DG et al. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-72.
119. Shamma A, Yamamoto H, Doki Y et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6(4): 1229-38.
120. Buskens CJ, Van Rees BP, Sivula A et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in patients with adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology* 2002; 122: 1800-7.

121. Maaser K, Däubler P, Barthel B, et al. Oesophageal squamous cell neoplasia in head and neck cancer patients: upregulation of COX-2 during carcinogenesis. *Br J Cancer* 2003; 88: 1217-22.

122. Half E et al. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 2002; 62: 1676-1681.

123. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitaó D, Amendoeira I, Scmittht FC. Cyclooxygenase-2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55: 429-434.

124. Ristimäki A, Sivula A, Lufin J et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res* 2002; 62: 632-635.

125. Shim JY et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is associated with breast carcinoma and its poor prognostic factor. *Mod Pathol* 2003; 16: 1199-1204.

126. Parret M et al. Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 1997; 10: 503-507.

127. Yoshimatsu K, Nasser K, Golijanin D et al. Inducible Prostaglandin E Synthase is overexpressed in Non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2669-2674.

128. Denkert C, Köbel M, Pest S et al. Expression of cyclooxygenase 2, is an independent prognostic factor in human ovarian carcinoma?. *Am J Pathol* 2002; 160: 893-903.

129. Willoughby DA, Moore AR and Colville-Nash. COX-1, COX-2, COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* 2000; 355: 646-648.

130. Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Over-expression of cyclooxygenase (Cox)-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic. *Biol Chem* 2001; 276: 18563-69.

131. Masferrer JL, Leía KM, Kaki AT, et al. Antiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase 2 inhibitors. *Cancer Res* 2000; 60:1306-1311.
132. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93: 705-16.
133. Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL, et al. Role of Cyclooxygenasa in Angiogenesis. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 1163-1170.
134. Cheng T et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and Basic fibroblast growth factor mRNA expression in culture rats Muller cells. *Invest Ophtalmol Vis Sci.* 1998; 39: 581-591.
135. Majita M, Hayashi I, Muramatsu M, et al. Cyclo-oxygenase-2 enhances basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor in rat sponge implants. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 641-649.
136. Williams CS, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000; 105: 1589-94.
137. Gately et al. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000; 19:19-27.
138. Zetter BR. Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med* 1998; 49: 407-424.
139. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem.* 1992; 267: 10931-10934.
140. Peterson HI. Tumor angiogenesis inhibition by prostaglandin synthetase inhibitors. *Anticancer Res* 1986; 6: 251-253.

141. Ziche M, Jones J, Gullino PM, et al. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69: 475-482.
142. Jones MK, Wang H, Peskar BM, et al. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 1999; 5: 1418-1423.
143. Masferrer JL, Koki A, Seibert K. COX-2 inhibitors, a new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889: 84-6.
144. Sawaoka H, Tsuji S, Tsujii M, et al. Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest*.1999; 79: 1469-1477.
145. Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30: 3-21.
146. Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide Synthase 2. *Cell*. 1995; 83: 493-501.
147. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, et al. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulateds bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4245-4249.
148. Kawamori T, Rao CV, Seibert K, et al. Chemo-preventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 409-412.
149. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, et al. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99: 2254-59.

150. Dohadwala M, Luo J, Zhu L, et al. Non-small cell lung cancer cyclo-oxygenase 2 dependent invasion is mediated by CD44. *J. Biol Chem* 2001; 276: 809-12.
151. Tsujii M, Kawano S, Du Bois RN. Cyclooxygenase 2 expression in human colon cancer increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3336-3340.
152. Lin DT, Subbaramiah K, Shah JP et al. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head Neck* 2002; 24: 792-9.
153. How LR, Dannenberg AJ. A role for cyclooxygenase-2 inhibitors in the prevention and treatment of cancer. *Semin Oncol* 2002; 29: 111-9.
154. Gasparini G, Longo R, Sarmiento R et al. Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents?. *Oncology* 2003; 4: 605-615.
155. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, et al. Cyclo-oxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncology* 2001; 2: 544-551.
156. Mestre JR, Chan G, Zhang F et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 889: 62-71.
157. Wang Z, Fuentes CF, Shapshay SM: Antigenic and chemopreventive activities of celecoxib in oral carcinoma cell. *Laryngoscope* 2002; 112: 839-843.
158. Milas L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme inhibitors as potential enhancers of tumor radioresponse. *Semin Radiat Oncol* 2001; 11: 290-299.
159. Karmali RA, Wustrow T, Thaler HT, Strong EW. Prostaglandins in carcinomas of the head and neck. *Cancer Lett* 1984; 22: 333-336.

160. Jung TK, Berlinger NT, Juhn SK. Prostaglandins in squamous cell of the head and neck: a preliminary study. *Laryngoscope* 1985; 95: 307-312.

