ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Manuel Eros
Rodríguez Fuentes

Tesis doctoral

Estudio sobre la mucositis oral asociada a tratamientos antineoplásicos sistémicos.

Santiago de Compostela, 2025

Programa de doctorado en Medicina Molecular

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESE DE DOUTORAMENTO

ESTUDIO SOBRE LA MUCOSITIS ORAL ASOCIADA A TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS SISTÉMICOS

Autor

Manuel Eros Rodríguez Fuentes

DIRECTOR: RAFAEL LÓPEZ LÓPEZ

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MANUEL EROS RODRÍGUEZ FUENTES

D. Manuel Eros Rodríguez Fuentes declara no tener ningún conflicto de intereses en relación con la Tesis Doctoral titulada:

Estudio sobre la mucositis oral asociada a tratamientos antineoplásicos sistémicos.

En **Santiago de Compostela, 23 de junio de 2025**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

A Mario por su incuestionable ayuda y su actitud motivadora en todo momento, sin él este trabajo no habría sido posible.

A Xabier, Alberto y Gema por sus aportaciones y colaboración desinteresada, además de su gran apoyo.

A Rafael López por haber confiado en mi para el desarrollo esta tesis.

Al equipo del servicio de Dermatología del CHUS por permitirme dedicarle tiempo a este proyecto y por hacerme ver que con tenacidad todo es posible.

A mi familia y amigos

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

Introducción y objetivos: el daño agudo de la mucosa oral es un efecto secundario común en pacientes oncológicos que reciben tratamientos contra el cáncer. Estas lesiones se caracterizan por la presencia de eritema, atrofia y/o ulceración del revestimiento de la cavidad oral. Se estima que la incidencia de mucositis oral en pacientes con tumores sólidos es de un 20-40%, mientras que en pacientes que reciben trasplantes de progenitores hematopoyéticos es de un 60-85%, y cercana al 100% en pacientes que reciben radioterapia en cabeza y cuello. Por este motivo, la mayor parte de las investigaciones es llevada a cabo en pacientes sometidos a radiación ionizante. Sin embargo, los oncólogos médicos tratan diariamente con este evento adverso debido a la capacidad de inducción de daño agudo en la mucosa oral que poseen los agentes antineoplásicos sistémicos en pacientes no irradiados. El manejo y las estrategias preventivas en práctica clínica para esta dolencia son controvertidos y su efectividad no es suficientemente clara. A pesar de que este evento adverso tradicionalmente se ha atribuido al efecto citotóxico de los agentes quimioterápicos sobre las células de la mucosa oral como consecuencia de su velocidad de replicación, la evidencia actual apunta a un origen multifactorial. Además, bajo condiciones normales se conoce que el biofilm oral ofrece una barrera protectora, aunque un cambio en el balance de sus componentes podría efectuar alteraciones en las vías de señalización y como consecuencia desencadenar procesos patológicos. El objetivo principal de este estudio es investigar el daño agudo de la mucosa oral secundaria al uso de antineoplásicos sistémicos en pacientes con cáncer no irradiados en práctica clínica a nivel mundial. Los objetivos secundarios incluyen: 1) definir la prevalencia del daño agudo de la mucosa oral en pacientes tratados con antineoplásicos sistémicos no experimentales mediante un meta-análisis; 2) identificar asociaciones entre el uso de antineoplásicos sistémicos y cambios en la composición del microbioma oral mediante una revisión sistemática de la literatura; 3)

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

determinar el tipo de muestra oral óptima para el análisis metagenómico a la hora de dilucidar cambios en la composición de la microbiota oral.

Material y métodos: Se llevaron a cabo dos revisiones sistemáticas siguiendo las guías PRISMA. El primer estudio incluyó artículos originales, estudios de cohortes y series de casos de participantes ≥18 años, no irradiados, sometidos a examinación oral tras la administración de antineoplásicos sistémicos aprobados para comercialización mediante el uso de escalas validadas. Las variables analizadas fueron: país, tamaño da muestra, género, edad, tipo de cáncer, tipo de terapia, presencia de metástasis, exposición previa a terapias oncológicas y grado de afectación de la mucosa oral. Las proporciones agrupadas se estimaron usando el modelo de efectos aleatorios con el programa informático STATA versión 17 (StataCorp, LLC, College Station, TX, USA). El segundo estudio incluyó artículos originales, casos clínicos y series de casos de sujetos ≥18 años que analizaron el microbioma oral mediante secuenciación genética, en pacientes con cáncer no irradiados, al menos antes y después de la administración de antineoplásicos sistémicos. Las variables analizadas fueron: características sociodemográficas, parámetros clínicos, tratamientos recibidos, tipo de muestras, variables relacionadas con el microbioma oral y el grado de afectación de la mucosa oral. La media fue calculada usando el programa informático SPSS Statistics (IBM Corp. Lanzado en 2020, Versión 27.0. Armonk, NY, USA). La tercera investigación fue un estudio piloto, observacional, descriptivo y transversal llevado a cabo entre la Clínica de la Facultad de Odontología de la USC y el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) en el que cada uno de los 6 participantes sanos proporcionaron 3 muestras orales diferentes (saliva, enjuague oral y tejido de la mucosa oral). Las muestras fueron secuenciadas mediante tecnología Illumina Miseq y el análisis de datos y metagenómico del amplicón 16S rRNA se realizó con: BaseSpace Sequence Hub versión 7.11.0; Python versión 3.8.13; QIIME 2 versión 2022.2.0; q2cli versión 2022.2.0; FastQC v0.11.9; fastp 0.23.2; cutadapt 3.7 y multiqc versión 1.12.

Resultados: Primero, 82 artículos fueron seleccionados para concluir que la prevalencia total del daño agudo en la mucosa oral fue de un 38.2% (95% IC: 33.1%-43.3%) en pacientes con cáncer, no irradiados, sometidos a antineoplásicos sistémicos. La prevalencia no fue estadísticamente diferente entre los pacientes tratados con quimioterapia, los tratados con terapias dirigidas por si solas y los sometidos a tratamiento combinado. Segundo, 5 artículos de 155, que incluían una media de 49 sujetos, cumplieron criterios de elegibilidad para analizar la

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

relación entre la microbiota oral y el uso de agentes antineoplásicos sistémicos en pacientes no irradiados. Todos ellos estudiaron el bacterioma y solamente 3 se centraron en el micobioma. Un artículo demostró la asociación entre el incremento en la proporción de géneros bacterianos patogénicos con una variabilidad transitoria en la diversidad α y β, en la mucosa oral de pacientes que reciben quimioterapia. Otro estudio halló una reducción en la diversidad alfa en la saliva de pacientes que recibieron tratamiento quimioterápico. Tercero, la diversidad alfa bacteriana fue superior en muestras de enjuague oral comparado con la saliva completa no estimulada y el tejido mucoso oral (p=0,005) en sujetos sanos. Sin embargo, las muestras de saliva mostraron una abundancia relativa de especies identificadas de un 56%, frente a un 30% en enjuague oral y solamente un 1% en muestras de tejido de mucosa oral.

Conclusiones: El daño agudo de la mucosa oral tiene una prevalencia del 38,2% en pacientes no irradiados que reciben antineoplásicos sistémicos, y es independiente del tipo de tratamiento antineoplásico sistémico empleado, del tipo de cáncer y de la localización geográfica. La disminución en la diversidad α bacteriana se correlaciona con el punto de mayor afectación de la mucosa oral en pacientes con cáncer que reciben agentes quimioterápicos. Se han identificado ciertas especies bacterianas patógenas del microbioma oral cuyo aumento se correlaciona con una mayor inestabilidad de la diversidad alfa y beta. El enjuague oral es el tipo de muestra oral que permite identificar una mayor diversidad alfa de microorganismos mediante técnicas de metagenómica. La saliva completa no estimulada es el tipo de muestra oral que permite obtener una mayor cantidad de especies bacterianas identificadas del microbioma.

RESUMO

Introdución e obxectivos: o dano agudo da mucosa oral é un efecto secundario común en pacientes oncolóxicos que reciben tratamentos contra o cancro. Estas lesións caracterízanse pola presenza de eritema, atrofia e/ou ulceración do revestimento da cavidade oral. Estímase que a incidencia da mucosite oral en pacientes con tumores sólidos é de un 20-40%, mentres que en pacientes que reciben transplantes de proxenitores hematopoéticos é dun 60-85%, e preto do 100% en pacientes que reciben radioterapia en cabeza e pescozo. Por este motivo, a meirande parte da investigación lévase a cabo en pacientes sometidos a radiación ionízante. Porén, os oncólogos médicos tratan con este evento adverso diariamente dado que os axentes antineoplásicos sistémicos inducen dano agudo na mucosa oral mesmo en pacientes non irradiados. O manexo e as estratexias preventivas en práctica clínica para esta doenza son controvertidos e a súa efectividade non é suficientemente clara. A pesar de que este evento adverso adoitaba atribuírse ao efecto cito-tóxico dos axentes quimioterápicos sobre as células da mucosa pola súa velocidade de replicación, a evidencia actual apunta a unha orixe multifactorial. Ademais, baixo condicións normais coñécese que o biofilm oral ofrece unha barreira protectora, aínda que un cambio no balance dos seus compoñentes podería efectuar alteracións nas vías de sinalización e como consecuencia desencadear procesos patolóxicos. O obxectivo principal deste estudio é investigar o dano agudo da mucosa oral secundaria ao uso de antineoplásicos sistémicos en pacientes con cancro non irradiados na práctica clínica a nivel mundial. Os obxectivos secundarios inclúen: 1) definir a prevalecía do dano agudo da mucosa oral en pacientes tratados con antineoplásicos sistémicos non experimentais mediante unha meta-análise; 2) identificar asociacións entre o uso de antineoplásicos sistémicos e cambios na composición do microbioma oral mediante revisión unha sistemática da literatura; 3) determinar

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

o tipo de mostra oral óptima para o análise metaxenómico á hora de dilucidar cambios na composición da microbiota oral.

Materiais e métodos: Desenvolvéronse dúas revisións sistemáticas seguindo as guías PRISMA. O primeiro estudio incluíu artigos orixinais, estudios de cohortes e series de casos de participantes ≥18 anos, non irradiados, sometidos a avaliación oral trala administración de antineoplásicos sistémicos aprobados para comercialización mediante o uso de escalas validadas. As variables analizadas foron: país, tamaño da mostra, xénero, idade, tipo de cancro, tipo de terapia, presenza de metástases, exposición previa a terapias oncolóxicas e grado de afectación da mucosa oral. As proporcións agrupadas estimáronse usando o modelo de efectos aleatorios co programa informático STATA versión 17 (StataCorp, LLC, College Station, TX, USA). O segundo estudio incluíu artigos orixinais, casos clínicos e series de casos de suxeitos ≥18 anos nos que se analizou o microbioma oral mediante secuenciación xenética en pacientes con cancro non irradiados, polos menos antes e despois da administración de antineoplásicos sistémicos. As variables analizadas foron: características socio-demográficas, parámetros clínicos, tratamentos recibidos, tipo de mostras empregadas, variables relacionadas co microbioma oral e o grado de afectación da mucosa oral. A media calculouse usando o programa informático SPSS Statistics (IBM Corp. Lanzado en 2020, Versión 27.0. Armonk, NY, USA). A terceira investigación foi un estudo piloto, observacional, descritivo e transversal levado a cabo entre a Clínica da Facultade de Odontoloxía da USC e o Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) no que cada un dos 6 participantes sans proporcionaron 3 mostras orais diferentes (saliva, enxaugadura oral e tecido da mucosa oral). As mostras foron secuenciadas mediante tecnoloxía Illumina Miseq, e os datos e a análise metaxenómica do amplicon 16S rRNA realizouse con: BaseSpace Sequence Hub versión 7.11.0; Python versión 3.8.13; QIIME 2 versión 2022.2.0; q2cli versión 2022.2.0; FastQC v0.11.9; fastp 0.23.2; cutadapt 3.7 e multiqc versión 1.12.

Resultados: Primeiro, 82 artigos foron seleccionados para concluír que a prevalecía total do dano agudo na mucosa oral foi de un 38.2% (95% IC: 33.1%-43.3%) en pacientes con cancro, non irradiados, sometidos a antineoplásicos sistémicos. A prevalecía non foi estatisticamente diferente entre o os pacientes que recibiron tratamento con quimioterapia, os que recibiron terapias dirixidas unicamente e os pacientes sometidos a tratamentos combinatorios. Segundo, 5 artigos de 155, que incluían unha media de 49 suxeitos, cumpriron criterios de elixibilidade

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para analizar a relación entre a microbiota oral e o uso de axentes antineoplásicos sistémicos en pacientes non irradiados. Todos eles estudaron o bacterioma e soamente 3 se centraron no micobioma. Un artigo demostrou a asociación entre o incremento na proporción de xéneros bacterianos patóxenos con unha variabilidade transitoria na diversidade α e β, na mucosa oral de pacientes que reciben quimioterapia. Outro estudio atopou unha redución na diversidade alfa da saliva de pacientes que recibiron tratamento quimioterápico. Terceiro, a diversidade alfa bacteriana foi superior en mostras de enxaugadura oral comparado coas mostras de saliva completa non estimulada e o tecido mucoso oral (p=0,005) en suxeitos sans. Sen embargo, as mostras de saliva completa mostraron unha abundancia relativa de especies identificadas dun 56%, fronte a un 30% en enxaugadura oral e soamente dun 1% en mostras de tecido de mucosa oral.

Conclusións: O dano agudo da mucosa oral ten unha prevalecía do 38,2% en pacientes non irradiados que reciben antineoplásicos sistémicos, e ademais é independente do tipo de tratamento antineoplásico sistémico recibido, do tipo de cancro e da localización xeográfica. A diminución na diversidade α bacteriana asóciase co punto de maior afectación da mucosa oral en pacientes con cancro que reciben axentes quimioterápicos. Identificáronse certas especies bacterianas patóxenas do microbioma oral cuxo aumento se asocia cunha maior inestabilidade da diversidade alfa e beta. O enxoito oral é o tipo de mostra oral que permite identificar unha maior diversidade alfa de microorganismos mediante técnicas de metaxenómica. A saliva completa non estimulada é o tipo de mostra oral que permite obter unha maior cantidade de especies bacterianas identificadas do microbioma oral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABSTRACT

Introduction and objectives: acute oral mucosal damage is a common side effect in oncological patients receiving anticancer treatments. These lesions are characterized by the presence of erythema, atrophy and/or ulceration of the oral cavity lining. It is estimated that oral mucositis incidence in patients with solid tumors is between 20-40%, while in patients undergoing hematopoietic progenitor transplants is between 60-85% and almost 100% in patients receiving radiotherapy to head and neck. For this reason, most of the research on the pathobiology of oral mucositis has been carried out in patients subjected to ionizing radiation. However, medical oncologists deal with this adverse event on a daily basis as systemic antineoplastic agents induce lesion to the oral mucosa even in non-irradiated patients. The management and prevention strategies in clinical practice for this condition are controversial and not sufficiently clear about their effectiveness. Although initially this adverse event used to be attributed to the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents on mucosal cells due to their speed of replication, the current evidence points to a multifactorial origin. Additionally, under normal conditions it is well known that oral biofilm offers a protective barrier, although an imbalance of its components could trigger some signaling pathways disturbances and subsequently pathological processes. The main objective of this study is to investigate the acute oral mucosa damage secondary to the use of systemic antineoplastic treatments worldwide in non-irradiated cancer patients in clinical practice. The secondary objectives include: 1) to define the prevalence of acute oral mucosa damage in patients receiving non-experimental systemic antineoplastics through a metanalysis; 2) to identify associations between the use of systemic antineoplastics and changes in the oral microbiome composition via systematic review of the literature; 3) to determine the optimal oral specimen for metagenomic analysis when trying to decipher changes in the oral microbiota composition.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Material and methods: Two systematic reviews were carried out following the PRISMA guidelines. The first study included original articles, cohort studies, and case series of ≥18-year-old non-irradiated participants' that had undergone oral assessment after administration of approved systemic antineoplastics using validated grading scales. The analyzed variables were, country, sample size, sex, age, type of cancer, type of therapy, presence of metastases, previous exposure to anticancer therapies, and oral mucosal damage grades. Pooled proportions were estimated using random-effect model method with software STATA version 17 (StataCorp, LLC, College Station, TX, USA). Second study included original articles, case reports and case series of subjects ≥18 years old that analyzed oral microbiome by genetic sequencing of oral specimens in non-irradiated cancer patients, obtained at least before and after systemic antineoplastic administration. The analyzed variables were sociodemographic characteristics, clinical parameters, received treatments, type of specimens, microbiome-related variables, and oral mucosa damage grading. The mean was calculated using SPSS Statistics software (IBM Corp. Released 2020, Version 27.0. Armonk, NY, USA). The third study was an observational, descriptive, and cross-sectional pilot study carried out between the Clinic of the Faculty of Dentistry (USC) and the Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) involving 6 healthy participants that provided 3 different oral specimens each (saliva, oral rinse and oral mucosal tissue). Samples were sequence through Illumina Miseq technology, and data and metagenomics of the 16S rRNA amplicon was analyzed with: BaseSpace Sequence Hub version 7.11.0; Python version 3.8.13; QIIME 2 version 2022.2.0; q2cli version 2022.2.0; FastQC v0.11.9; fastp 0.23.2; cutadapt 3.7 and multiqc version 1.12.