161. Lee Dw, Sung MW, Park SW et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in human squamous cell carcinoma of the head and neck and inhibition of proliferation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Anticancer Res* 2002; 22: 2089-96.

162. Gallo O, Massini E, Bianchi B et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Human Pathol* 2002; 33: 708-14.

163. Gallo O et al. Cyclooxygenase-2 pathways correlates with VEGF expression in head and neck cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* 2001; 3: 53-61.

164. Peng JP, Su CY, Chang HC et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. *Hum Pathol* 2002; 33: 100-4.

165. Nathan CA, Leskov IL, Lin M et al. COX-2 expression in dysplasia of the head and neck: correlation with IF4E. *Cancer* 2001; 92: 1888-95.

166. Robinson AB, Das SK, Bruegger DE et al. Characterization of cyclooxygenase-2 in laryngeal papilloma by molecular techniques. *Laryngoscope* 1999; 109: 1137-41.

167. Raneletti FO et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2001; 95: 343-349.

168. Bayazit et al. Cyclo-oxygenase 2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma and its clinical correlates. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66: 65-9.

169. Nix P, Lind M, Greeman J et al. Expression of Cox-2 protein in radioresistant laryngeal cancer. *Annals of Oncology* 2004; 15: 797-801.

170. Cho EI, Kowalski DP, Sasaki CT et al. Tissue Microarray analysis reveals prognostic significance of COX-2 expression for local relapse in T1-2N0 larynx cancer treated with primary radiation therapy. *Laryngoscope* 2004; 114: 2001-8.
171. Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer* 1981; 47: 207-214.
172. Bocca E, Pignataro O, Mosciaro O. Surgery of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1968; 77: 1005-26.
173. Gallo O, Boddi V, Bottai G, et al. Treatment of the clinically negative neck in laryngeal cancer patients. *Head Neck* 1996; 18: 566-72.
174. Molinari R, Chiesa F, Cantu G, et al. Retrospective comparison of conservative and radical neck dissection in laryngeal cancer. *An Otol Rhinol Laryngol* 1980; 89: 578-581.
175. Davies G, et al. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. *Clin Cancer Research* 2003, 9: 2651-2656.
176. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 5 th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 41-46.
177. Urba S, Wolf G, Eisbruch A et al. Single-Cycle Induction Chemotherapy selects patients with advanced laryngeal cancer for combined chemoradiation: a new treatment paradigm. *Journal of Clinical Oncology* 2006; 24: 593-598.
178. Wolf GT. Integrating surgery into treatment paradigms for organ preservation: tailoring treatment to biology improves outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 4-7.
179. Bradford CR, Wolf GT, Carey TE, et al. Predictive markers for response to chemotherapy, organ preservation, and survival in patients with advanced laryngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 121: 534-8.

180. Chan G, Boyle JO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 991-994.

181. Maggiano JN, Gessi M, Lauriola L, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J cancer* 2001; 95: 343-349.

182. Wei Q, Sheng L, Shui Y et al. EGFR, HER2, and HER3 Expression in Laryngeal Primary Tumors and Corresponding Metastases. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1193-201.

183. Chen G, Liu Y, Wang J, et al. Expression of vascular endothelial growth factors and cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma and its significance. *J Huazong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006; 26: 105-7.

184. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E et al. Tumor specific activation of the VEGF/KDR angiogenic pathway in a subset of locally advanced squamous cell head and neck carcinomas. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 313-319.

185. Kyzas PA, Stefanou D, Batistatou A and Agnantis NJ: Potential autoendocrine function of vascular endothelial growth factor in head and neck cancer via vascular endothelial growth factor receptor-2. *Mod Pathol* 2005 ; 18: 485-494.

186. Marioni G, Giacomelli L, D'Alessandro E et al. Laryngeal carcinoma recurrence rate and disease-free interval are related to CD105 expression but not to vascular endothelial growth factor 2 (Flk-1/Kdr) expression. *Anticancer Res* 2008; 28: 551-7.

VIII. ANEXO I

TABLAS DE CORRELACIÓN ADICIONALES:

Tabla 14: *Expresión de COX2/grado histológico*

COX2 / Grado n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
Grado 1	14 (24%)	7 (12%)	21 (36%)
Grado 2	7 (12%)	8 (14%)	15 (25%)
Grado 3	12 (20%)	11 (19%)	23 (39%)
Total	33 (56%)	26 (44%)	59 (100 %)

p = 0.44

Tabla 15: *Expresión de COX2/categoría T*

COX /Categoría T n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
T1	3 (5%)	0	3 (5%)
T2	0	1 (2%)	1 (2%)
T3	22 (37%)	18 (31%)	40 (68%)
T4	8 (14%)	7 (12%)	15 (25%)
Total	33 (56 %)	26 (44%)	59 (100%)

p = 0.45

Tabla 16: *Expresión COX2/categoría N*

COX /Categoría T n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
N0	17 (29%)	11 (19%)	28 (48%)
N1	3 (5%)	3 (5%)	6 (10%)
N2a	5 (9%)	3 (5%)	8 (14%)
N2b	1 (2%)	1 (2%)	2 (4%)
N2c	3 (5%)	6 (10%)	9 (15%)
N3	4 (7%)	2 (3%)	6 (10%)
Total	33 (60%)	26 (44%)	59 (100%)

p = 0.75

Tabla 17: Expresión COX2/ Estadio tumoral

COX / Estadio n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
Estadio III	15 (26%)	13 (22%)	28 (48%)
Estadio IV	18 (30%)	13 (22%)	31 (52%)
Total	33 (56%)	26 (44%)	59 (100%)

p = 0.72

Tabla 18: Expresión EGFR / Estadio tumoral

EGFR / Estadio n (%)	EGFR < +++	EGFR +++	Total
Estadio III	11 (22%)	14 (29%)	25 (51%)
Estadio IV	10 (20%)	14 (29%)	24 (49%)
Total	21 (43%)	28 (57%)	49 (100%)

p = 0.86

Tabla 19: Expresión VEGF / Estadio tumoral

VEGF / Estadio n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
Estadio III	10 (20%)	13 (27%)	23 (47%)
Estadio IV	9 (18%)	17 (35%)	26 (53%)
Total	19 (39%)	30 (61%)	49 (100%)

p = 0.52

Tabla 20: Expresión KDR / Estadio tumoral

KDR / Estadio n (%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
Estadio III	11 (21%)	13 (25%)	24 (46%)
Estadio IV	11 (21%)	17 (33%)	28 (54%)
Total	22 (42%)	30 (58%)	52 (100%)

p = 0.63

Tabla 21: Expresión COX2 / Respuesta a la QT

COX / Resp QT n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
RC	14 (24%)	15 (25%)	29 (50%)
Ausencia de RC	19 (32%)	11 (19%)	30 (51%)
Total	33 (56%)	26 (44%)	59 (100%)

p= 0.24

Tabla 22: Expresión COX2 / Respuesta final

COX /Resp Final n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
RC	27 (46%)	20 (34%)	47 (80%)
Ausencia de RC	6 (10%)	6 (10%)	12 (20%)
Total	33 (56%)	26 (44%)	59 (100%)

p = 0.64

Tabla 23: Expresión COX2 / Recidiva-progresión

COX /Rec-Pro n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
No	15 (25%)	14 (24%)	29 (49%)
Sí	18 (31%)	12 (20%)	30 (51%)
Total	33 (56%)	26 (44%)	59 (100%)

p = 0.52

Tabla 24: Expresión EGFR / Respuesta a QT

EGFR / Resp QT n (%)	EGFR < +++	EGFR +++	Total
RC	13 (27%)	13 (26%)	26 (53%)
Ausencia de RC	8 (16%)	15 (31%)	23 (47%)
Total	21 (43%)	28 (57%)	49 (100%)

p = 0.28

Tabla 25: *Expresión EGFR / Respuesta final*

EGFR/ Resp Final n (%)	EGFR < +++	EGFR +++	Total
RC	16 (33%)	5 (10%)	21 (43%)
Ausencia de RC	24 (49%)	4 (8%)	28 (57%)
Total	40 (82%)	9 (18%)	49 (100%)

p = 0.39

Tabla 26: *Expresión EGFR / Recidiva-progresión*

EGFR/Rec-Pro n (%)	EGFR < +++	EGFR +++	Total
No	9 (18%)	12 (25%)	21 (43%)
Sí	18 (37%)	10 (20%)	28 (57%)
Total	27 (55%)	22 (45%)	49 (100%)

p = 0.13

Tabla 27: *Expresión VEGF / Respuesta Final*

VEGF/ Resp Final n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
RC	16 (33%)	3 (6%)	19 (39%)
Ausencia de RC	24 (49%)	6 (12%)	30 (61%)
Total	40 (82%)	9 (18%)	49 (100%)

p = 0.71

Tabla 28: *Expresión VEGF / Recidiva-progresión*

VEGF/ Rec-Pro n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
No	11 (22%)	8 (16%)	19 (39%)
Sí	16 (33%)	14 (29%)	30 (61%)
Total	27 (55%)	22 (45%)	49 (100%)

p = 0.75

Tabla 29: *Expresión KDR / Respuesta a QT*

KDR / Resp QT n (%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
RC	14 (27%)	14 (27%)	28 (54%)
Ausencia de RC	8 (15%)	16 (31%)	24 (46%)
Total	22 (42%)	30 (58%)	52 (100%)