Results: First, 82 articles were selected to conclude that the overall prevalence of acute oral mucosal damage was 38.2% (95% CI: 33.1%-43.3%) in non-irradiated cancer patients undergoing systemic antineoplastics. The prevalence was not statistically different between chemotherapy-based regimes, targeted therapy-alone and combinational. Second, 5 out of 155 articles, including a mean of 49 subjects, were eligible to analyze the relationship between the oral microbiota and the use of systemic antineoplastic agents in non-irradiated patients. All of them studied bacteriome and only 3 focused on mycobiome. One article showed an association between the increase of three pathogenic-associated bacteria genera proportions and the α and β diversity transient variability, in the mucosa of patients receiving chemotherapy. Another study found a reduction in saliva alpha-diversity of patients receiving chemotherapy. Third, bacterial alpha diversity was higher in oral rinse samples compared to whole unstimulated saliva

and oral mucosa tissue (p=0,005) in healthy subjects. However, saliva specimens showed a 56% relative abundance of identified species followed by a 30% in oral rinse and only 1% in tissue samples of oral mucosa.

Conclusions: Acute oral mucosal damage has a prevalence of 38.2% in non-irradiated cancer patients receiving systemic antineoplastics, and it is independent of the type of therapeutic antineoplastic regime received, the type of cancer and the geographic location. A reduction in bacterial α diversity correlates with the peak of oral mucosa damage in cancer patients receiving chemotherapeutic. The increase of certain oral microbiome pathogenic bacterial species identified increase was associated with a higher alpha and beta diversity instability. Oral rinse is the type of oral specimen which allows to identify a higher microorganism-alpha diversity through metagenomic sequencing. Whole unstimulated saliva is the type of oral sample that allows to obtain the greatest amount of identified bacterial species from the oral microbiome.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

CA: California

CHUS: Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

DOAJ: *Directory of Open Access Journals*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNr: Ácido Ribonucleico ribosomal

dsADN: Ácido desoxirribonucleico de cadena doble

EE. UU: Estados Unidos de América

eHOMD: *expanded Human Oral Microbiome Database*

HMP: *Human Microbiome Project*

HOMD: *Human Oral Microbiome Database*

IACR: *International Association for Cancer Registries*

IBM: *International Business Machines Corporation*

ICT: Irradiación Corporal Total

LILACS: Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud

MEDLINE: *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online*

NaCl: Cloruro de sodio

NCI-CTCAE: *National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events*

NGS: *Next Generation Sequencing*

NIH: *National Institutes of Health*

USC DE COMPOSTELA

NOS: *Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale*

NRCT: *Non-Randomized Clinical Trial*

NY: Nueva York

OMAS: *Oral Mucositis Assessment Scale*

ON: Óxido nítrico

OTU: *Operational Taxonomic Unit*

PICO: *Population, Intervention, Control and Outcome*

PRISMA: *Preferred Reporting Items of Systematic reviews and Meta-Analyses*

PROSPERO: *International Prospective Register of Systematic Reviews*

QDA: Quimioterapia en Dosis Alta

SciELO: *Scientific Electronic Library Online*

SPSS: *Statistical Package for the Social Sciences*

TX: Texas

MOU: Mucositis Oral Ulcerativa

MO: Mucositis Oral

OMS: Organización Mundial de la Salud

USA: United States of America

USC: Universidade de Santiago de Compostela

WI: Wisconsin

WHO: *World Health Organization*

WHO-OTS: *World Health Organization Oral Toxicity Scale*

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN 26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 35
3. MATERIALES Y METODOLOGÍA 39
3.1 Materiales y metodología del ARTÍCULO 1: 39
3.1.1 Diseño del protocolo y registro 39
3.1.2 Fuentes de información y estrategia de búsqueda 39
3.1.3 Criterios de elegibilidad 40
3.1.4 Selección de estudios y proceso de extracción de datos 40
3.1.5 Evaluación del riesgo de sesgo 41
3.1.6 Análisis estadístico 41
3.2 Materiales y metodología del ARTÍCULO 2: 42
3.2.1 Diseño y registro del protocolo 42
3.2.2 Fuentes de información y estrategia de búsqueda 42
3.2.3 Criterios de elegibilidad 43
3.2.4 Selección de estudios y extracción de datos 43
3.2.5 Evaluación de calidad y riesgo de sesgo 44
3.2.6 Análisis estadístico 44
3.3 Materiales y metodología del ARTÍCULO 3: 45
3.3.1 Diseño, población de estudio y reclutamiento 45
3.3.2 Aspectos éticos y legales. 45
3.3.3 Toma de muestras 46

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3.4 Extracción, cuantificación y evaluación de pureza del ADN 47
3.3.5 Construcción de la librería y secuenciación del gen 16S rRNA 47
3.3.6 Microbioma y análisis estadístico 47
4. RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS 51
4.1 ARTÍCULO 1. 51
4.2 ARTÍCULO 2. 66
4.3 ARTÍCULO 3. 78
5. DISCUSIÓN 92
5.1 Prevalencia del daño agudo en la mucosa oral asociado a la terapia antineoplásica sistémica en pacientes con cáncer no irradiados. 92
5.2 Relación entre la microbiota oral y el uso de antineoplásicos sistémicos en pacientes con cáncer no irradiados. 95
5.3 Muestras orales como herramienta para un análisis metagenómico exacto. 100
6. CONCLUSIONES 110
7. REFERENCIAS 114
8. APÉNDICES: 128
8.1 AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN 128
8.2. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO APROBADO POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN 131
8.3. HOJA DE INFORMACIÓN A EL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A APROBADA POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN 135

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1

Introducción

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

La mucositis oral es un efecto secundario común en pacientes que reciben tratamientos antineoplásicos y que consiste en daño de la mucosa oral (1). Estas lesiones se caracterizan por la presencia de eritema, atrofia y/o ulceración del recubrimiento de la cavidad oral (2, 3). Los signos y síntomas asociados incluyen dolor agudo localizado en las zonas afectadas, xerostomía, disfagia, alteraciones del habla, desnutrición/ nutrición inadecuada y deshidratación (4, 5).

En el contexto del daño de la mucosa oral asociada a tratamientos oncológicos existen diversos términos que, a pesar de ser similares entre ellos e incluso ser utilizados indistintamente, cuentan con ciertos aspectos diferenciadores que deben ser aclarados. La palabra mucositis hace referencia a una condición médica caracterizada por la presencia de lesiones o daño en el tejido mucoso en cualquier punto del tracto gastrointestinal, desde la cavidad oral hasta el recto. Los inductores más frecuentes de ese tipo de toxicidad son los quimioterápicos y la radioterapia (4). Por otro lado, la mucositis oral es un diagnóstico médico que consiste en lesiones o daño específico en la mucosa de la cavidad oral. A menudo se asocia a tratamientos como la quimioterapia, radioterapia (de cabeza y cuello), quimio-radioterapia y/o trasplante de progenitores hematopoyéticos tras un régimen de acondicionamiento mielo-ablativo, que incluye irradiación corporal total (ICT). Por el contrario, la estomatitis es un trastorno caracterizado por la presencia de lesiones o daño en la mucosa oral. Su principal diferencia con la mucositis oral se debe al mecanismo desencadenante, la estomatitis se correlaciona directamente con el inicio de tratamientos o terapias moleculares dirigidas o inmunoterapia para el tratamiento del cáncer (6). Finalmente, el concepto de daño en la mucosa oral secundaria al tratamiento con antineoplásicos sistémicos incluye todas las situaciones en las cuales la mucosa oral es afectada como consecuencia de la exposición a terapias oncológicas sistémicas, excluyendo la radioterapia (dado que sus efectos secundarios son locales o loco-regionales) (7). A pesar de que la toxicidad en la mucosa oral puede prolongarse en el tiempo y llegar a hacerse crónico, en términos generales el debut de los síntomas normalmente aparece

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

3-4 días tras la primera administración del tratamiento contra el cáncer, alcanzando un pico de gravedad de afectación tras dos semanas y suele resolverse espontáneamente en aproximadamente 3 semanas tras la infusión (6, 8). Por este motivo hemos acuñado el concepto de daño agudo en la mucosa oral secundario al uso de tratamientos antineoplásicos sistémicos.

La *International Agency for Research on Cancer* estimó 18,1 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial en el año 2020 (excluyendo cáncer de piel no-melanoma, excepto el carcinoma basocelular) (9). La principal consecuencia de esta significativa incidencia es que un porcentaje elevado de estos diagnósticos requerirá un tratamiento óptimo y adecuado para cada caso específico (10), (11). Entre las opciones terapéuticas disponibles para tratar el cáncer, prescritas normalmente por médicos oncólogos, y que suelen inducir daño en la mucosa oral, principalmente podemos establecer tres grupos: los agentes quimioterápicos, las inmunoterapias y las terapias moleculares dirigidas (2, 12). Además de los mencionados, existen otros abordajes terapéuticos disponibles para los cuales otras especialidades médicas deben colaborar, éstas incluyen cirugía, radioterapia o terapia fotodinámica (13, 14, 15).

Desde la perspectiva de la oncología médica, existe una creciente tendencia mundial en el uso de regímenes sistémicos para el tratamiento del cáncer. Estudios previos han concluido que habrá un incremento relativo del uso de agentes quimioterápicos en un 53% entre el año 2018 y el 2040 (11). En cuanto a la inmunoterapia, una investigación determinó que en el año 2011 el número de pacientes elegibles para este tipo de tratamientos era del 1,54% del total de casos y que esta cifra ascendió hasta un 43,63% en el año 2018 en los EE. UU. (16). Paralelamente, las estimaciones apuntan a un incremento en el porcentaje de pacientes con cáncer candidatos a terapias moleculares dirigidas partiendo de un 5,13% en el año 2006 llegando a un 13,60% en el 2020 (17). Como consecuencia, los eventos adversos desencadenados por este tipo de tratamientos se han convertido en un foco de investigación debido a su alta incidencia (18, 19, 20). Actualmente se estima que la incidencia de mucositis oral en pacientes con tumores sólidos es del 20-40%, mientras que en pacientes sometidos a trasplantes de progenitores hematopoyéticos es del 60-85%, mientras que prácticamente el 100% de los pacientes que reciben radioterapia de cabeza y cuello la padecen (2, 21, 22, 23). Por este motivo, la gran mayoría de la investigación sobre los fundamentos bio-patológicos de la mucositis oral se ha llevado a cabo en pacientes sometidos a radiación ionizante (21, 24, 25). Sin embargo, el daño de la mucosa oral en pacientes que reciben antineoplásicos sistémicos es un fenómeno lo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suficientemente notorio y con implicaciones serias, por lo que su estudio merece ser abordado (26).

La evaluación de la mucosa oral en pacientes oncológicos es un procedimiento que requiere cierta experiencia y habilidades. Existen numerosas herramientas que permiten la graduación de la gravedad o estadiaje del daño del tejido que recubre la cavidad oral, como la Escala de Evaluación de Mucositis Oral (OMAS) (27), la Escala de Toxicidad Oral de la Organización Mundial de la Salud (WHO-OTS) o los Criterios de Terminología Común para Eventos Adversos del *National Cancer Institute* (NCI-CTCAE) (28). Esta última es considerada la más utilizada por oncólogos médicos debido a su simplicidad puesto que establece un criterio de gravedad entre 0 y 5, siendo 0 "sin hallazgos" y 5 "muerte" del sujeto (28). Además, esta escala es aplicable a otros eventos adversos y por lo tanto permite comparar o equiparar la incidencia de este evento adverso con otras toxicidades.

Hoy en día, las publicaciones sobre el manejo y las estrategias de prevención del daño en la mucosa oral en práctica clínica oncológica son controvertidas y no lo suficientemente claras en cuanto a su efectividad. Esto genera una conducta en los clínicos que se centra en paliar los síntomas. Los efectos del daño agudo en la mucosa oral no solamente afectan a la calidad de vida de los pacientes debido al dolor, incomodidad, o a las alteraciones en la ingesta y la pérdida de peso. Las lesiones del tejido oral que aparecen como consecuencia de los tratamientos para el cáncer también tienen un impacto en los servicios sanitarios por el retraso en la administración de las dosis consecutivas de antitumorales e incluso debido a la prolongación de los ingresos hospitalarios. Esto implica que este evento adverso tiene un impacto económico relevante para los servicios sanitarios (4, 25, 29).

Todo esto nos lleva a considerar relevante conocer los mecanismos biológicos que subyacen y desencadenan el daño agudo en la mucosa oral en los pacientes oncológicos con el objetivo de encontrar alternativas para su tratamiento o prevención. A pesar de los avances alcanzados hasta el momento, continúa siendo necesaria la caracterización de las interacciones en las vías de señalización molecular involucradas en este proceso (29, 30, 31). Adicionalmente, la evidencia actual apunta a un origen multifactorial (25, 32). Por un lado, la insuficiente especificidad de los tratamientos quimioterápicos convencionales, así como de la radioterapia, generan un daño irreversible tanto en células tumorales como sanas debido al daño estructural celular que induce la apoptosis. (1, 2). Además, este efecto citotóxico de los agentes antineoplásicos se debe en parte a la velocidad de replicación de las células de la mucosa. (33).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El desarrollo de esta toxicidad parece seguir un proceso de 5 estadios: iniciación, activación, amplificación, ulceración y cicatrización, tal y como ha sido descrito por Basile y colaboradores. Asimismo, la variabilidad genética interpersonal podría apoyar la existencia de diferencias en la susceptibilidad de la población a este efecto tóxico de los tratamientos contra el cáncer (2, 21, 29). A parte de esto, existe la posibilidad de que la microbiota oral juegue un papel decisivo en el desarrollo de daño agudo en la mucosa oral debido a la estrecha relación descrita entre huésped-microbioma (33).

Lederberg fue el primero en introducir el término "microbioma" para referirse al conjunto de microrganismos simbiontes, comensales y patógenos que habitan un área específica. En cambio, el concepto "microbioma oral" hace alusión a las secuencias genómicas completas de las comunidades microbianas que se encuentran en la cavidad oral (34). La flora oral está integrada por dos tipos de categorías de microbios, un grupo que constituye el microbioma central y otro conjunto de comunidades que son susceptibles de cambios, conocido como el microbioma variable, que puede estar influenciado por factores externos (35, 36, 37). Aunque la mayoría de los microrganismos que forman la microbiota oral son bacterias, los protozoos, los hongos y los virus también suponen una parte relevante de la misma (34, 38). El bacterioma oral hace referencia al conjunto de bacterias que conviven en la cavidad oral y es el componente más estudiado de los "omas" (39). Seguido por el micobioma, que es la comunidad simbiótica de hongos de la boca. Sin embargo, el viroma (virus que comparten nicho ecológico con el bacterioma y el micobioma) no ha sido objeto de estudio prioritario en estudios del microbioma oral y por lo tanto su composición y funcionamiento son todavía un enigma (40). Dentro de la propia cavidad oral existen nichos de poblaciones de microorganismos que son diferentes y varían en cada una de las zonas anatómicas de la boca (38), incluso se han encontrado comunidades de microbios bien estructuradas y organizadas específicas en cada una de ellas (41). En condiciones normales se sabe que el biofilm oral ofrece una barrera protectora, aunque una alteración del balance de sus componentes puede ocasionar efectos perjudiciales para el huésped (34, 36, 42). Numerosos estudios han descrito mecanismos de interacción entre los microorganismos y las propias células de la mucosa oral del huésped que podrían inducir alteraciones en las vías de señalización molecular y consecuentemente originar procesos patológicos (2, 23, 43, 44). También se han identificado cambios en la microbiota oral de pacientes que recibieron quimioterápicos convencionales y que desarrollaron estadios avanzados de mucositis oral entre los resultados de investigaciones previas (44). Por ejemplo,

USC DE COMPOSTELA

las bacteriocinas antimicrobionadas y los péptidos no ribosomales secretados por el género *Streptococcus* han demostrado promover la protección contra patógenos (45), e incluso el óxido nítrico (ON) producido durante la homeostasis del microbioma oral ayuda en la activación de macrófagos (46). No obstante, la mayor parte de estos estudios cuentan con limitaciones intrínsecas debido a la carencia de unificación en los protocolos ejecutados en cada proyecto individual y también a los reducidos tamaños muestrales (47).

De la necesidad de descubrir y entender esta parte de la biología humana surge el *Human Microbiome Project* (HMP) que fue fundado como una extensión del Proyecto Genoma Humano (38, 48). Consecuentemente, el *National Institute of Health* (NIH) creó el *Human Oral Microbiome Database* (HOMD) para permitir el estudio de la información de la secuencia genética de la región ARNr 16S de bacterias y arqueas cultivables y no cultivables (49). La región 16S RNA pertenece a un gen ribosomal exclusivo de bacterias que permite su clasificación filogenética (40). Los avances tecnológicos han contribuido sustancialmente al conocimiento de la microbiota humana, especialmente los que incluyen análisis metagenómico y/o metatranscriptómicos, que permiten descubrir interacciones huésped-microorganismo y relaciones entre microbios (40, 49, 50). El Desarrollo de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) centrada en el ARNr 16S facilita a los investigadores su participación e involucración en proyectos epidemiológicos, clínicos y biomédicos más precisos y sofisticados. Pese a todos estos avances, la tecnología de secuenciación de la región 16S del ARNr todavía cuenta con diversas limitaciones en cuanto a la identificación taxonómica a nivel de género, lo que implica un problema debido a la relevancia clínica de los microorganismos a nivel de especie (40, 41, 50).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2

Hipótesis y objetivos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS PRINCIPAL Y SECUNDARIOS

La hipótesis central de esta Tesis Doctoral se basa en la asunción de que las terapias sistémicas contra el cáncer influencian directamente la diversidad y composición de las comunidades microbianas que componen la flora oral. Simultáneamente, se postula que esta alteración del balance de la microbiota oral desencadena como consecuencia un daño agudo en la mucosa oral en los pacientes oncológicos no irradiados que reciben tratamientos antineoplásicos sistémicos aprobados para su comercialización.