p = 0.22

Tabla 30: *Expresión KDR / Respuesta Final*

KDR / Resp Final n (%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
RC	17 (33%)	5 (10%)	22 (42%)
Ausencia de RC	25 (48%)	5 (10%)	30 (58%)
Total	42 (81%)	10 (19%)	52 (100%)

p = 0.58

Tabla 31: *Expresión KDR / Recidiva-Progresión*

KDR / Rec-Pro n (%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
No	11 (21%)	11 (21%)	22 (42%)
Sí	16 (31%)	14 (27%)	30 (58%)
Total	27 (52%)	25 (48%)	52 (100%)

p = 0.81

Tabla 33: *Expresión COX2 / Estado último control*

COX /Estado n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
VSE	10 (20%)	12 (24%)	22 (44%)
Fallecidos por Cáncer	17 (34%)	11 (22%)	28 (56%)
Total	27 (54%)	23 (46%)	50 (100%)

p = 0.28

Tabla 34: *Expresión EGFR / Estado último control*

EGFR/Estado n (%)	EGFR < +++	EGFR +++	Total
VSE	6 (15%)	12 (30%)	18 (45%)
Fallecido por Cáncer	12 (30%)	10 (25%)	22 (55%)
Total	18 (45%)	22 (55%)	40 (100%)

p = 0.18

Tabla 35: *Expresión VEGF / Estado último control*

VEGF/ Estado n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
VSE	10 (25%)	9 (23%)	19 (48%)
Fallecido por Cáncer	7 (17%)	14 (35%)	21 (52%)
Total	17 (42%)	23 (58%)	40 (100%)

p = 0.21

Tabla 36: *Expresión KDR / Estado último control*

KDR / Estado n (%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
VSE	10 (23%)	9 (21%)	19 (44%)
Fallecido por Cáncer	10 (23%)	14 (33%)	24 (56%)
Total	20 (46%)	23 (54%)	43 (100%)

p = 0.47

Tabla 37: *Expresión COX2 / Expresión EGFR*

COX 2 /EGFR n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
EGFR < +++	13 (26%)	8 (16%)	21 (43%)
EGFR +++	16 (33%)	12 (25%)	28 (57%)
Total	29 (59%)	20 (41%)	49 (100%)

p = 0.73

Tabla 38: *Expresión COX2 / Expresión VEGF*

COX 2 /VEGF n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
VEGF nula-baja	10 (20%)	9 (18%)	19 (39%)
VEGF moderada-intensa	18 (37%)	12 (24%)	30 (61%)
Total	28 (57%)	21 (43%)	49 (100%)

p = 0.61

Tabla 39: *Expresión COX2 / Expresión KDR*

COX 2 /KDR n (%)	COX2 -	COX2 +	Total
KDR nula-baja	13 (25%)	9 (17%)	22 (42%)
KDR moderada-intensa	17 (33%)	13 (25%)	30 (58%)
Total	30 (58%)	22 (42%)	52 (100%)

p = 0.86

Tabla 40: *Expresión VEGF / Expresión EGFR*

VEGF / EGFR n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
EGFR < +++	10 (21%)	9 (19%)	19 (40%)
EGFR +++	8 (17%)	20 (43%)	28 (60%)
Total	18 (38%)	29 (62%)	47 (100%)

p = 0.96

Tabla 41: *Expresión KDR / Expresión EGFR*

KDR / EGFR n(%)	KDR nula-baja	KDR moderada-intensa	Total
EGFR < +++	10 (21%)	10 (21%)	20 (42%)
EGFR +++	9 (19%)	19 (40%)	28 (58%)
Total	19 (40%)	29 (60%)	48 (100%)

p = 0.21

Tabla 42: *Expresión VEGF / Expresión KDR*

VEGF / KDR n (%)	VEGF nula-baja	VEGF moderada-intensa	Total
KDR nula-baja	14 (29%)	5 (10%)	19 (39%)
KDR moderada-intensa	5 (10%)	25 (51%)	30 (61%)
Total	19 (39%)	30 (61%)	49 (100%)

p = 0.0

Tabla 44: Factores clínico-patológicos / SVG

	SVG a los 2 años	SVG a los 5 años	Significación
Estadio III	78.6%	67.5%	Significativo p= 0.012
IV	51.2%	35.4%	
GRADO 1	66.7%	52.4%	No significativo p= 0.71
2	66.7%	33.3%	
3	56.5%	43.5%	
Categoría T1-2	0	0	Significativo p= 0.0
T3	75%	54.6%	
T4	46.7%	26.7%	
Categoría N0	78.6%	60.7%	Significativo p= 0.001
N1	66.7%	50%	
N2	52.6%	31.6%	
N3	16.7%	0	
Resp a QT RC	72.4%	55.2%	Significativo p=0.04
RP	68.4%	42.1%	
No	36.4%	18.2%	

Tabla 46: Factores clínico-patológicos / TLP

	TLP a los 2 años	TLP a los 5 años	Significación
Estadio III	71.%	64.1%	Significativo p= 0.02
IV	38.3%	34%	
GRADO 1	66.7%	56.4%	No significativo. p= 0.8
2	46.7%	46.7%	
3	48.9%	43.5%	
Categoría T1-2	0	0	Significativo p= 0.004
T3	69.1%	63.5%	
T4	26.7%	20%	
Categoría N0	67.9%	60.3%	No significativo p= 0.16
N1	66.7%	50%	
N2	37.3%	37.3%	
N3	33.3%	33.3%	
Resp a QT RC	65.2%	57.2%	Significativo p= 0.08
RP	61.5%	55.4%	
No	18.2%	18.2%	

Tabla 47: Respuesta a QT/ Conservación laringe

QT/ CONSERVACION	No conserva	Sí conserva	Total
RC	0	29 (49%)	29 (49%)
RP	6 (10%)	13 (22%)	19 (32%)
No respuesta	6 (19%)	5 (9%)	11 (19%)
Total	12 (20%)	47 (80%)	(100%)

p= 0.0

Tabla 48: Categoría T / Conservación laringe

CATEGORÍA T/ CONSERVACION	No conserva	Sí conserva	Total
T1	0	3 (5%)	3 (5%)
T2	0	1 (2%)	1 (2%)
T3	9 (15%)	31 (52%)	40 (68%)
T4	3 (5%)	12 (20%)	15 (25%)
Total	12 (20%)	47 (80%)	59 (100%)

p = 0.76

Tabla 49: Estadio/ Conservación laringe

ESTADIO/CONSERVACIÓN n(%)	No conserva	Sí conserva	Total
III	7 (12%)	21 (36%)	28 (48%)
IV	5 (8%)	26 (44%)	31 (52%)
Total	12 (20%)	47 (80%)	59 (100%)

p =0.39

Tabla 50: Expresión COX2 / Conservación laringe

COX/conservación n (%)	No conserva	Sí conserva	Total
COX2 -	8 (14%)	25 (42%)	33 (60%)
COX2 +	4 (7%)	22 (37%)	26 (44%)
Total	12 (20%)	47 (80%)	59 (100%)

p = 0.4

Tabla 51: *Expresión EGFR / Conservación laringe*

EGFR/Conservación n (%)	No conserva	Sí conserva	Total
EGFR < +++	5 (10%)	16 (33%)	21 (43%)
EGFR +++	4 (8%)	24 (49%)	28 (57%)
Total	9 (18%)	40 (82%)	49 (100%)

p = 0.39

Tabla 52: *Expresión VEGF / Conservación laringe*

VEGF/ conservación n (%)	No conserva	Sí conserva	Total
VEGF nula-baja	2 (4%)	17 (35%)	19 (39%)
VEGF moderada-intensa	8 (16%)	22 (45%)	30 (61%)
Total	10 (20%)	39 (80%)	49 (100%)

p = 0.17

Tabla 53: *Expresión KDR / Conservación laringe*

KDR / conservación n (%)	No conserva	Sí conserva	Total
KDR nula-baja	5 (10%)	17 (33%)	22 (42%)
KDR moderada-intensa	5 (10%)	25 (48%)	30 (58%)
Total	10 (19%)	42 (81%)	52 (100%)

p = 0.58

IX. ANEXO II

FIGURAS ADICIONALES:

Figura 2: Supervivencia específica

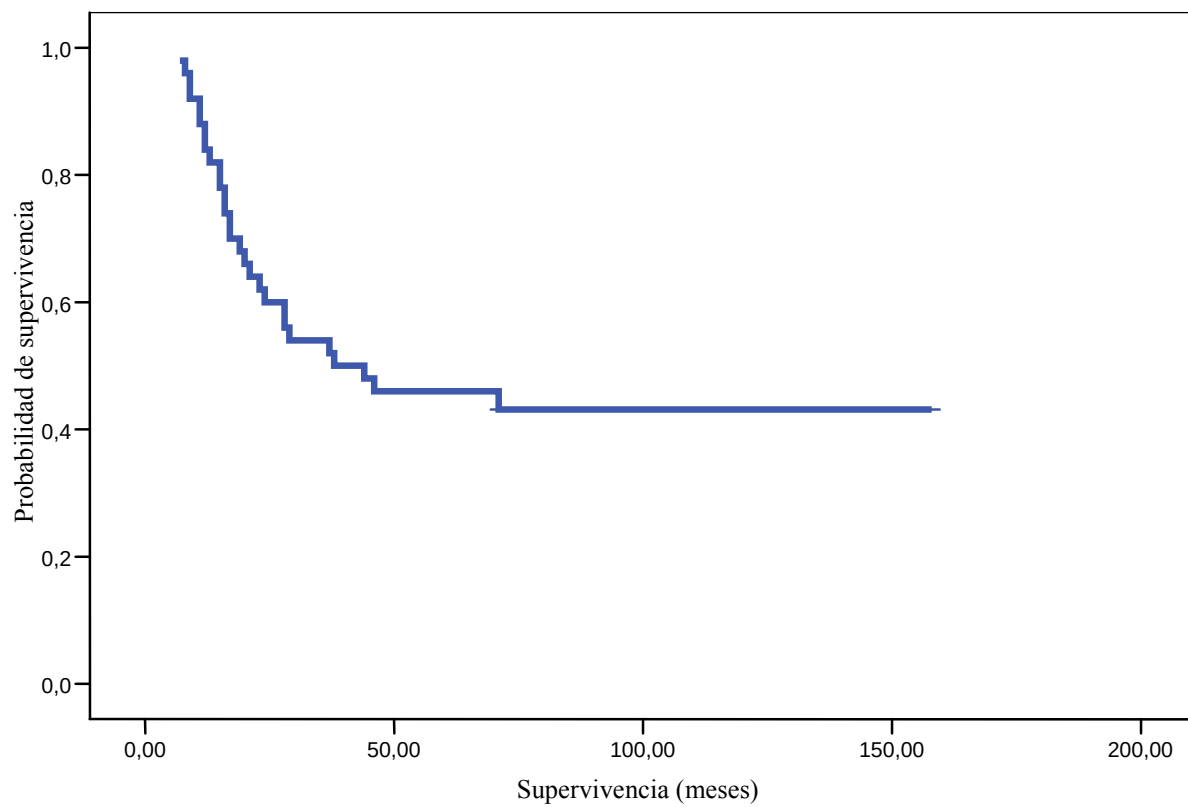


Figura 5: *SVG en COX2 - / Estadio tumoral*

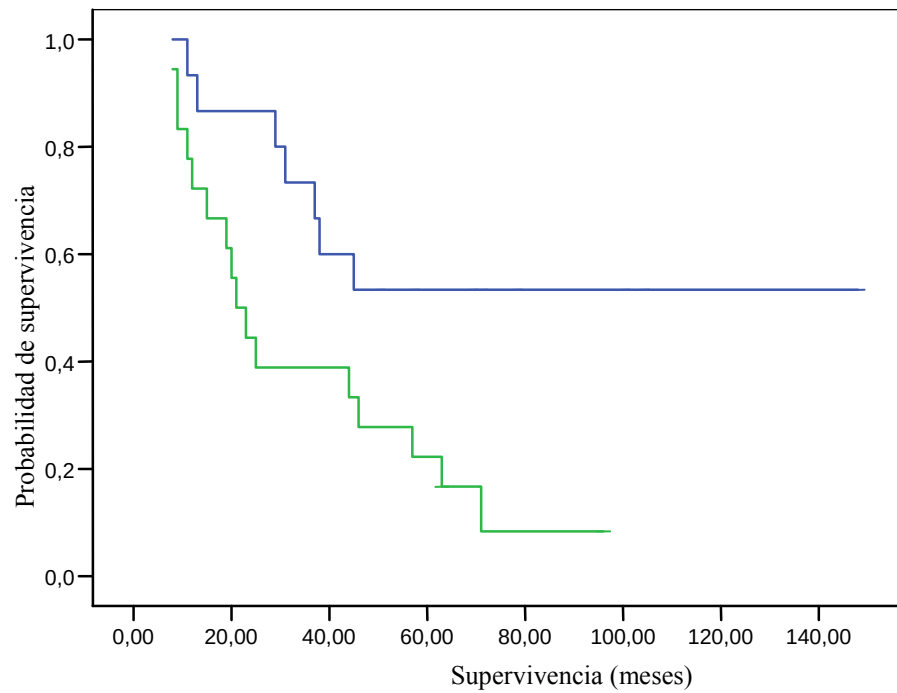


Figura 6: SVG en COX2+ / Estadío tumoral