Objetivo principal

Estudiar el daño agudo en la mucosa oral secundario al uso de tratamientos antineoplásicos sistémicos por práctica clínica en pacientes con cáncer no irradiados.

Objetivos secundarios

- Definir la prevalencia del daño agudo en la mucosa oral en pacientes que reciben tratamiento con antineoplásicos sistémicos no experimentales mediante un metaanálisis.
- Identificar asociaciones entre el uso de tratamientos sistémicos antineoplásicos con cambios en la composición del microbioma oral mediante una revisión sistemática de la literatura.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Determinar el tipo de muestra oral óptima para realizar un análisis metagenómico que permita realizar una investigación fiable sobre los cambios en la composición del microbioma oral.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3

Materiales y metodología

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

A continuación, se describen los materiales y métodos utilizados en cada uno de los artículos incluidos en esta Tesis Doctoral.

3.1 Materiales y metodología del ARTÍCULO 1:

"Meta-análisis para determinar la prevalencia del daño agudo en la mucosa oral secundario a terapia antineoplásica sistémica en pacientes con cáncer no irradiados."

3.1.1 Diseño del protocolo y registro

Esta revisión sistemática y metaanálisis ha sido llevada a cabo de acuerdo con las guías del *Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses* (51) y registrada en PROSPERO (ID: CRD42021276728). La pregunta de investigación se apoyó en el instrumento PICO (Paciente-Intervención-Comparación-Resultado) (52) de la siguiente manera: pacientes diagnosticados de cáncer con ≥18 años de edad (P = Paciente); cuya mucosa oral haya sido examinada (I = intervención); tras recibir antineoplásicos sistémicos (C = Comparación); para evaluar la prevalencia de la mucositis oral (O = Resultado).

3.1.2 Fuentes de información y estrategia de búsqueda

La búsqueda bibliográfica fue realizada en: PubMed/MEDLINE, *Web of Knowledge*, Cochrane, *Directory of Open Access Journals*, *Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud*, y SciELO desde el año 2010 hasta julio de 2022. Se realizó otra búsqueda electrónica en bases de datos de revistas específicas relacionadas con este tema.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se consensuó la definición de la estrategia de búsqueda con el objetivo de aplicarla en MEDLINE de acuerdo con el siguiente algoritmo: (stomatitis OR "oral mucositis" OR "oral ulcer" AND cancer) AND ("Antineoplastic agent" OR Chemotherapy OR "targeted therapy"

OR "Induction Chemotherapy" OR "Molecular Targeted Therapy"). La sintaxis fue adaptada específicamente para cada base de datos; sin embargo, los principales términos clave fueron "oral mucositis" y "cancer therapy". Se aplicó el filtro de especie humana en los casos en los que estaba disponible esta opción.

3.1.3 Criterios de elegibilidad

Las publicaciones fueron extraídas de bases de datos, y los estudios fueron incluidos en función de su ajuste a los siguientes criterios de inclusión: Artículos originales, estudios de cohortes, ensayos clínicos con medicamentos aprobados para su uso en práctica clínica y series de casos sin límites de idioma. Los participantes de los estudios incluidos debían tener al menos ≥18 años de edad y haber sido sometidos a una evaluación oral clínica tras la administración de antineoplásicos sistémicos. Los criterios de exclusión incluyeron: cartas al editor, resúmenes, revisiones de la literatura, revisiones sistemáticas, tesis doctorales, informes de casos, así como artículos originales *in vitro* e *in vivo*. Aquellos estudios que no utilizaron escalas de gradación/estadiaje para la evaluación del daño en la mucosa oral también fueron excluidos. Además, los ensayos clínicos con uso de fármacos experimentales u otras intervenciones que pudiesen potencialmente afectar a los resultados, los estudios en los que se incluyesen pacientes pediátricos o mujeres embarazadas, así como aquellos que involucraban a pacientes sometidos a radioterapia en monoterapia o combinada con antineoplásicos sistémicos también fueron descartados.

3.1.4 Selección de estudios y proceso de extracción de datos

Dos investigadores realizaron de forma independiente la selección de los estudios en diferentes fases, de la siguiente manera: en primer lugar, leyendo los títulos y resúmenes y posteriormente leyendo los artículos restantes al completo excluyendo aquellos que no cumpliesen criterios de elegibilidad. Un tercer investigador intervino para establecer un veredicto en caso de discrepancias sobre la elegibilidad de determinados artículos. Después, se creó una base de datos incluyendo todas las variables relevantes en cada publicación. Finalmente, se compararon resultados para asegurarse coincidencias.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La información extraída incluyó: primer autor, año de publicación, país, tamaño de la muestra, género, edad, tipo de cáncer, tipo de terapia, presencia de metástasis, exposición previa a tratamientos contra el cáncer y número de pacientes con diferentes grados de daño en la mucosa oral según la Escala de la Organización Mundial de la Salud (OMS) o la Terminología Común de los Criterios para Eventos Adversos del *National Cancer Institute* (CTCAE) (6).

3.1.5 Evaluación del riesgo de sesgo

El riesgo de sesgo fue evaluado para cada estudio por ambos investigadores, siguiendo un patrón similar al de la selección de estudios, utilizando herramientas diferentes para cada tipo específico de publicación. Para esta investigación, y dadas las características del abordaje empleado, se acordó que la mayoría de los estudios serían considerados informes de series de casos, a pesar de que ése no fuese su diseño. Así, la herramienta utilizada para la evaluación del riesgo de sesgo fue la *Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist* para series de casos (53). Aquellas series de casos que no reunieron al menos 3 ítems fueron excluidas. Para los ensayos clínicos no aleatorizados se utilizó la herramienta *Risk of Bias in Non-Randomized Studies – of Interventions* (53, 54). Además, en los casos de ensayos clínicos aleatorizados se empleó la *Cochrane Risk of Bias 2.0 tool* (53, 55).

3.1.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un metaanálisis de proporciones utilizando el software STATA en su versión 17 (StataCorp, LLC, College Station, TX, USA). Se estimaron proporciones agrupadas utilizando el método modelo de efectos aleatorios (DerSimonian y Laird) con las siguientes variables: tipo de tumor, tipo de estudio y continente. Para el análisis de la heterogeneidad entre los estudios, se usó la prueba estadística Q y la I^2 así como un diagrama de embudo para el sesgo de publicación. Un p valor < 0,10 y un I^2 >50% indican que existe heterogeneidad entre los estudios, lo que indica la necesidad de usar el modelo de efectos aleatorios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 Materiales y metodología del ARTÍCULO 2:

"Revisión sistemática sobre la relación entre el microbioma oral y el uso de tratamientos antineoplásicos sistémicos en pacientes con cáncer no irradiados."

3.2.1 Diseño y registro del protocolo

Este protocolo fue diseñado siguiendo las guías *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) (51) y posteriormente registrado en PROSPERO (ID: CRD42021236167). Con el fin de establecer una pregunta de investigación bien definida, se utilizó el método Paciente-Intervención-Comparación-Resultado (PICO) (52) de la siguiente manera: pacientes diagnosticados de cáncer que reciben o sean candidatos a recibir tratamiento con antineoplásicos sistémicos (*P*=Pacientes); cualquier determinación de microbioma oral (I = intervención); antes y después de la administración de antineoplásicos sistémicos y en sujetos sanos que hagan de controles cuando sea posible (C=Comparación); cambios en las abundancias relativas de los microorganismos de la flora oral o en la composición del microbioma oral (O= Resultado).

3.2.2 Fuentes de información y estrategia de búsqueda

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica en varios repositorios científicos electrónicos: PubMed/MEDLINE, Web of Knowledge, Cochrane, Directory of Open Access Journals (DOAJ), *Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud* (LILACS) y SciELO desde el origen hasta agosto de 2021. Además, también se realizó una búsqueda electrónica manual en las páginas web de revistas científicas relacionadas con el campo de investigación. Los artículos científicos potencialmente relevantes, con los cuales cualquiera de los autores estaba familiarizado o conocía, también fueron examinados exhaustivamente.

La estrategia de búsqueda acordada por los investigadores se definió con el siguiente algoritmo para ser implementado en MEDLINE: ("oral microbiome" OR "oral microbiota" OR "oral biofilm" OR "oral flora" OR "oral microflora") AND ("Antineoplastic agent" OR Chemotherapy OR Immunotherapy OR "targeted therapy" OR "Induction Chemotherapy" OR "Molecular Targeted Therapy") AND (stomatitis OR "oral mucositis" OR "oral ulcer"). Sumado a esta fórmula, se aplicó también el filtro "human". La sintaxis fue específicamente adaptada

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

para la búsqueda en otras bases de datos, siendo los principales términos clave “oral microbiome” y “cancer therapy”.

3.2.3 Criterios de elegibilidad

Todas las referencias identificadas en bases de datos informatizadas fueron extraídas manualmente y los estudios fueron considerados en los casos en los que se cumplían los siguientes criterios inclusión: Artículos originales, informes de casos, series de casos sin límites de idioma. Se consideraron estudios longitudinales en sujetos ≥18 años que analizasen muestras orales obtenidas al menos antes y después de la administración de tratamiento con antineoplásicos sistémicos. Para que los estudios pudiesen ser incluidos debían utilizar métodos de secuenciación para identificar los microorganismos. Los criterios de exclusión incluyeron: artículos con ciertas características técnicas como el uso de otros métodos alternativos a la secuenciación genética para la identificación de microorganismos, la inclusión de pacientes pediátricos en sus estudios o de pacientes que recibiesen radioterapia. Otros aspectos bibliográficos que llevaron a descartar ciertos artículos: cartas al editor, resúmenes de congresos, revisiones de literatura, revisiones sistemáticas, tesis doctorales y estudios originales *in vitro* e *in vivo*.

3.2.4 Selección de estudios y extracción de datos

Dos investigadores realizaron de forma independiente la selección de los estudios mediante la lectura de los títulos y se excluyeron aquellos que no se centraban en el tema detallado anteriormente. En segundo lugar, se evaluaron los resúmenes de los artículos recuperados y se seleccionaron aquellos que cumplían los criterios de elegibilidad. Posteriormente, ambos investigadores procedieron a la lectura completa de los artículos restantes descartando los que no fueron seleccionados. En caso de discrepancias, un tercer investigador actuó de mediador para concluir si los artículos cumplían elegibilidad. El proceso de extracción de datos se llevó a cabo, creando una base de datos con todas las variables disponibles en cada artículo y que eran relevantes para el estudio. Finalmente, los dos investigadores compararon sus resultados para asegurarse de que coincidían.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La siguiente información fue extraída de cada estudio seleccionado siempre y cuando estuviese disponible: primer autor, año de publicación, características sociodemográficas de los sujetos (número de sujetos, edad, género, hábito tabáquico), parámetros clínicos (uso de antiácidos, inhaladores, exámenes relacionados con la salud oral, tipo de cáncer diagnosticado), tratamientos (tipo de agente quimioterápico, dosis, uso de antibiótico y tipo, uso de antifúngico y tipo), muestras obtenidas (tipo de muestra, método de obtención, región secuenciada), variables relacionadas con el microbioma (información relativa a cualquier aspecto sobre abundancia relativa bacteriana, diversidad alfa o beta fúngica o bacteriana, cambios bacterianos o fúngicos asociados con otros factores de riesgo e interacciones entre microrganismos) y evaluaciones del daño en la mucosa oral (desarrollo de mucositis oral y candidiasis oral, plazo temporal de la máxima afectación de la mucosa oral y puntuaciones de la escala de evaluación oral de la Organización Mundial de la Salud (56)).

3.2.5 Evaluación de calidad y riesgo de sesgo

Dos investigadores llevaron a cabo la evaluación de la calidad mediante el análisis del riesgo de sesgo. Los cinco artículos analizados fueron clasificados como estudios de cohortes a pesar de que la mayoría no contaban con un grupo control (57). Por lo tanto, se utilizó la *Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale* (NOS) para estudios de cohortes (58) con el objetivo de obtener las puntuaciones de calidad. Se estableció un método de puntuación para evaluar la calidad donde: una puntuación total de ≥ 7 estrellas, suponía una calidad alta, si la puntuación era de entre 4 – 6 estrellas, implicaba calidad media mientras que la obtención de una puntuación inferior a 4 estrellas indicaba baja calidad.

3.2.6 Análisis estadístico

Las medias de los valores fueron calculadas utilizando el software SPSS (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM CorpArmonk, NY: IBM Corp) en los casos pertinentes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.3 Materiales y metodología del ARTÍCULO 3:

"Un estudio piloto para determinar la mejor muestra oral como herramienta para un análisis metagenómico exacto."

3.3.1 Diseño, población de estudio y reclutamiento

Este estudio fue concebido como un estudio piloto observacional, transversal y descriptivo. Cada participante fue reclutado en la Clínica de la Facultad de Odontología por un odontólogo. Se ofreció participar voluntariamente a todos los sujetos, y aquellos que cumplieron criterios de elegibilidad fueron incluidos. Los criterios de inclusión fueron los siguientes: sujetos sanos que no hubiesen sido diagnosticados ni padeciesen enfermedades sistémicas y que tampoco recibiesen tratamientos que modifiquen el sistema inmunitario (59). Todos ellos tenían al menos 18 años de edad y eran capaces de entender y consentir su participación en el estudio. Por otro lado, los sujetos no podían participar si estaban recibiendo tratamientos anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios, habían tenido reacciones alérgica previas a anestésicos locales, no eran capaces de comprender las implicaciones del estudio, no deseaban participar o no eran capaces de dar su consentimiento por escrito. Además, los sujetos tampoco podían participar si llevaban a cabo enjuague bucal o cepillado de dientes en las 12 horas previas a la recogida de las muestras. También se excluyeron a participantes con una disminución total de la salivación.

Los datos de los participantes fueron recogidos y registrados en una base de datos codificada para evitar su identificación y asegurar la privacidad. También se recogieron tres muestras de cada participante siguiendo un orden estricto para minimizar en la medida de lo posible las interferencias en las muestras: En primer lugar, la muestra de saliva completa no estimulada, en segundo lugar, el enjuague oral y por último una biopsia de mucosa oral. Con el fin de reducir riesgos innecesarios de las técnicas invasivas como la extracción de una biopsia de mucosa oral. Se seleccionaron pacientes sanos con necesidad de extracción de un tercer molar por causas no infecciosas.

3.3.2 Aspectos éticos y legales.

Este proyecto de investigación emplea muestras humanas de enjuague oral, saliva y tejido de personas sanas y se recogen datos clínicos personales de los mismos. Por este motivo, el proyecto se ha llevado a cabo bajo las regulaciones establecidas en ICH Código de Buenas Prácticas Clínicas, la Directiva 2001/20/EC y el Reglamento (UE) 2016/679. El manejo de las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muestras biológicas de este estudio se ha realizado en concordancia con la legislación española en la Ley 14/2007 (3 de julio), el RD 1301/2006 (10 de noviembre) y el RD 1716/2011 (18 de noviembre). Además, el desarrollo de esta investigación clínica ha sido implementado en siguiendo los principios establecidos por la Declaración de Helsinki y sus posteriores enmiendas y La Convención sobre Derechos Humanos y Biomedicina del Consejo Europeo y sus Protocolos adicionales.

En base a lo anterior, previo a su inclusión en el estudio, todos los participantes recibieron la información necesaria sobre el estudio así como las posibles implicaciones. Todos ellos dispusieron de tiempo para pensar y meditar la decisión de participar y firmaron un consentimiento informado mediante el cual confirmaban que entendían y aceptaban su participación voluntaria en el estudio. El proceso de recogida de datos clínicos o de salud de los participantes y la toma de muestras comenzó en todos los casos tras la obtención de dicho consentimiento informado. La aprobación del estudio por parte del Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (CEICG) (Ref. No. 2020/552) se adjunta en esta tesis como Apéndice I. El formulario de consentimiento informado en su versión aprobada por el CEICG se adjunta como Apéndice II y la Hoja de Información al participante como Apéndice III de este manuscrito .