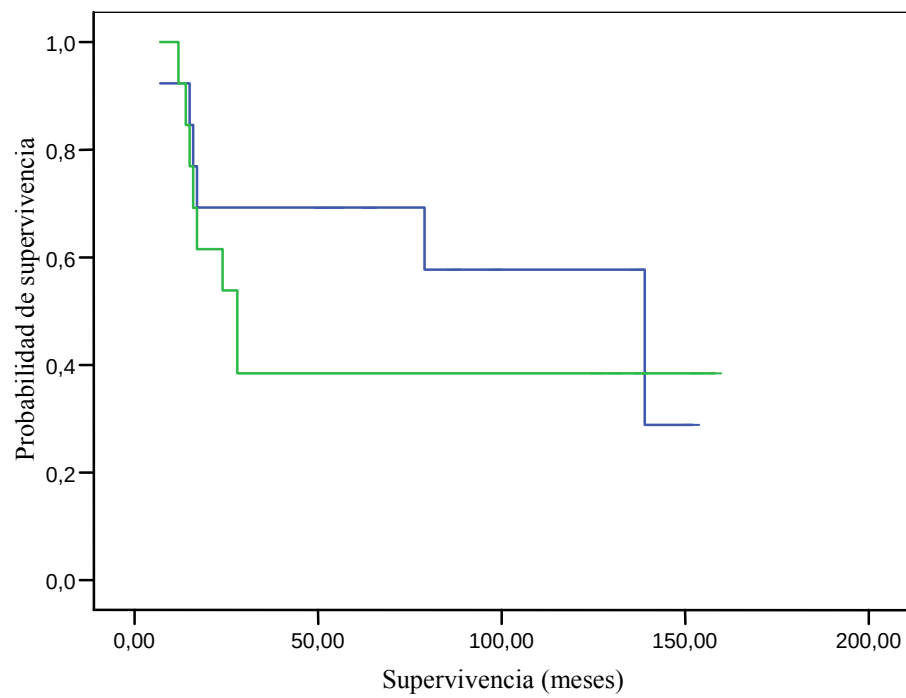


Figura 10: Supervivencia global / Respuesta a QT

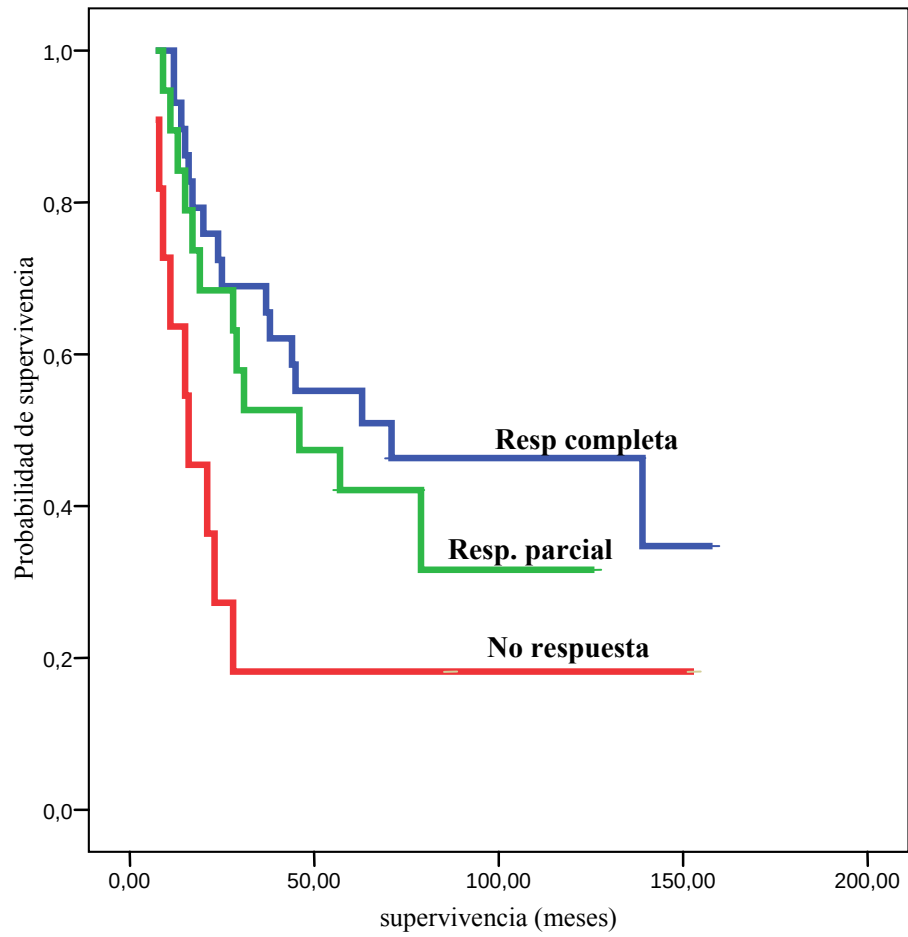


Figura 14: *Tiempo libre de progresión / Expresión EGFR*

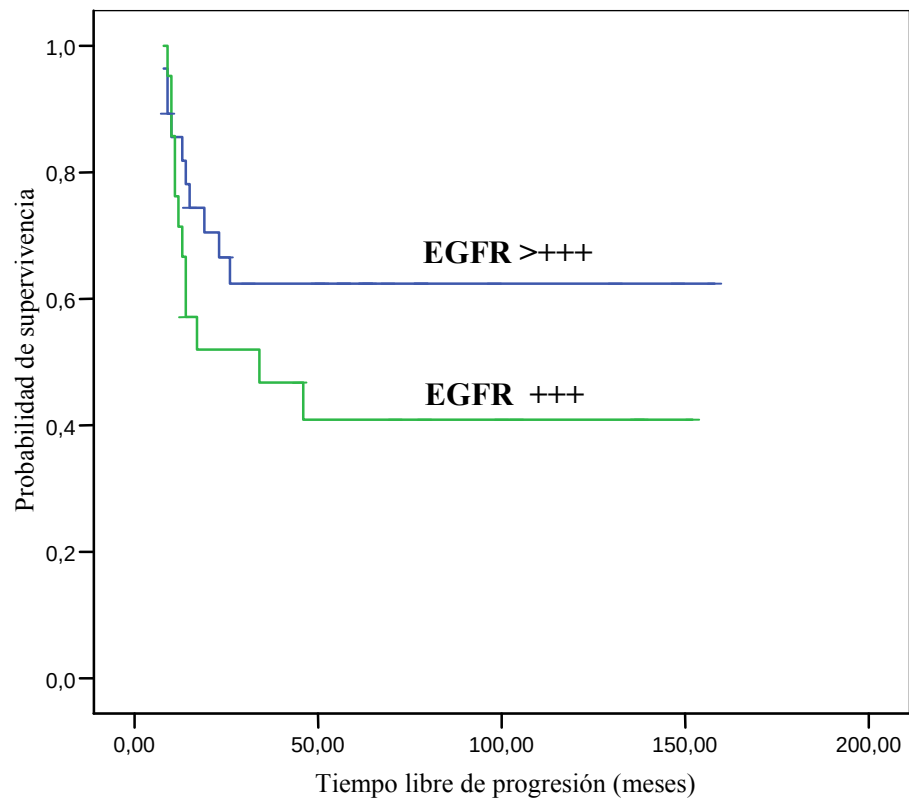


Figura 15: *Tiempo libre de progresión / expresión VEGF*

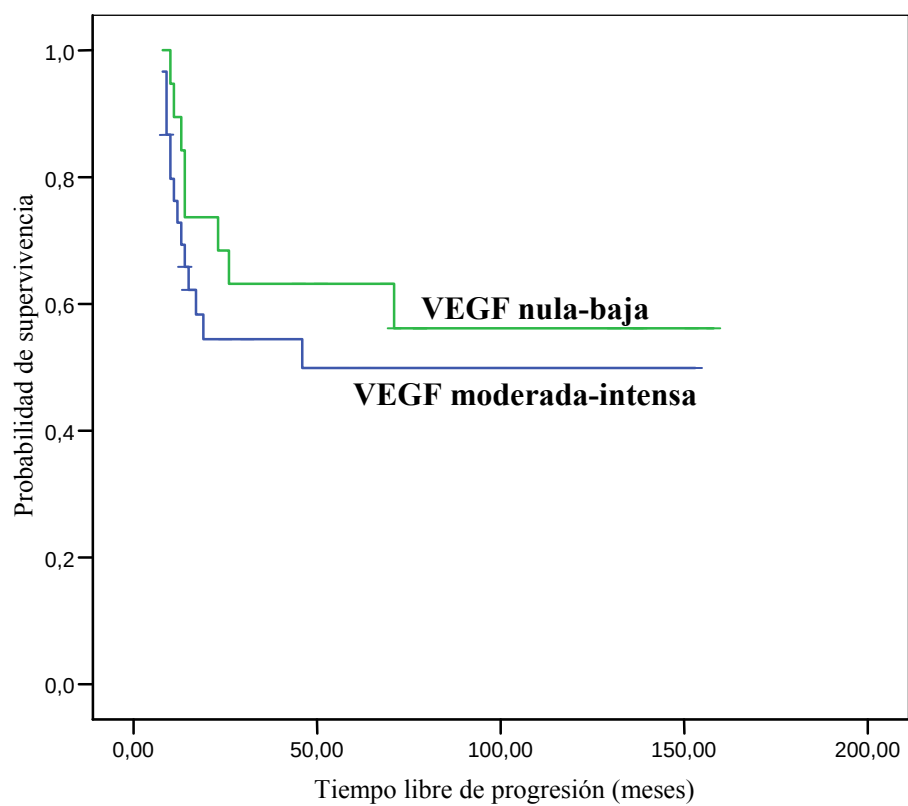


Figura 16: *Tiempo libre de progresión / expresión KDR*