3.3.3 Toma de muestras

Cada sujeto aceptó proporcionar tres muestras biológicas diferentes para el estudio. La primera muestra en ser recogida fue la saliva completa no estimulada pidiendo a los pacientes la inclinación de sus cabezas hacia adelante permitiendo que la saliva fluyese hacia un tubo Eppendorf vacío estéril hasta alcanzar un volumen de 5mL. Después, se les pidió a los participantes que enjuagasen su boca con 5mL de suero salino (NaCl) al 0,9% durante 1 minuto (60), asegurándose de que la solución alcanzaba todas las partes de la cavidad oral y finalmente esputar el enjuague en un tubo estéril vacío sin medio de cultivo. Finalmente, se extrajo asépticamente una biopsia de la mucosa oral por un odontólogo que infiltró la zona de elección de la cavidad oral con anestesia, se extrajo una muestra de tejido de 5x5mm con un bisturí y la incisión resultante fue suturada con seda para detener la hemorragia y prevenir infecciones futuras. El fragmento seleccionado correspondió a tejido gingival adyacente al tercer molar. Estas muestras de tejido fueron recogidas en un tubo estéril con Suero salino al 0,9% para evitar la deshidratación de la muestra. Todas las muestras fueron almacenadas congeladas a -80ºC

desde el momento de su recogida, hasta que todas las muestras se recogieron para finalmente realizar el procesado simultáneo de todas ellas.

3.3.4 Extracción, cuantificación y evaluación de pureza del ADN

El aislamiento del ADN de todas las muestras fue realizado utilizando el Kit de Autentificación Maxwell® RSC PureFood GMO (Cat.# AS1600, Promega Corporation, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de ADN se midieron utilizando QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) en un fluorómetro Quantus® (Promega Corporation). Además, se evaluó la Pureza de siguiendo instrucciones previas (61). Las muestras de ADN se congelaron a -20°C hasta los siguientes procesados.

3.3.5 Construcción de la librería y secuenciación del gen 16S rRNA

Se generó una librería a través de la amplificación de la región V3 - V4 del gen 16S del ARN ribosomal usando cebadores de Integrated DNA Technologies, Inc. flanqueados por adaptadores sobresalientes Illumina. La secuenciación de realizó en un secuenciador Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) usando MiSeq v3 reagent kit (61) en el Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS).

Los datos en bruto de la secuenciación en Illumina están disponibles en la base de datos BioStudies (https://www.ebi.ac.uk/biostudies/) con número de acceso S-BSST1150.

3.3.6 Microbioma y análisis estadístico

Los datos generados de la secuenciación en el secuenciador Illumina MiSeq fue analizada siguiendo la metodología descrita en la bibliografía (61, 62) utilizando los siguientes softwares: BaseSpace Sequence Hub versión 7.11.0; Python versión 3.8.13; QIIME 2 versión 2022.2.0; q2cli versión 2022.2.0; FastQC v0.11.9; fastp 0.23.2; cutadapt 3.7 y multiqc versión 1.12.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4

Resultados: trabajos publicados

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. RESULTADOS: TRABAJOS PUBLICADOS O ACEPTADOS

4.1 ARTÍCULO 1. Rodríguez-Fuentes ME, Pérez-Sayáns M, Carreras-Presas CM, Marichalar-Mendia X, Bagán-Debón L, López-López R. Prevalence of acute oral mucosal damage secondary to the use of systemic antineoplastics: A systematic review and meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2023;135(3):385-395. doi:10.1016/j.oooo.2022.11.016

Revista: Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology.

Factor de impacto (JCR 2023): 2.0

Cuartil: Q2

Categoría: Dentistry, Oral Surgery & Medicine

Posición: 61/157

Tipo de licencia: Copyright: © 2022 Autor(es). Publicado por Elsevier Inc.. Este es un artículo "*open-access*" o de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la "*Creative Commons CC-BY License*" (http://creativecommons.org/ licenses/by/4.0/), la cual permite uso no restringido, distribución y reproducción en cualquier medio,

siempre y cuando el trabajo original sea adecuadamente citado. No es necesario solicitar permiso para reutilizar este artículo.

Contribuciones de los autores:

- Manuel Eros Rodríguez Fuentes: formulación de la hipótesis, diseño del proyecto y establecimiento del cuadro teórico, revisión bibliográfica, extracción de datos y creación base de datos, análisis de datos e interpretación de resultados, redacción y formato del manuscrito, envío a la revista.
- Mario Pérez-Sayáns: soporte en el diseño del proyecto y establecimiento del cuadro teórico, soporte en la revisión bibliográfica y extracción de datos, soporte en la ejecución de la investigación y revisión de manuscrito.
- Xabier Marichalar Mendia: revisión de discrepancias en la extracción de datos, análisis estadístico.
- Carmen Martín Carreras-Presas: establecimiento del cuadro teórico y revisión de manuscrito.
- Leticia Bagán Debón: establecimiento del cuadro teórico y revisión de manuscrito.
- Rafael López López: formulación de la hipótesis, revisión crítica del artículo, soporte en la ejecución de la investigación y revisión de manuscrito.

Enlace al artículo:

https://doi.org/10.1016/j.oooo.2022.11.016

Vol. 135 No. 3 March 2023

Prevalence of acute oral mucosal damage secondary to the use of systemic antineoplastics: A systematic review and meta-analysis

Manuel Eros Rodríguez-Fuentes, BNS, MSc,[a,b] Mario Pérez-Sayáns, DDS, PhD,[a,b] Carmen Martín Carreras-Presas, DDS, PhD,[c] Xabier Marichalar-Mendia, BSc, PhD,[d,e] Leticia Bagán-Debón, DDS, PhD,[f] and Rafael López-López, MD, PhD[a,g]

Objective. The aim of this study was to determine the prevalence of acute oral mucosal toxicities in non-irradiated patients treated with systemic antineoplastics agents. The secondary objective was to find out differences in its prevalence among the different types of systemic antineoplastics.

Study design. A systematic review and meta-analysis was performed. Articles from 2010 to July 2022 were retrieved and included if patients were adults undergoing oral assessment after administration of commercially available systemic antineoplastics. Data was extracted and pooled proportions were estimated using random-effect model method (Der Simonian and Lair).

Results. Eighty-two articles were included in the study. The overall prevalence of acute oral mucosal damage across studies was 38.2% (95% CI: 33.1%-43.3%). The prevalence was 42.9% (95% CI: 32.8%-53%) in patients treated with chemotherapy alone, 38% (95% CI: 29.1%-47%) in patients treated with a combination of chemotherapy and targeted therapies, and 32.1% (95% CI: 26.8%-37.5%) in targeted therapies alone-treated patients. No statistically significant differences were found in the prevalence of oral mucosal toxicities between the different types of systemic antineoplastic treatments.

Conclusions. Oral mucosal toxicity is a major side effect in non-irradiated cancer patients undergoing systemic antineoplastics. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2023;135:385−395)

Oral mucosal damage (OMD) is one of the most frequently reported adverse events in cancer therapy. It is described as oral coating injury, characterized by the presence of inflammation, erythema, atrophy, and/or ulceration that may develop acutely or be long-lasting in certain cases.[1-3] The pathophysiology of acute oral mucosal damage in patients with cancer has not been completely unveiled yet, which precludes the development of effective treatments or prophylactic measures and limits the clinical approach to symptomatic or palliative care.[4] Patients who have these side effects often experience symptoms that may include xerostomia or localized acute pain that directly affect their quality of life up until recovery or death.[5,6] Occasionally, it might prompt more significant consequences, such as dehydration and malnutrition.[7,8] Multiple clinical research articles have been published showing controversial results on the best clinical practice in oral mucositis. Antimicrobials, analgesia, anesthesia, or laser are some of the treatments that have been described so far.[8,9]

The prevalence of acute oral mucositis varies according to the oncological treatment. Radiation therapy leads the ranking, causing oral mucositis to nearly every head and neck cancer patient receiving it. The incidence is slightly lower (60%-80%) in patients with hematologic malignancies that undergo hematopoietic cell transplantation, whereas cases in patients treated with chemotherapy account for 20% to 40% of the total.[3]

From a medical oncology perspective, it is interesting to analyze the incidence of oral mucosal lesions caused by prescribed treatments. Over the last years, the management of patients with cancer has changed considerably, and the use of target drugs has increased

Statement of Clinical Relevance

The prevalence of acute oral mucosal damage in non-irradiated patients treated with commercially available systemic antineoplastics is 38.2%. There is no significant difference according to the type of systemic antineoplastic regime administered.

Drs Manuel Eros Rodríguez-Fuentes and Mario Pérez-Sayáns have contributed equally to the work.

[a]Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit (MedOralRes), Faculty of Medicine and Dentistry, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

[b]Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

[c]Oral Medicine Unit, Faculty of Dentistry, European University of Madrid, Madrid, Spain.

[d]Department of Nursing I, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Spain.

[e]Biocruces Bizkaia Health Research Institute, Barakaldo, Spain.

[f]Department of Stomatology, Faculty of Medicine and Dentistry-INCLIVA, Valencia, Spain.

[g]Medical Oncology Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.

Corresponding author: Mario Pérez Sayáns E-mail addresses: manueleros.rodriguez@rai.usc.es Mario.perez@usc.es rafael.lopez@usc.es

Received for publication Aug 10, 2022; returned for revision Nov 22, 2022; accepted for publication Nov 29, 2022.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

2212-4403/$-see front matter
https://doi.org/10.1016/j.oooo.2022.11.016

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MANUEL EROS RODRÍGUEZ FUENTES

remarkably, despite the significance of traditional chemotherapeutic agents.[10]

The main objective of this study was to determine the frequency of acute oral mucosal damage development in non-irradiated cancer patients because it is a major side effect in oncology treatment. In addition, we also aimed to elucidate differences in the prevalence of this phenomenon in patients with cancer according to the type of systemic antineoplastic regime.

MATERIAL AND METHODS

Protocol design and registration

This systematic review and meta-analysis were conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses guidelines[11] and registered on PROSPERO (ID: CRD42021276728). The research question adhered to the Patient-Intervention-Comparison-Outcome (PICO) asset[12] and was as follows: ≥18-year-old patients diagnosed with cancer (P = Patient); whose oral mucosa was examined (I = intervention); after receiving systemic antineoplastics (C = Comparison); to assess the prevalence of oral mucositis (O = outcome).

Sources of information and search strategy

The bibliographic search was carried out in: PubMed/MEDLINE, Web of Knowledge, Cochrane, Directory of Open Access Journals, Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud, and SciELO from 2010 to July 2022. A further electronic search was performed on databases of specific journals related to this topic.

The agreed search strategy was defined by the following algorithm with the aim of being applied in MEDLINE: (stomatitis OR "oral mucositis" OR "oral ulcer" AND cancer) AND ("Antineoplastic agent" OR Chemotherapy OR "targeted therapy" OR "Induction Chemotherapy" OR "Molecular Targeted Therapy"). The syntax was adapted specifically for each database; however, “oral mucositis” and “cancer therapy” were the main keywords. The human species filter was applied when available.

Eligibility criteria

The literature was retrieved from the databases, and the studies were included if they met the following inclusion criteria: original articles, cohort studies, clinical trials using approved drugs and case series, and with no language limitations. Participants in the included studies had to be ≥18 years of age and have undergone oral assessment after administration of systemic antineoplastics. The exclusion criteria included the following: letters, abstracts, literature reviews, systematic reviews, doctoral thesis, case reports, and original in vitro and in vivo articles. Studies that did not use grading scales for oral mucosa damage assessment were also excluded. Moreover, clinical trials using experimental drugs or other interventions that may potentially influence results, studies that included pediatric patients or pregnant women, as well as those involving patients who undergo/underwent radiotherapy alone or in combination with systemic antineoplastics were discarded.

Study selection and data extraction process

Two researchers (M.P.S. and M.E.R.F.) independently performed the selection of the studies in different phases, as follows: (1) reading the titles and abstracts and (2) fully reading the remaining articles and excluding those that did not meet eligibility. A third researcher (X.M.M.) intervened to deliver a verdict when discrepancies occurred about eligibility of specific articles. Later, a database was created including all the relevant available variables on each paper. Finally, the results were compared to ensure they matched.

The information extracted included first author, year of publication, country, sample size, sex, age, type of cancer, type of therapy, metastases, previous exposure to anticancer therapies, and number of patients with different grades of oral mucosal damage based on World Health Organization(WHO) Scores or National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE).[1]

Evaluation of risk of bias

The risk of bias was assessed for each study by both researchers, following a similar pattern to study selection, using different tools for each specific paper type. For this research, and given our approach to it, it was agreed that most of the studies would be considered case series reports, although their initial design might have not been. Thus, the Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist for Case Series was the chosen tool for risk of bias assessment.[13] Those cases that did not meet ≥3 items were excluded. The Risk of Bias in Non-Randomized Studies − of Interventions tool[13,14] was chosen for risk of bias assessment in non-randomized clinical trials (NRCT). Moreover, in the case of randomized clinical trials, the Cochrane Risk of Bias 2.0 tool for Randomized Clinical Trials[13,15] was applied.

Statistical analysis

A proportion meta-analysis was conducted using STATA version 17 (StataCorp, LLC, College Station, TX, USA). Pooled proportions were estimated using random-effect model method (Der Simonian and Lair) with the following variables: type of tumor, study type, and continent. To analyze the heterogeneity among the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

studies, the Q statistical test and the I^2 were used as well as funnel plots for the publication bias. A P value of < .10 and I^2 of >50% indicated that there was heterogeneity between the studies, meaning that a random-effects model would be used.

RESULTS

Study selection

The initial search generated 503 references. We excluded 421 at different stages of the process, as shown in Figure 1, which left us with 82 articles suitable for inclusion.

Risk of bias assessment

Each type of article that met eligibility criteria was thoroughly evaluated (N = 82). Three out of 79 case series obtained an overall appraisal of "excluded,"[16-18] whereas the remaining 76 received an "included" rating[19-94] (Supplemental Table S1; available at [URL/link*]). One NRCT was classified as low risk of bias[95]

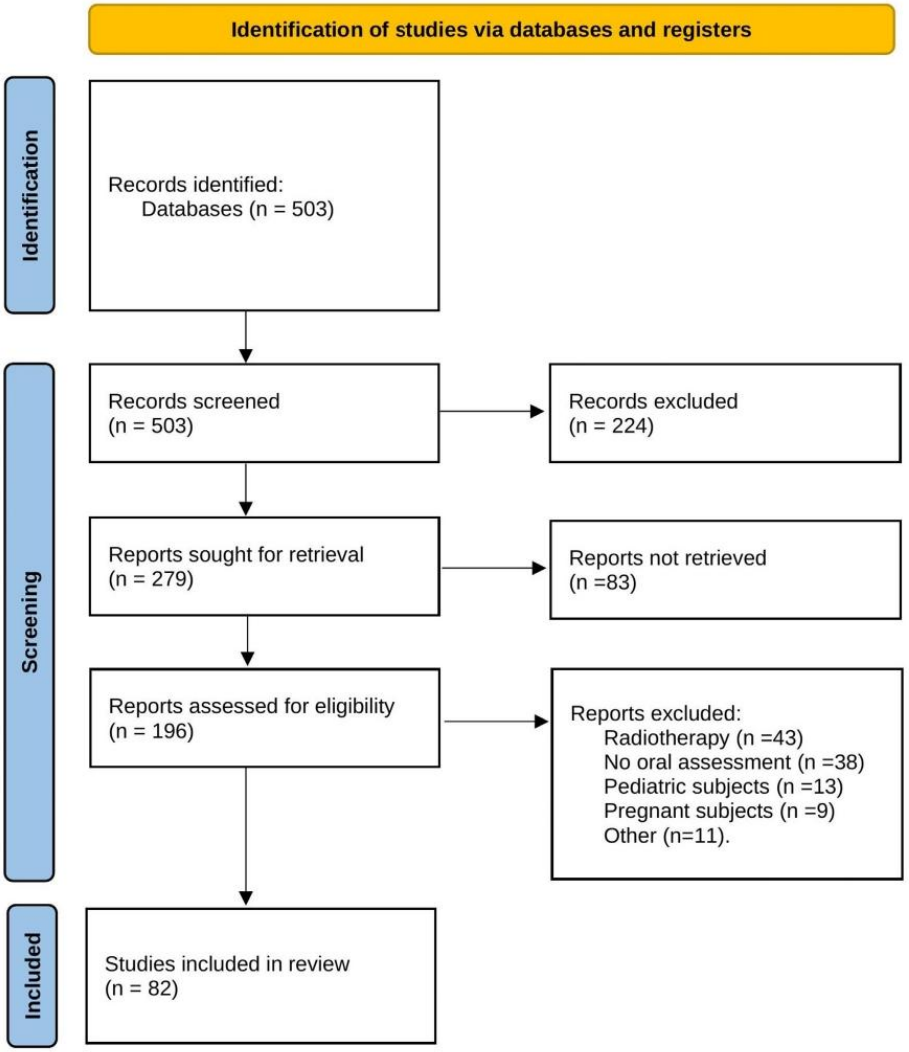


Fig. 1. Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses flow diagram. From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021;372:n71.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table I. Main characteristics of the included literature

Study-related features (N = 82)			
Type of article		*Total*	*%*
	Case series	79	96.3
	NRCT	2	2.5
	RCT	1	1.2
Oral assessment tool	CTCAE	58	71.6
	WHO scale	14	17.3
	Unknown	9	11.1
Type of cancer	Haematologic	17	20.7
	Kidney	15	18.3
	Digestive system	15	18.3
	Breast	10	12.2
	Lung	10	12.2
	Lymphoma	5	6.1
	Various	5	6.1
	Neuroendocrine	3	3.7
	Ovarian	2	2.4
Geographical location	Asia	39	47.6
	Europe	27	32.9
	North America	10	12.2
	Australia	5	6.1
	South America	1	1.3

Participant-related features	*Mean*	*Range*	*SD*	*Total*
Patients	123	(9-1790)	227	10104*
Male†	53	(0-609)	82	4064†
Female†	82	(0-1790)	208.6	5465†
Mean age	58	(29-75)	8.5	-
CT patients	156	(9-1790)	32.2	5678
TT patients	98	(12-404)	92.7	3184
Combined therapy patients	73	(10-353)	8.5	1165
Oral mucosal damage	46	(1-701)	89.2	3668

CT, chemotherapy; *TT*, targeted therapy; *RCT*, randomized clinical trial; *NRCT*, non-randomized clinical trial; *CTCAE*, common terminology criteria for adverse events; *WHO*, World Health Organization.
*No. of patients differs from meta-analysis due to 3 patients' loss.
†Data was not available for every article.

and 1 as moderate risk of bias[96] (Supplemental Table S2; available at [URL/link*]). One RCT was rated as overall low risk of bias[97] (Supplemental Table S3; available at [URL/link*]).

Main characteristics of the studies and their samples

To maximize the information available and to allow data analysis in those scientific papers that passed the bias assessment, it was agreed that it would be appropriate to split 3 of them in 2[19-21]. Subsequently, they were considered as independent articles, so we can state that a total of 82 have been included in our analysis.

Table I details that case series were the predominant type of article (96.3%), followed by NRCT (2.5%) and RCT (1.2%). Among the oral mucosa assessment tools, the CTCAE was the most frequently used in 71.6% of the articles, on any of its available versions (including the primary and its updates: 2.0, 3.0, 4.0, and 5.0). In 17.3% of the papers, authors chose the World Health Organization Oral Toxic Scale, whereas in 11.1% of the articles it was not specified. The most recurrent type of primary cancer among the studies was hematologic (20.7%), followed by kidney (18.3%), digestive system (18.3%), breast (12.2%), and lung (12.2%). In terms of location, 47.6% of the studies were carried out in Asia, 32.9% in Europe, and 12.2% in North America.

The sample size obtained from the 82 studies was 10104 patients (Table I). The mean number of patients in each one was 123 ± 227, with 9 being the smallest group of participants and 1790 the largest. Of these, ≥4064 were male and ≥5465 female. The included population had a mean age of 58 ± 8.5 years, and across the articles it ranged from 29 to 75. Patients treated with traditional chemotherapy drugs integrated the largest group with 5678 patients, those receiving targeted therapies alone summed 3184, whereas only 1165 patients were prescribed a combination of chemotherapy and targeted therapies. Overall, 3668 cases of oral mucosal toxicities were reported and at least 3447 cases of metastases were reported. Further information about all the included articles is displayed on Supplemental Table S4 (available at [URL/link*]).

Meta-analysis

The prevalence of acute oral mucosal damage was 38.2% (95% CI: 33.1%-43.3%) across all studies. Despite finding relevant heterogeneity (I^2 = 97.7%; P < .001; Figure 2), no publication risk of bias was identified using a funnel plot (P = .215; Figure 3).

Subgroup analysis was accomplished for type of therapy, cancer type, study design, and geographic location of studies (Table II).

Chemotherapy alone had the highest prevalence of oral mucosal damage prevalence at 42.9% (95% CI: 32.8%-53%), followed by the combination of conventional chemotherapy and targeted therapies at 38% (95% CI: 29.1%-47%), and the lowest prevalence showed on the targeted therapies at 32.1% (95% CI: 26.8%-37.5%). However, heterogeneity was very high overall (I^2 = 97.8%; P = .00; Figure 4), no statistically significant differences were found among them (P = .15).

Regarding the type of cancer, articles including patients suffering various types of cancer presented the higher prevalence of oral mucosal toxicities with 62.3% (95% CI: 33.1%-91.4%), followed by hematologic with 47.5% (95% CI: 32.4%-62.6%), lymphoma with 38.3% (95% CI: 8%-68.6%), ovarian with 39.1% (95% CI: 36.8%-41.3%), kidney with 33.6% (95% CI:

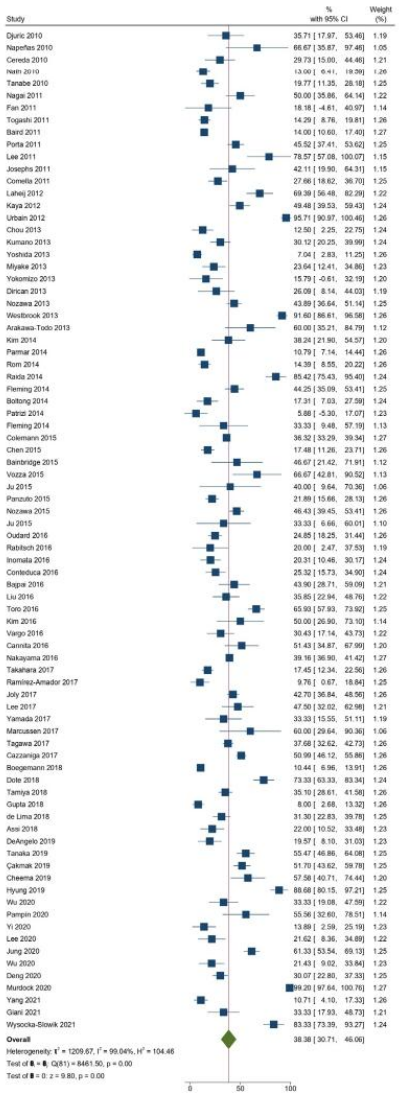


Fig. 2. Forest plot for the prevalence of acute oral mucosal damage.

26.7%-40.5%), and breast with 33.1% (95% CI: 22.8%-43.4%). Among them no significant differences were noted (P = .19). The heterogeneity was $I^2 > 50\%$ to all groups except for ovarian cancer ($I^2 = 0\%$), which was overall significant (P = .00; Figure 5).

According to study design, the prevalence was very similar; 38.2% (95% CI: 33%-43.4%) in observational studies and 39.4% (95% CI: 10.1%-68.8%) in experimental studies without statistically significant differences (P = .93). Both groups showed high heterogeneity (I^2 = 97.7%; P = .00; Figure 6).

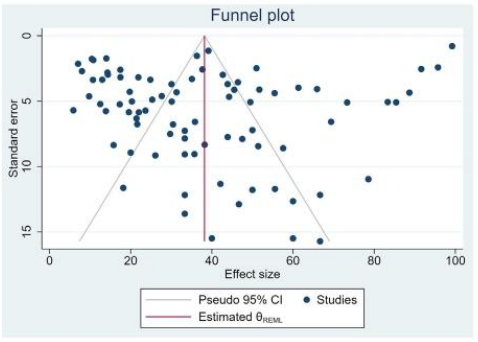


Fig. 3. Funnel plot test for publication bias. The *y*-axis represents the standard error, the *x*-axis displays the effect size (P = .215).

With regards to the locations where the studies had been carried out, the highest prevalence of oral mucosal appeared in studies developed in North America 48.6% (95% CI: 28.1%-69%), the second location was Europe with 42% (95% CI: 32.7%-51.2%), and the third location was Asia with 34.1% (95% CI: 27.8%-40.3%). Oral mucosal prevalence was not statistically different among the locations (P = .24). Similarly to what has been observed for all previous parameters, heterogeneity was significantly elevated (I^2 = 97.7%; P = .00; Supplemental Figure S1; available at [URL/link*]).

Supplemental Figure S2 (available at [URL/link*]) shows how each new study has chronologically contributed to the estimate of the prevalence of oral mucosal damage in patients receiving systemic antineoplastics since year 2010.

Meta-regression

We ran meta-regressions to investigate possible sources of heterogeneity in our covariates. No differences were found in the prevalence of oral mucosal toxicities according to the study design and the type of therapy (P = .663) or cancer type and type of therapy (P = .340). Similar results were found when considering location and year of publication (P = .569; location and type of therapy (P = .523); location and cancer type (P = .424); and study design, location, cancer type, type of therapy, and year of publication (P = .660).

DISCUSSION

Oral mucositis is a side effect of systemic antineoplastics with a noteworthy prevalence in cancer patients.[1] This statement is consistent with our finding that

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table II. Subgroup analysis of the variables

Parameter	*Category*	*Studies, n*	*% CI*	*Heterogeneity I^2*	*Heterogeneity P value*	*Subgroup analysis P value*
Cancer type	**Breast**	10	33.09 (22.78-43.4)	92.32	< .001	.19
	Digestive	16	33.17 (23.82-42.53)	94.11	< .001	
	Hematologic	17	47.5 (32.4-62.61)	98.76	< .001	
	Kidney	15	33.63 (26.73-40.54)	89.8	< .001	
	Lung	10	31.3 (19.07-43.53)	95.2	< .001	
	Lymphoma	5	38.25 (7.95-68.56)	97.02	< .001	
	Neuroendocrine	3	29.96 (17.03-42.9)	59.1	.087	
	Ovarian	2	39.07 (36.83-41.31)	0	.524	
	Various	4	62.27 (33.13-91.41)	98.45	< .001	
Type of study	**Observational**	79	38.15 (32.95-43.35)	97.8	< .001	.93
	Experimental	3	39.4 (10.1-68.8)	95.84	< .001	
Type of therapy	**Chemotherapy**	32	42.92 (32.8-53.01)	99.12	< .001	.15
	Combined	34	38.03 (29.05-47.01)	87.6	< .001	
	Targeted therapy	16	32.14 (26.77-37.52)	91.94	< .001	
Location	**Australia**	5	28.65 (14.91-42.39)	85.49	< .001	.24
	Asia	39	41.98 (32.73-51.24)	97.32	< .001	
	Europe	27	31.3 (22.83-39.78)	-		
	North America	10	48.58 (28.13-69.04)	99.45	< .001	
	South America	1	34.08 (27.79-40.34)	95.82	< .001	

estimates the prevalence of acute oral mucosal damage to be 38.2% in non-irradiated patients treated with systemic antineoplastics. Despite all the scientific discoveries on cancer pathophysiology, as well as in research and development of new therapeutic strategies in recent years, which seem to be more specific for each type of cancer, side effects are common.[98] Therefore, knowing prevalence data could encourage further research focus into the biological basis that triggers oral mucosal damage, which could lead to the discovery of possible therapeutic targets. Hence, our results suggest that differences in oral mucosal damage prevalence in conventional chemotherapy, targeted therapies, or a combination of both are not significant. The clinical implication of this finding supports the need to approach all cancer patients equally, regardless of the therapy of choice, promoting the multidisciplinary team to collaborate on the patient's behalf. This means that medical oncologists should be supported by other professionals such as odontologists, maxillofacial surgeons, dermatologists, palliative care providers, and nurses, aiming for preventive or curative treatments.

Non-randomized clinical trials, large cohort studies, or case-control studies have traditionally been considered optimal to determine the incidence or prevalence of adverse events in pharmacovigilance.[99] The nature of the present study to assess the prevalence of oral mucosal damage considering only commercially available systemic antineoplastics was decisive when designing how to tackle our topic and led us to perform a systematic review of the available data to achieve representative measures, and research has proven its reliability.[100] Moreover, we decided to establish a timeframe for inclusion that starts in 2010, coinciding with the development of new monoclonal antibodies directed toward tumor antigens or T-cell receptors and the growth of other targeted therapies use worldwide.[101]

Throughout our research, we encountered several challenges. For example, the method of assessment of oral mucosa involvement was not homogeneous in all articles because some used the WHO scale, whereas others used the CTCAE in its consecutive versions, and, in some cases, the tool used was not even reported. This discrepancy has been remedied by taking into account only reported cases of oral mucosal injuries in general, which means scoring >0 for the WHO scale or ≥1 for the CTCAE. Conversely, many of the articles only reported those cases in which the involvement was ≥3, or ≥2, thus ignoring mild cases of oral damage. The fact of not precisely reporting the number of patients that developed each certain severity degree of their lesions could influence the results obtained. Likewise, this lack of detail has prevented us from studying and determining possible associations between the type of systemic antineoplastics and the severity of the oral lesions. Note that the wide variety of treatments, doses, routes of administrations, and adjuvant therapies within the included articles may have influenced the results.

Data analysis based on sociodemographic features (e.g., sex and age) was not feasible due to differences in samples of each study. Some articles did not describe certain characteristics of their sample and others included a population that was completely female, given that they had breast or ovarian cancer.

Lastly, although it could be thought that patients with hematologic cancer might show different prevalence data for oral mucosal damage than other solid

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

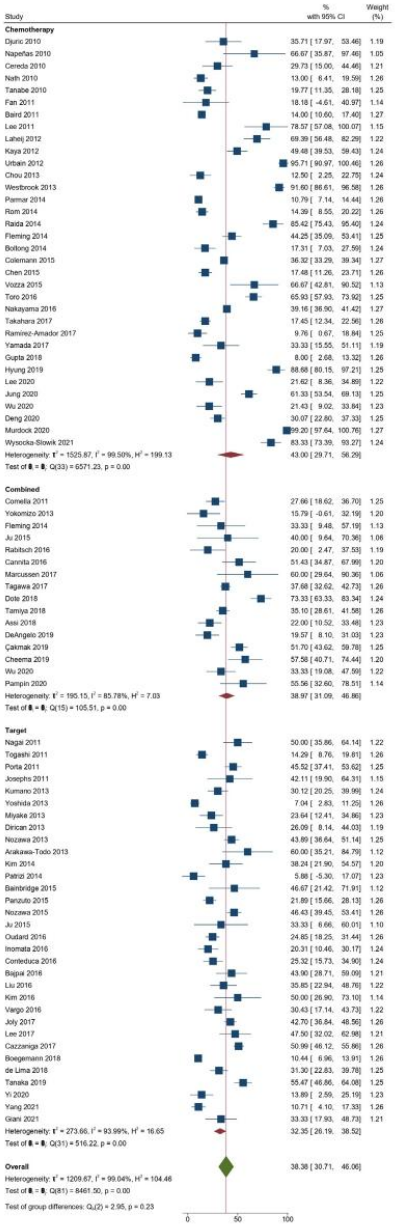


Fig. 4. Forest plot for the prevalence of acute oral mucosal damage by type of systemic antineoplastic.

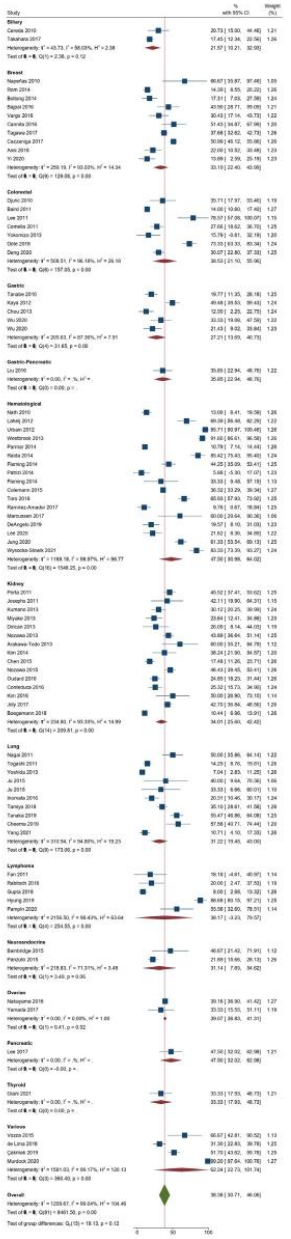


Fig. 5. Forest plot for the prevalence of acute oral mucosal damage according to cancer type.

tumors, due to the peculiarities in the approach to the disease and the therapies used (including transplants), no statistically significant differences have been observed.

The present study may lead researchers to further work on this highly prevalent side effect in patients with cancer treated with systemic antineoplastics, whether it be discovering effective treatments for this condition, preventive

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

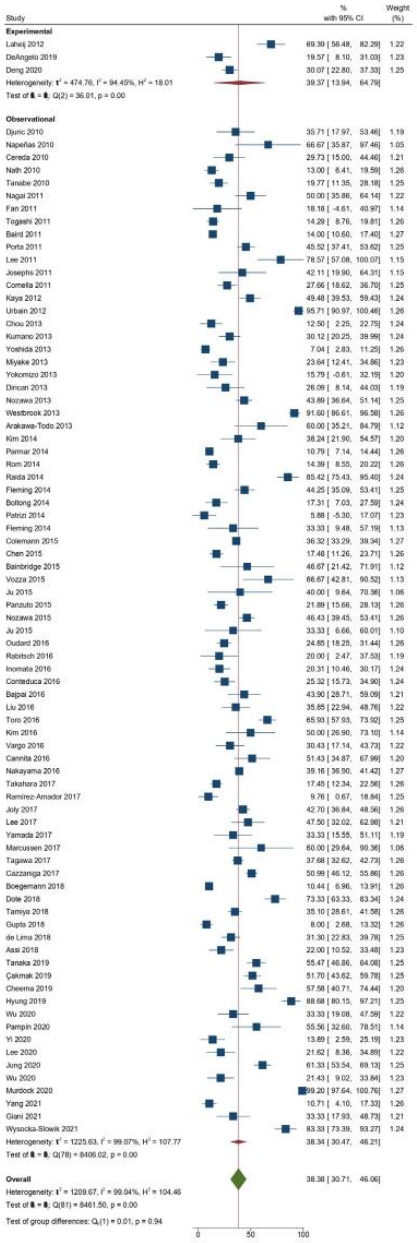


Fig. 6. Forest plot for the prevalence of acute oral mucosal damage categorized by study design.

therapies, or developing innovative cancer therapies that do not produce this side effect.

CONCLUSIONS

Oral mucosal damage has a prevalence of 38.2% in patients receiving systemic antineoplastics. No significant differences were found among traditional chemotherapy alone, targeted therapies, or their combination. This finding supports the need to assess oral mucosa of all patients receiving any type of systemic antineoplastics in the same manner to avoid underdiagnosis because it is a highly prevalent side effect.

DECLARATION OF INTEREST

None.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.oooo.2022.11.016.

REFERENCES

1. Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin*. 2022;72:57-77.
2. Elad S, Zadik Y. Chronic oral mucositis after radiotherapy to the head and neck: a new insight. *Support Care Cancer*. 2016;24:4825-4830.
3. Basile D, Di Nardo P, Corvaja C, et al. Mucosal injury during anti-cancer treatment: from pathobiology to bedside. *Cancers (Basel)*. 2019;11:857.
4. de Lima VHS, de Oliveira-Neto OB, da Hora Sales PH, da Silva Torres T, de Lima FJC. Effectiveness of low-level laser therapy for oral mucositis prevention in patients undergoing chemoradiotherapy for the treatment of head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2020;102:104524.
5. Elting LS, Keefe DM, Sonis ST, et al. Patient-reported measurements of oral mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy with or without chemotherapy: demonstration of increased frequency, severity, resistance to palliation, and impact on quality of life. *Cancer*. 2008;113:2704-2713.
6. Boers-Doets CB, Epstein JB, Raber-Durlacher JE, et al. Oral adverse events associated with tyrosine kinase and mammalian target of rapamycin inhibitors in renal cell carcinoma: a structured literature review. *Oncologist*. 2012;17:135-144.
7. Marcussen M, Sønderkær M, Bødker JS, et al. Oral mucosa tissue gene expression profiling before, during, and after radiation therapy for tonsil squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2018;13:e0190709.
8. Kusiak A, Jereczek-Fossa BA, Cichońska D, Alterio D. Oncological-therapy related oral mucositis as an interdisciplinary problem-literature review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17:2464.
9. Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer*. 2020;126:4423-4431.
10. Zhong L, Li Y, Xiong L, et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6:201.
11. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71.
12. Aslam S, Emmanuel P. Formulating a researchable question: a critical step for facilitating good clinical research. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2010;31:47-50.

13. Ma LL, Wang YY, Yang ZH, Huang D, Weng H, Zeng XT. Methodological quality (risk of bias) assessment tools for primary and secondary medical studies: what are they and which is better? *Mil Med Res*. 2020;7:7.
14. Sterne JA, Hernán MA, Reeves BC, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ*. 2016;355:i4919.
15. Sterne JAC, Savović J, Page MJ, et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ*. 2019;366:l4898.
16. Ciccarese M, Fabi A, Moscetti L, et al. Dose intensity and efficacy of the combination of everolimus and exemestane (EVE/EXE) in a real-world population of hormone receptor-positive (ER+/PgR+), HER2-negative advanced breast cancer (ABC) patients: a multicenter Italian experience. *Breast Cancer Res Treat*. 2017;163:587-594.
17. Hanaoka M, Kawabata H, Iwatani T, Takano T, Miura D. Reduction of toxicity by reversing the order of infusion of docetaxel and cyclophosphamide. *Chemotherapy*. 2013;59:93-98.
18. Fujii H, Iihara H, Yasuda K, et al. Evaluation of efficacy and safety of generic levofolinate in patients who received colorectal cancer chemotherapy. *Med Oncol*. 2011;28:488-493.
19. Wu Q, Fu Y, Wen W, Xi T, Zhao G. Efficacy and prognosis analyses of apatinib combined with S-1 in third-line chemotherapy for advanced gastric cancer. *J BUON*. 2020;25:987-994.
20. Ju Y, Hu Y, Sun S, Wang J, Jiao S. Toxicity and adverse effects of everolimus in the treatment of advanced nonsmall cell lung cancer pretreated with chemotherapy—Chinese experiences. *Indian J Cancer*. 2015;52(suppl 1):e32-e36.
21. Fleming S, Harrison SJ, Blombery P, et al. The choice of multiple myeloma induction therapy affects the frequency and severity of oral mucositis after melphalan-based autologous stem cell transplantation. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2014;14:291-296.
22. Wysocka-Słowik A, Gil L, Ślebioda Z, Kręgielczak A. Dorocka-Bobkowska B. Oral mucositis in patients with acute myeloid leukemia treated with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relation to the conditioning used prior to transplantation. *Ann Hematol*. 2021;100:2079-2086.
23. Jung J, Choi YS, Lee JH, et al. Autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma in Korea: the KMM1807 study. *Int J Hematol*. 2020;112:84-95.
24. Yi Z, Liu B, Sun X, et al. Safety and efficacy of sirolimus combined with endocrine therapy in patients with advanced hormone receptor-positive breast cancer and the exploration of biomarkers. *Breast*. 2020;52:17-22.
25. Lee YH, Hong J, Kim I, Choi Y, Park HK. Prospective evaluation of clinical symptoms of chemotherapy-induced oral mucositis in adult patients with acute leukemia: a preliminary study. *Clin Exp Dent Res*. 2020;6:90-99.
26. Pampín R, Labeaga Y, Rodríguez B, Fernández B, Fernández R, Carbajales M. Experience with ambulatory high-dose methotrexate administration as CNS prophylaxis in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Oncol Pharm Pract*. 2020;26:549-555.
27. Murdock JL, Reeves DJ. Chemotherapy-induced oral mucositis management: a retrospective analysis of MuGard, Caphosol, and standard supportive care measures. *J Oncol Pharm Pract*. 2020;26:521-528.
28. Tanaka H, Taima K, Itoga M, et al. Real-world study of afatinib in first-line or re-challenge settings for patients with EGFR mutant non-small cell lung cancer. *Med Oncol*. 2019;36:57.
29. Hyung J, Hong JY, Yoon DH, et al. Thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide or busulfan, cyclophosphamide, and etoposide high-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for consolidation of primary central nervous system lymphoma. *Ann Hematol*. 2019;98:1657-1664.
30. Çakmak S, Nural N. Incidence of and risk factors for development of oral mucositis in outpatients undergoing cancer chemotherapy. *Int J Nurs Pract*. 2019;25:e12710.
31. Boegemann M, Hubbe M, Thomaidou D, et al. Sunitinib treatment modification in first-line metastatic renal cell carcinoma: analysis of the STAR-TOR registry. *Anticancer Res*. 2018;38:6413-6422.
32. Dote S, Itakura S, Kamei K, et al. Oral mucositis associated with anti-EGFR therapy in colorectal cancer: single institutional retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2018;18:957.
33. Assi T, Kattan J, El Rassy E, et al. Efficacy and safety of everolimus in hormone receptor positive breast cancer in a developing country: real-life single institutional experience. *J Cancer Res Ther*. 2018;14:1112-1116.
34. Gupta A, Gokarn A, Rajamanickam D, et al. Lomustine, cytarabine, cyclophosphamide, etoposide—an effective conditioning regimen in autologous hematopoietic stem cell transplant for primary refractory or relapsed lymphoma: analysis of toxicity, long-term outcome, and prognostic factors. *J Cancer Res Ther*. 2018;14:926-933.
35. Cheema PK, Thawer A, Leake J, Cheng SY, Khanna S, Charles Victor J. Multi-disciplinary proactive follow-up algorithm for patients with advanced NSCLC receiving afatinib. *Support Care Cancer*. 2019;27:1029-1039.
36. Tamiya M, Suzuki H, Shiroyama T, et al. Clinical predictors of bevacizumab-associated intestinal perforation in non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2018;36:696-701.
37. de Lima M, Hajj G, de Lima V, Alves FA. Breast cancer patients have increased risk of developing mTOR inhibitor-associated stomatitis. *Oral Dis*. 2018;24:207-209.
38. Cazzaniga ME, Airoldi M, Arcangeli V, et al. Efficacy and safety of Everolimus and Exemestane in hormone-receptor positive (HR+) human-epidermal-growth-factor negative (HER2-) advanced breast cancer patients: new insights beyond clinical trials. The EVA study. *Breast*. 2017;35:115-121.
39. Yamada Y, Kawaguchi R, Ito F, et al. Skin-mucous membrane disorder and therapeutic effect of pegylated liposomal doxorubicin in recurrent ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017;43:1194-1199.
40. Ramírez-Amador V, Zambrano JG, Anaya-Saavedra G, et al. TNF as marker of oral candidiasis, HSV infection, and mucositis onset during chemotherapy in leukemia patients. *Oral Dis*. 2017;23:941-948.
41. Bajpai J, Ramaswamy A, Gupta S, Ghosh J, Gulia S. Everolimus in heavily pretreated metastatic breast cancer: is real world experience different? *Indian J Cancer*. 2016;53:464-467.
42. Joly F, Eymard JC, Albiges L, et al. A prospective observational study on the evaluation of everolimus-related adverse events in metastatic renal cell carcinoma after first-line antivascular endothelial growth factor therapy: the AFINITE study in France. *Support Care Cancer*. 2017;25:2055-2062.
43. Takahara N, Isayama H, Nakai Y, et al. Gemcitabine and S-1 versus gemcitabine and cisplatin treatment in patients with advanced biliary tract cancer: a multicenter retrospective study. *Invest New Drugs*. 2017;35:269-276.
44. Marcussen M, Bødker JS, Christensen HS, et al. Molecular characteristics of high-dose melphalan associated oral mucositis in patients with multiple myeloma: a gene expression study on human mucosa. *PLoS One*. 2017;12:e0169286.
45. Lee KJ, Cho JH, Lee SH, et al. Clinical outcomes of everolimus in patients with advanced, nonfunctioning pancreatic

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

neuroendocrine tumors: a multicenter study in Korea. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80:799-805.
46. Tagawa N, Sugiyama E, Tajima M, et al. Comparison of adverse events following injection of original or generic docetaxel for the treatment of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80:841-849.
47. Nakayama M, Kobayashi H, Takahara T, Nishimura Y, Fukushima K, Yoshizawa K. A comparison of overall survival with 40 and 50mg/m^2 pegylated liposomal doxorubicin treatment in patients with recurrent epithelial ovarian cancer: propensity score-matched analysis of real-world data. *Gynecol Oncol*. 2016;143:246-251.
48. Kim KH, Kim JH, Lee JY, et al. Efficacy and toxicity of mammalian target rapamycin inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma with renal insufficiency: the Korean Cancer Study Group GU 14-08. *Cancer Res Treat*. 2016;48:1286-1292.
49. Inomata M, Shimokawa K, Tokui K, et al. Appetite loss as an adverse effect during treatment with EGFR-TKIs in elderly patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2016;36:4951-4954.
50. Cannita K, Paradisi S, Cocciolone V, et al. New schedule of bevacizumab/paclitaxel as first-line therapy for metastatic HER2-negative breast cancer in a real-life setting. *Cancer Med*. 2016;5:2232-2239.
51. Liu CT, Chen MH, Chen JS, et al. The efficacy and safety of everolimus for the treatment of progressive gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a multi-institution observational study in Taiwan. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2016;12:396-402.
52. Oudard S, Joly F, Geoffrois L, et al. Clinical benefit of everolimus as second-line therapy in metastatic renal cell carcinoma: the French retrospective SECTOR study. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14:e595-e607.
53. Conteduca V, Santoni M, Medri M, et al. Correlation of stomatitis and cutaneous toxicity with clinical outcome in patients with metastatic renal-cell carcinoma treated with everolimus. *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14:426-431.
54. Toro JJ, Gushiken FC, Schneider D, Lee S, Haile DJ, Freytes CO. Edentulism and transplant-associated complications in patients with multiple myeloma undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2016;24:3411-3415.
55. Rabitsch W, Bojic M, Wohlfarth P, et al. Alemtuzumab-BEAM as conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma: a single-center analysis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016;142:1307-1314.
56. Vargo CA, Berger MJ, Phillips G, Mrozek E. Occurrence and characterization of everolimus adverse events during first and subsequent cycles in the treatment of metastatic breast cancer. *Support Care Cancer*. 2016;24:2913-2918.
57. Bainbridge HE, Larbi E, Middleton G. Symptomatic control of neuroendocrine tumours with everolimus. *Horm Cancer*. 2015;6:254-259.
58. Vozza I, Caldarazzo V, Ottolenghi L. Changes in microflora in dental plaque from cancer patients undergoing chemotherapy and the relationship of these changes with mucositis: a pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e259-e266.
59. Nozawa M, Ohzeki T, Tamada S, et al. Differences in adverse event profiles between everolimus and temsirolimus and the risk factors for non-infectious pneumonitis in advanced renal cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2015;20:790-795.
60. Chen J, Wang XT, Luo PH, He QJ. Effects of unidentified renal insufficiency on the safety and efficacy of chemotherapy for metastatic colorectal cancer patients: a prospective, observational study. *Support Care Cancer*. 2015;23:1043-1048.
61. Coleman EA, Lee JY, Erickson SW, et al. GWAS of 972 autologous stem cell recipients with multiple myeloma identifies 11 genetic variants associated with chemotherapy-induced oral mucositis. *Support Care Cancer*. 2015;23:841-849.
62. Boltong A, Aranda S, Keast R, et al. A prospective cohort study of the effects of adjuvant breast cancer chemotherapy on taste function, food liking, appetite and associated nutritional outcomes. *PLoS One*. 2014;9:e103512.
63. Parmar SR, Bookout R, Shapiro JF, et al. Comparison of 1-day vs 2-day dosing of high-dose melphalan followed by autologous hematopoietic cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49:761-766.
64. Kim KH, Kim HY, Kim HR, et al. Efficacy and toxicity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma with renal insufficiency. *Eur J Cancer*. 2014;50:746-752.
65. Rom J, Bechstein S, Domschke C, et al. Efficacy and toxicity profile of pegylated liposomal doxorubicin (Caelyx) in patients with advanced breast cancer. *Anticancer Drugs*. 2014;25:219-224.
66. Arakawa-Todo M, Yoshizawa T, Zennami K, et al. Management of adverse events in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and clinical outcomes. *Anticancer Res*. 2013;33:5043-5050.
67. Chou WC, Chang CL, Liu KH, et al. Total gastrectomy increases the incidence of grade III and IV toxicities in patients with gastric cancer receiving adjuvant TS-1 treatment. *World J Surg Oncol*. 2013;11:287.
68. Kumano M, Miyake H, Harada K, Fujisawa M. Sequential use of mammalian target of rapamycin inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma following failure of tyrosine kinase inhibitors. *Med Oncol*. 2013;30:745.
69. Miyake H, Harada K, Kumano M, Fujisawa M. Assessment of efficacy, safety and quality of life of 55 patients with metastatic renal cell carcinoma treated with temsirolimus: a single-center experience in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2014;19:679-685.
70. Nozawa M, Nonomura N, Ueda T, et al. Adverse event profile and dose modification of everolimus for advanced renal cell carcinoma in real-world Japanese clinical practice. *Jpn J Clin Oncol*. 2013;43:1132-1138.
71. Dirican A, Kucukzeybek Y, Erten C, et al. Prognostic and predictive value of hematologic parameters in patients with metastatic renal cell carcinoma: second line sunitinib treatment following IFN-alpha. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:2101-2105.
72. Patrizi A, Venturi M, Dika E, Maibach H, Tacchetti P, Brandi G. Cutaneous adverse reactions linked to targeted anticancer therapies bortezomib and lenalidomide for multiple myeloma: new drugs, old side effects. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014;33:1-6.
73. Westbrook SD, Kirkpatrick WR, Wiederhold NP, et al. Microbiology and epidemiology of oral yeast colonization in hemopoietic progenitor cell transplant recipients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;115:354-358.
74. Yoshida T, Yamada K, Azuma K, et al. Comparison of adverse events and efficacy between gefitinib and erlotinib in patients with non-small-cell lung cancer: a retrospective analysis. *Med Oncol*. 2013;30:349.
75. Kaya AO, Coskun U, Gumus M, et al. The efficacy and toxicity of irinotecan with leucovorin and bolus and continuous infusional 5-fluorouracil (FOLFIRI) as salvage therapy for patients with advanced gastric cancer previously treated with platinum and taxane-based chemotherapy regimens. *J Chemother*. 2012;24:217-220.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

76. Urbain P, Raynor A, Bertz H, Lambert C, Biesalski HK. Role of antioxidants in buccal mucosa cells and plasma on the incidence and severity of oral mucositis after allogeneic haematopoietic cell transplantation. *Support Care Cancer*. 2012;20:1831-1838.
77. Nagai H, Tanaka S, Niimi M, et al. Safety of erlotinib treatment in outpatients with previously treated non-small-cell lung cancer in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2011;16:560-567.
78. Comella P, Massidda B, Natale D, et al. Efficacy and tolerability of biweekly bevacizumab, irinotecan, folinic acid and fluorouracil intravenous bolus (BIFF Regimen) in patients with metastatic colorectal cancer: the southern Italy cooperative oncology group experience. *Clin Colorectal Cancer*. 2011;10:42-47.
79. Lee HJ, Lee YS, Lee KW, et al. Efficacy and safety of hepatic arterial infusion of fluorouracil with leucovorin as salvage treatment for refractory liver metastases from colorectal cancer. *Korean J Intern Med*. 2011;26:82-88.
80. Porta C, Paglino C, Imarisio I, et al. Safety and treatment patterns of multikinase inhibitors in patients with metastatic renal cell carcinoma at a tertiary oncology center in Italy. *BMC Cancer*. 2011;11:105.
81. Togashi Y, Masago K, Fujita S, et al. Differences in adverse events between 250 mg daily gefitinib and 150 mg daily erlotinib in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;74:98-102.
82. Fan Y, Lin NM, Luo LH, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of pegylated liposomal doxorubicin combination (CCOP) chemotherapy in patients with peripheral T-cell lymphomas. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32:408-414.
83. Josephs D, Hutson TE, Cowey CL, et al. Efficacy and toxicity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma with severe renal impairment or on haemodialysis. *BJU Int*. 2011;108:1279-1283.
84. Baird R, Biondo A, Chhaya V, et al. Toxicity associated with capecitabine plus oxaliplatin in colorectal cancer before and after an institutional policy of capecitabine dose reduction. *Br J Cancer*. 2011;104:43-50.
85. Djuric M, Cakic S, Hadzi-Mihailovic M, Petrovic D, Jankovic L. Oral status in patients receiving 5-fluorouracil for colorectal cancer. *J BUON*. 2010;15:475-479.
86. Nath CE, Shaw PJ, Trotman J, et al. Population pharmacokinetics of melphalan in patients with multiple myeloma undergoing high dose therapy. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;69:484-497.
87. Tanabe K, Suzuki T, Tokumoto N, Yamamoto H, Yoshida K, Ohdan H. Combination therapy with docetaxel and S-1 as a first-line treatment in patients with advanced or recurrent gastric cancer: a retrospective analysis. *World J Surg Oncol*. 2010;8:40.
88. Napeñas JJ, Brennan MT, Coleman S, et al. Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109:554-560.
89. Cereda S, Passoni P, Reni M, et al. The cisplatin, epirubicin, 5-fluorouracil, gemcitabine (PEFG) regimen in advanced biliary tract adenocarcinoma. *Cancer*. 2010;116:2208-2214.
90. Yokomizo H, Yoshimatsu K, Otani T, et al. Practical use of capecitabine plus oxaliplatin (CAPEOX) with bevacizumab for patients with metastatic colorectal cancer that cannot expect conversion therapy. *Hepatogastroenterology*. 2013;60:1911-1915.
91. Raida L, Rusinakova Z, Faber E, et al. Comparison of reduced conditionings combining fludarabine with melphalan or 3-day busulfan in patients allografted for myeloid neoplasms. *Int J Hematol*. 2014;100:582-591.
92. Panzuto F, Rinzivillo M, Fazio N, et al. Real-world study of everolimus in advanced progressive neuroendocrine tumors. *Oncologist*. 2014;19:966-974.
93. Yang Y, Guo Y, Wang R, Li J, Zhu H, Guo RTW. Effect of osimertinib in treating patients with first-generation EGFR-TKI-resistant advanced non-small cell lung cancer and prognostic analysis. *J BUON*. 2021;26:51-57.
94. Giani C, Valerio L, Bongiovanni A, et al. Safety and quality-of-life data from an Italian expanded access program of lenvatinib for treatment of thyroid cancer. *Thyroid*. 2021;31:224-232.
95. DeAngelo DJ, Walker AR, Schlenk RF, et al. Safety and efficacy of oral panobinostat plus chemotherapy in patients aged 65 years or younger with high-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2019;85:106197.
96. Laheij AM, de Soet JJ, von dem Borne PA, et al. Oral bacteria and yeasts in relationship to oral ulcerations in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Support Care Cancer*. 2012;20:3231-3240.
97. Deng R, Shi L, Zhu W, et al. Pharmacokinetics-based dose management of 5-fluorouracil clinical research in advanced colorectal cancer treatment. *Mini Rev Med Chem*. 2020;20:161-167.
98. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66:271-289.
99. Peryer G, Golder S, Junqueira D, Vohra S, Loke YK. Chapter 19: Adverse effects. In: Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA, eds. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, *version 6.3*, Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell; 2022.
100. Golder S, Loke YK, Bland M. Meta-analyses of adverse effects data derived from randomised controlled trials as compared to observational studies: methodological overview. *PLoS Med*. 2011;8:e1001026.
101. Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium. *Front Pharmacol*. 2018;9:1300.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2 ARTÍCULO 2. Rodríguez-Fuentes, M. E., Pérez-Sayáns, M., Chauca-Bajaña, L. A., Barbeito-Castiñeiras, G., Molino-Bernal, M. L., & López-López, R. (2022). Oral microbiome and systemic antineoplastics in cancer treatment: A systematic review. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, *27*(3), e248–e256.

Revista: Medicina oral, patología oral y cirugía bucal.

Factor de impacto (JCR 2022): 2.2

Cuartil: Q3

Categoría: Dentistry, Oral Surgey & Medicine

Posición: 61/91

Tipo de licencia: Copyright: © 2022 Medicina Oral S.L. Este es un artículo "*open-access*" o de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la "*Creative Commons Attribution License*", la cual permite uso no restringido, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre y cuando el trabajo original sea adecuadamente citado.

Contribuciones de los autores:

- Manuel Eros Rodríguez Fuentes: formulación de la hipótesis, diseño del proyecto y establecimiento del cuadro teórico, revisión bibliográfica, extracción

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de datos, análisis de datos e interpretación de resultados, redacción y formato del manuscrito, envío a la revista.

- Mario Pérez-Sayáns: soporte en el diseño del proyecto y establecimiento del cuadro teórico, revisión de discrepancias en la extracción de datos, revisión crítica del artículo, soporte en la ejecución de la investigación y revisión de manuscrito.
- Luis Alberto Chauca Bajaña: revisión bibliográfica y extracción de datos.
- Gema Barbeito Castiñeiras: establecimiento del cuadro teórico y revisión de manuscrito.
- María Luisa Pérez del Molino Bernal: establecimiento del cuadro teórico y revisión de manuscrito.
- Rafael López López: formulación de la hipótesis, revisión crítica del artículo, soporte en la ejecución de la investigación y revisión de manuscrito.

Enlace al artículo:

http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/25121.pdf

Journal section: Oral Medicine and Pathology
Publication Types: Review

doi:10.4317/medoral.25121

Oral microbiome and systemic antineoplastics in cancer treatment: A systematic review

Manuel Eros Rodríguez-Fuentes [1,2], Mario Pérez-Sayáns [1,2], Luis Alberto Chauca-Bajaña [1,3], Gema Barbeito-Castiñeiras [4], María Luisa Pérez del Molino-Bernal [4], Rafael López-López [5]

[1] Oral Medicine, Oral Surgery and Implantology Unit (MedOralRes), Faculty of Medicine and Dentistry, Universidade de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain
[2] Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS), A Coruña, Spain
[3] Periodontics and Implantology Oral Research Unit. College Dentistry. Universidad de Guayaquil, Ecuador
[4] Microbiology Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.
[5] Medical Oncology Unit, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Correspondence:
Facultad de Medicina y Odontología, c/ Entrerríos s/n
15782 Santiago de Compostela, Spain
perezsayans@gmail.com

Received: 20/09/2021
Accepted: 07/03/2022

Rodríguez-Fuentes ME, Pérez-Sayáns M, Chauca-Bajaña LA, Barbeito-Castiñeiras G, Molino-Bernal ML, López-López R. Oral microbiome and systemic antineoplastics in cancer treatment: A systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2022 May 1;27 (3):e248-56.

Article Number: 25121 http://www.medicinaoral.com/
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - pISSN 1698-4447 - eISSN: 1698-6946
eMail: medicina@medicinaoral.com
Indexed in:
Science Citation Index Expanded
Journal Citation Reports
Index Medicus, MEDLINE, PubMed
Scopus, Embase and Emcare
Indice Médico Español

Abstract

Background: Oral mucositis is one of the most common side effects in cancer patients receiving systemic antineoplastics. However, the underlying biological mechanisms leading to this condition are still unclear. For this reason, it has been hypothesised that systemic antineoplastics may cause an imbalance on the oral microbiota that subsequently triggers oral mucosa damage.

Material and Methods: A systematic review was performed following the PRISMA protocol and the PICO question established was: patients diagnosed with cancer, who are candidates for receiving systemic antineoplastics (P=Patients), that undergo oral microbiome determinations (I=Intervention), before and after systemic antineoplastics administration (C=Comparison), to analyse changes in the oral microbiome composition (O=Outcome). The bibliographic search was carried out in PubMed and other scientific repositories.

Results: Out of 166 obtained articles, only 5 met eligibility criteria. Acute myeloid leukaemia (AML) was the most frequent type of cancer (40 %) among the participants. Only one of the studies included a control group of healthy subjects. Heterogeneity in the protocols and approaches of the included studies hindered a detailed comparison of the outcomes. However, it was stated that a decrease in bacteria α diversity is often associated with oral mucositis. On the other hand, fungal diversity was not associated with oral mucositis although α diversity was lower at baseline on patients developing oral candidiasis.

Conclusions: There is insufficient scientific evidence of oral microbiological changes in patients undergoing systemic antineoplastics. Further investigations ought to be carried out to identify microorganisms that might play a key role in the pathogenesis of oral mucosa damage in patients undergoing systemic antineoplastics.

Key words: *Stomatitis, antineoplastic agents, neoplasms, microbiota, immunotherapy.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Introduction

Cancer is not a single disease but a variety of more than a hundred different conditions triggered by an uncontrolled cell growth that can be originated in any tissue. These cells have the potential to disseminate to other parts of the body and invade surrounding tissues (1). In 2020, the International Agency for Research on Cancer estimated a worldwide cancer incidence of 19.3 million of new cases (2). Consequently, a considerable percentage of them may require the use of traditional chemotherapeutic agents alone or in combination with surgical resections or radiotherapy (3). Nevertheless, new targeted therapies are becoming essential in recent years showing extremely successful outcomes (4). These treatments often lead to toxicity in healthy tissues, being oral mucositis (OM) one of the most common side effects. It consists of oral mucosal damage, previously described as a five-phase process (5), with inflammation, erythema, atrophy and/or ulceration of the oral cavity lining (6). Its incidence in patients with solid tumours receiving chemotherapy is between 20-40%, while in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation is between 60-80% and even superior in patients undergoing radiotherapy (7). Acute localized pain in the affected area, inadequate nutrition/malnourishment and dehydration are the most frequently reported signs and symptoms associated with stomatitis. It can be such a limiting factor that may even influence on postponing the administration of new doses of anti-tumour treatment until oral health is recovered, requiring patients' hospitalization or prolonging the stay of those who were initially hospitalized. Therefore, not only cancer progression is a major concern, but important economic repercussions derived from the undesired effects arisen (8). The World Health Organization (WHO) established a specific tool to facilitate and homogenize clinicians grading of oral mucositis, a 0 to 4 scale based on clinical parameters (9). Currently there is no sufficiently effective treatments or preventive strategies for the management of oral mucositis, which leads to the use of methods aimed at palliation of the symptoms. Thus, there is a need to characterize the interactions in the underpinning biological pathways, with the aim of seeking effective alternatives for prevention and/or treatment (8,10). Despite the known cytotoxic effect of antineoplastics on the mucosa cells because of their speed of replication (11), it has been proposed that oral microbiota may have a crucial effect on the development of stomatitis due to the close relationship between microorganisms and mucosal tissue (7,12).

Oral microflora is defined as the set of different germs that inhabit the oral cavity, mainly integrated by bacteria, but also by protozoa, fungi, and viruses (13). The relationship created between these microorganisms and the host is basically commensalism (14), providing a protective barrier (15). Therefore, an alteration in the balance of its components might generate modifications at different signalling pathways' levels and, subsequently, triggering pathological processes on the host's oral health (16,17). Most of the oral microbiome studies in cancer therapy-induced oral mucositis were performed on patients receiving radiotherapy (12,18). However, only a few studies have linked changes in the oral flora of patients undergoing chemotherapy to the development of more advanced degrees of oral mucositis (19). For this reason, we hypothesized that systemic antineoplastic treatments (such as chemotherapy, immunotherapy, or targeted therapies) may influence changes on the oral microbiome of patients and, subsequently, dysbiosis might be responsible for the development of oral mucositis. Herein, our proposal focused on performing a systematic review to analyse changes in the relative abundances, of taxonomic, phylum, class, order, family, genus, or species of the different microorganisms that constitute the oral biofilm. Secondary objectives aim to investigate if more pronounced imbalances on the oral microbiome would correlate to changes in the severity of the oral mucosa damage.

Material and Methods

- Protocol design and registration

The protocol for this study was designed following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines (20) and later registered on PROSPERO (ID: CRD42021236167). To establish a well-defined research question, we used a Patient-Intervention-Comparison-Outcome (PICO) method (21): patients diagnosed with cancer who receive or are candidates for receiving systemic antineoplastics (P=Patient); any determinations of oral microbiome (I = intervention); before and after systemic antineoplastics administration and in healthy controls if available (C=Comparison); changes in microorganisms' relative abundances of oral flora or in oral microbiome composition (O=outcome).

- Sources of information and search strategy

A bibliographic search was carried out in various scientific electronic repositories: PubMed/MEDLINE, Web of Knowledge, Cochrane, Directory of Open Access Journals (DOAJ), Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud (LILACS) and SciELO from inception to August 2021. Furthermore, a manual electronic search was performed on field-related journals' websites. Potentially relevant articles that any of the authors were familiar with, as well as reference lists from the retrieved articles, were also comprehensively checked.

Our team agreed a search strategy defined by the fol-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lowing algorithm with the aim of being applied in MEDLINE: ("oral microbiome" OR "oral microbiota" OR "oral biofilm" OR "oral flora" OR "oral microflora") AND ("Antineoplastic agent" OR Chemotherapy OR Immunotherapy OR "targeted therapy" OR "Induction Chemotherapy" OR "Molecular Targeted Therapy") AND (stomatitis OR "oral mucositis" OR "oral ulcer"). In addition to the forementioned formula, we also applied the "human" filter. The syntax was specifically adapted for other databases' search, being the main keywords "oral microbiome" and "cancer therapy".

- Eligibility criteria

All references identified from computerized databases were manually retrieved and the studies were included if they met the following inclusion criteria: All original articles, case reports and case series, with no language limitations. Longitudinal studies in subjects ≥18 years old that analysed oral specimens obtained at least before and after systemic antineoplastic administration, were also eligible. Included articles must perform microorganisms' sequencing. The exclusion criteria englobed: technical features such as the use of different methods for germ identification, the inclusion of either paediatric patients or subjects undergoing radiotherapy. Other bibliographic aspects led us to discard letters, congress abstracts, literature reviews, systematic reviews, doctoral thesis, and original in vitro and in vivo studies.

- Study selection and data extraction process

Two independent researchers (M.E.R.F. and L.A.C.B.) performed selection of the studies by reading the titles and excluding those that did not focus on our topic. Secondly, abstracts of the retrieved articles were assessed and selected those that met eligibility criteria. Then, both researchers proceeded to fully read the remaining articles and discarded the unselected ones appropriately. In case of discrepancies, a third researcher (M.P.S.) acted as a mediator to conclude if articles met eligibility criteria. Data extraction process was performed, creating a database with all the variables available on each article that were relevant to the study. Finally, the two researchers compared results to ensure they matched.

The following information was extracted from each selected study when available: first author, year of publication, sociodemographic characteristics of subjects (number of subjects, age, gender, smoking habits), clinical parameters (acid inhibitors use, inhalers use, oral health-related examinations, type of diagnosed cancer), received treatments (type of chemotherapeutic agent, doses, antibiotic use and type, antifungal use and type), specimens obtained (type of specimen, method of obtaining, time of specimen extraction, sequencing method, sequenced regions), microbiome-related variables (any taxonomic, phylum, class, order, family, genus and species-related information given, bacterial relative abundances, bacterial and fungal alpha/beta diversity, bacterial/fungal changes associated with other risk factors, bacterial-fungal interactions) and oral mucosa damage assessments (oral mucositis and oral candidiasis development, peak of oral mucositis development, World Health Organization Scores (22)).

- Evaluation of quality and risk of bias

A quality assessment was performed by the two researchers to evaluate the risk of bias. We classified the five incorporated articles as cohort studies even though most of them did not include a control group (23). Thus, the Newcastle-Ottawa Quality Assessment Scale (NOS) for cohort studies was the method used (24) to obtain scores. The quality assessment stablished a rating method where: an overall star score of ≥ 7 stars was defined as high quality, medium quality when it was between 4 – 6 stars and low quality when below 4 stars.

- Statistical analysis

The means of certain values were calculated using SPSS software (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM CorpArmonk, NY: IBM Corp) when appropriate.

Results

- Study selection

A total of 155 references were retrieved from the initial search, out of which 150 were removed as detailed in Fig. 1. Subsequently, only 5 articles (25-29) met eligibility criteria to be included in our review.

- Quality and protocols details of the included studies

In Table 1 we summarize the quality assessment performed on the five articles that axis this review. According to the NOS, only one of them was classified as high quality, while the other 4 were medium quality. Comparability was only star-rated in one of the studies since the others did not include a healthy control group.

Among the selected articles, Hong *et al.* 2019 and Diaz *et al.* 2019 were conducted under the same protocol, which means that both investigations used data from the same population. Nevertheless, Diaz *et al.* 2019 excluded some patients because some specimens or other relevant clinical information were missed. Moreover, healthy controls were considered by Hong *et al.* 2019, but Diaz *et al.* 2019 did not analyse them. Similarly, Robinson *et al.* 2020 and Galloway-Peña *et al.* 2017 were articles derived from the same clinical study, however the most recent publication focused on extracting additional data that was not considered within the article initially issued.

- Main characteristics of the included articles

Our analysis showed in Table 2, reveals the main characteristics of the included articles. All these studies were observational and published between 2017 and 2020. Due to duplicities in the sample population among studies, it should be stated that 177 patients participated, after removing 51 (26) and 45 subjects (29).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1: Quality Assessment through Newcastle Ottawa Scale of the included articles.

Author (Year)	Selection	Comparability	Outcome	Star Score	Quality Assessment
Hong *et al.* (2019)	★★★	★	★★★	7	High
Laheij *et al.* (2019)	★★		★★★	5	Medium
Robinson *et al.* (2020)	★★		★★★	5	Medium
Galloway-Peña *et al.* (2017)	★★		★★★	5	Medium
Diaz *et al.* (2019)	★★		★★★	5	Medium

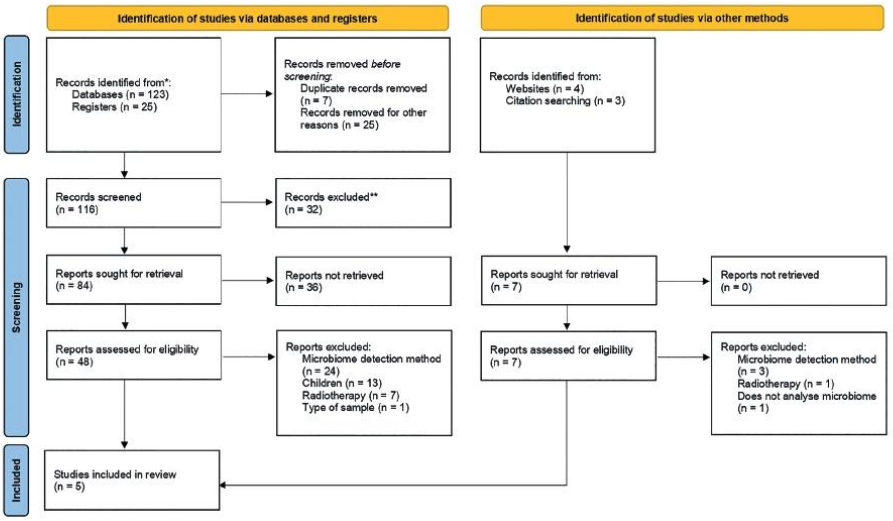
NOS scores for each included article. Each subsection (selection, comparability, and outcome) was star-rated. The rating method established that an overall star score of ≥ 7 stars determined a high quality, 4 – 6 stars a medium quality and below 4 stars was considered low quality.

Table 2: Summary of the main characteristics of the included scientific articles.

		Same clinical study		Same clinical study		
Author (Year)		*Galloway-Peña et al., 2017 (28)*	*Robinson et al., 2020* (27)	*Hong et al., 2019 (25)*	*Diaz et al., 2019* (29)	*Laheij et al., 2019* (26)
Sample size		59	39	79	45	51
Healthy controls		0	0	30	0	0
Type of cancer		AML	AML	SCC, Breast, AC, Others	SCC, Breast, AC, Others	MM
Chemotherapeutic agents		✓	✓	✓	✓	✓
Specimen	**Saliva**			✓	✓	
	Oral Rinse			✓	✓	✓
	Mucosa	✓	✓	✓	✓	
Specimen Collection point	**Baseline (Day 0)**	✓	✓	✓	✓	✓
	Day 3 ± 2	✓	✓	✓	✓	
	Day 9 ± 2	✓	✓	✓	✓	✓
	Day 14 ± 2	✓	✓	✓	✓	✓
	3 months					✓
Bacterial sequencing method		Illumina MiSeq Sequencing	Illumina MiSeq Sequencing	High-through-put amplicon sequencing	High-throughput amplicon sequencing	Amplicon sequencing
Fungal sequencing method		N/A	Illumina MiSeq Sequencing	High-through-put amplicon sequencing	High-through-put amplicon sequencing	N/A
Oral inter- and intra-kingdom interactions			✓			
Oral virome						
Oral mucositis clinical assessment				✓		✓
Oral candidiasis clinical assessment					✓	

Summary of the main characteristics of the included scientific articles. Description of the sample size on each study, clinical aspects, type of samples microorganisms analysed and detection methods, as well as time collection point. AC: Adenocarcinoma, AML: Acute Myeloid Leukemia, MM: Multiple Myeloma, SCC: Squamous Cell Carcinoma; N/A: Not applicable.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



*Databases: Pubmed (77), LILACS (4), Cochrane (1), Web of Knowledge (17), SciELO (2), DOAJ (21), Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (1). Registers: ClinicalTrials.gov (25).
**No automation tools were used; all records were excluded by human.

Fig. 1: PRISMA 2020 Flow diagram for new systematic reviews.

Having declared that, from this point onwards, we will consider articles as if they originated from independent research projects to avoid confusion.

A fair similarity of the sample size was noted among the included studies (39 – 59 cancer patients), regardless of healthy controls, which were exclusively included in one of them. Unhealthy subjects mainly suffered from five different types of cancer, which were acute myeloid leukaemia, multiple myeloma, squamous cell carcinoma, breast cancer and adenocarcinoma. There were quite a wide variety of chemotherapy-based regimes administered to the patients in combination with adjuvants and immunotherapy.

The most frequent type of specimen collected in the studies was mucosa swab, followed by oral rinse while whole saliva was the least frequently used. Within all analysed studies, specimens were collected in a minimum of 4 different time points, 100% of them coincided in specimen collections at baseline (prior to treatment administration), day 9 ± 2 and day 14 ± 2. Only one of the studies differ from the rest, which collected a specimen in a follow-up visit 3 months after treatment initiation and did not obtain a specimen on day 3 ± 2 likewise the other 4 studies.

Microorganisms were detected through three different methods based on 16S rRNA sequencing. Two authors chose Illumina MiSeq sequencing, whereas other two preferred high-throughput amplicon sequencing (454 GS FLX) and only one of them used amplicon sequencing. Nevertheless, fungal sequencing was carried out in 3 studies, out of which 2 opted for high-throughput sequencing and 1 for Illumina MiSeq. Conversely, none of the incorporated studies to this review analysed oral virome of the enrolled individuals.

Regarding the clinical evaluations, 3 articles monitored oral mucosa damage. Two research teams graded it by examination, and registered stomatitis using other scales. Specifically, another article focused on oral candidiasis determination in chemotherapy-receiving patients.

- Quantitative data extracted

A mean of 49 subjects were included in each study, and the mean age was 56 years. An average of 50% of the participants were male and 74% received any type of antibiotic. Among the included cancer patients, acute myeloid leukaemia was the most frequent type of cancer (40%), followed by multiple myeloma (20%) and squamous cell carcinoma (17%), as shown in Supplement 1.

- Summary of oral microbiome-related outcomes

Galloway-Peña *et al.* 2017 (28) stated an association between the increase of three pathogenic-associated bacteria genera proportions and the α and β diversity transient variability, in the mucosa of patients receiving chemotherapy (shown in Table 3).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3: Summary of the main microbiome-related findings of the included articles.

Author (Year)	Microorganism	Main outcomes			
Galloway-Peña *et al.*, 2017 (28)	Bacteria	*Streptococcus*, *Staphylococcus* & *Stenotrophomonas* proportions were associated to ↑ temporal instability of α and β diversity.			
Robinson *et al.*, 2020 (27)	Fungal	Top 10 genera:	*Alternaria*, *Candida*, *Cladosporium*, *Fungi sp.*, *Fusarium*, *Malassezia*, *Malasseziales sp.*, *Meyerozyma*, *Ramularia*, *Saccharomyces*		
		- ↓ *Aspergillus* compared to healthy subjects. - α and β diversity did not significantly change over time. - HICT was associated to ↓ in *Malassezia* proportions. - ↑ proportions of *Fusarium* were associated to amphotericin B use (& other antimicrobials)			
Hong *et al.*, 2019 (25)	Bacteria	OM Severity	Saliva	α diversity ↓ during chemotherapy	
				↑	*Fusobacterium nucleatum subsp. Vicentii*, *Clostridiales*, *Treponema maltophilum*
				↓	*Streptococcus parasanguinis II*, *Solobacterium moorei*, *Granulicatella adiacens*, *Lachnoanaerobaculum orale*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella sp.* HOT305, *Streptococcus salivarius*, *Oribacterium sinus*, *Veillonella rogosae*, *Gemella sanguinis*, *Veillonella denticariosi*, *Acinomyces graevenitzii*, *Prevotella pallens*, *Veillonella atypica*, *Acinomyces odontolycus*, *Streptococcus sp.* HOT066, *Streptococcus sp.* HOT061, *Leptotrichia sp.* HOT215, *Actinomyces sp.* HOT172, *Stomatobaculum sp.* HOT097, *Prevotella sp.* HOT313, *Peptostreptococcaceae*, *Prevotella histicola*, *Actinomyces lingnae*.
			Mucosa	↑	*Prevotella oris*
				↓	*Streptococcus parasanguinis II*, *Streptococcus vestibularis*, *Veillonella rogosae*, *Actinomyces graevenitzii*
Diaz *et al.* 2019 (29)	Bacteria	Oral Candidiasis	Saliva	α diversity was significantly narrower at baseline in patients developing oral candidiasis.	
				↑	*Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus oris*, *Veillonella dispar/parvulla*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus crispatus*, *Streptococcus parasanguinis II*, *Streptococcus mutans*, *Peptostreptococcaceae [X] [G-5] [Eubacterium] saphenum*, *Neisseria bacilliformis*, and *Atopobium parvulum* at baseline.
				↓	*Streptococcus australis*, *haemophilus parainfluenzae*, *catonella morbi*, *abiotrophia defective*, *solobacterium moorei*, *fusobacterium nucleatum sp. Polymorphum*, *stomatobaculum sp. HOT097*, *Gemella sanguinis*; *Streptococcus sp. HOT066*, *Oribacterium sinus*, and *Mogibacterium dibersum* at baseline.
	Fungal	Oral Candidiasis	Saliva	α diversity was significantly lower at baseline in patients developing oral candidiasis.	
				↑	*Rothia mucilaginosa*, *Candida*, *mycoplasma faucium*, *Candida albicans and Porphyromonas endodontalis* at baseline.
				↓	*Porphyromonas sp.* HOT279, Unclassified *Saccharomycetaceae* and *Malassezia at baseline*.
Laheij *et al.*, 2019 (26)	Bacteria	Ulcerative OM	At Baseline & 3 months	↑	*Streptococcus australis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Veillonella atypica*, *Veillonella dispar*, genus *Actinomyces*, *Actinomyces sp. OT172*, *Actinomyces graevenitzii*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*, and *Gemella sanguinis taxa*.
			1 & 2 weeks	↑	*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Scardovia wiggsiae*, and *Enterococcus faecalis*.
			↑ *Veillonella*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus spp.*, *Fusobacterium*, *Prevotella oris*, and *Prevotella verorallis*. †		
		Non-ulcerative OM	At Baseline & 3 months	↑	*Veillonella atypica*, *Veillonella dispar*, *Actinomyces sp.* OT172, *Actinomyces graevenitzii*, genus *Prevotella*, genus *Leptotrichia*, *Megasphaera micronuciformis* and *Veillonella sp.* OT917.
			1 & 2 weeks	↑	Genus *Lactobacillus*, *Lactobacillus fermentum* and *Scardovia wiggsiae*.
			↑ *Actinomyces graevenitzii* and *Streptococcus constellatus*. †		

Summary of the main microbiome-related findings of the included articles. Table shows a series of results, according to the type of sample and microorganisms studied. Changes in the germ loads on specific situations and time points, besides variability of α and β diversities. OM: Oral Mucositis, HICT: High Intensity Chemotherapy, ↓: Decrease, ↑: Increase, *: Taxa proportions-discrimination between groups at baseline.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Furthermore, the total days of antibiotic use had a similar effect on the oral microbiota fluctuations (28).

Next, Robinson *et al.* 2020 (27) displayed various oral mycobiome findings also detailed in Table 3. They did not state significant changes in α or β mycobiome diversity along time in patients receiving anticancer treatment. Whereas they revealed the 10 most abundant fungal genus in the oral cavity of these patients (Table 3). Among them, *Malassezia, Candida, Saccharomyces, Fusarium,* and *Cladosporium* turned out to be the top five, which matches findings in healthy individuals (27). Also, a series of intra- and inter-kingdom interactions were outlined as shown in Table 4.

Hong *et al.* 2019 (25) found that peak mucosa damage correlated to a lower salivary bacterial α diversity, overlapping the period where treatment is being administered. Specifically, they identified that the severity of oral mucositis was associated with disruptions in the oral bacteria loads. Increases and decreases in oral bacteria are detailed in Table 3, according to the type of specimen. Apart from that, they did not decipher any significant disturbances in oral salivary fungal diversity in relation to chemotherapeutic agent's administration (25).

The investigation carried out by Diaz *et al.* 2019 (29), detected some components of the oral biofilm that might influence the development of oral candidiasis, described in Table 3. *Candida* communities were significantly higher at baseline in patients that later developed oral candidiasis, being *Candida albicans*, *Candida Dubliniensis*, and *Candida glabrata* the most abundant (29).

On the other hand, Laheij *et al.* 2019 (26) structured their microbiome analyses dividing patients according to the development of ulcerative oral mucositis. They described a list of bacteria enrichments identified on each group at two different time points, as well as the main differences of augmented bacteria across the time. All these findings are detailed in Table 3.

Discussion

Oral mucositis in cancer treatment is a major issue and oral microbiome might play a key role in this process (30). Herein, any findings in this field might be useful in the pursuit of novel treatments or preventive methods for this condition (31). It may seem that the study of microbiota is a current trend however, the reality is different in the specific case of oral damage in patients undergoing systemic antineoplastics. Even though a considerable volume of articles were retrieved after applying the search strategy for the bibliography search, the majority were not suitable for inclusion. Many research articles were carried out using methods for microorganisms' detection that have been proven imprecise (32). Moreover, a big volume of the retrieved literature included children, and evidence of age-related changes in the oral microbiome composition led us to exclude them (33). Similarly, a large proportion of the studies focused on oral microflora of cancer patients receiving radiotherapy, this is probably due to the high incidence of oral mucositis in this type of population (7). However, our interest from a medical oncology per-

Table 4: Summary of cross-domain association networks interactions described by Robinson et al. (2020).

	Bacteria - Bacteria	Fungal - Fungal	Fungal - Bacteria
Baseline	*Fusobacterium– Alloprevotella*	***Malassezia – Candida*** *Fungi sp - Malasseziales sp*	*Ramularia – Haemophilus*
Pre-chemotherapy	*Acinetobacter – Stenotrophomonas* *Prevotellaceae [Unc00qrn] – Prevotella* *Alloprevotella - Prevotellaceae [Unid1919]* *Prevotellaceae [Unid1919] - Prevotella*	*Cladosporium – Pichia* *Cordyceps - Fungi sp.* ***Candida - Malassezia***	*Cladosporium – Stenotrophomonas* *Aspergillus – Fusobacterium* *Aspergillus – Alloprevotella* *Saccharomyces – Prevotellaceae* *Saccharomyces – Neisseria* *Meyerozyma – Acinobacter* *Meyerozyma – Stenotrophomonas* *Pichia – Campylobacter* *Ramularia - Capnocytophaga*
Post-antimicrobials	*Enterococcus – Prevotella* *Prevotellaceae [Unc00BMS] - Leptotrichia*		*Alternaria – Streptococcus* *Cladosporium – Rothia* *Saccharomyces – Mycoplasma* *Sporidiobolales sp. – Pseudomonas* *Fungi sp. – Lactobacillus* *Fungi sp. – Actinomyces* *Starmerella - Veillonella*

SPEIC-EASI (Sparse Inverse Covariace estimation for ecological association inference) determined associations between different microorganisms from the oral microbiota, classified according to the type of germs involved at different time points. Either positive (standard fount) and negative (bold fount) associations are specified.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

spective conducted us to reject those, and include only articles where subjects underwent chemotherapeutic agents, immunotherapy, or targeted therapies.

All the analysed articles had quite homogenic groups of cancer patients, in terms of age and gender. Regarding other aspects, no clinical or microbiological consensus was noted across them, for this reason, meta-analysis was not performed. Interestingly, we did not find studies on oral microbiome that focused on patients receiving immunotherapy alone or targeted therapies. This is probably due to a low incidence of mucosa damage in these types of regimes compared to others (34).

In terms of type of specimen, oral rinse was found to be the most representative of the whole oral cavity microbiome, while mucosa swab specimens showed limited outcomes restricted to the specific areas that they were collected from (35,36). Diversity in the way results were expressed within the analysed studies, lead us to consider that the relative abundance of each germ type would be the most appropriate measurement for a quantitative analysis. Having this data from all the included articles would allow us to obtain better evidence.

The emerged systematic review is framed within the limits of the five included articles which generated restricted results. Based on the application of eligibility criteria, we noted a lack of consensus on the protocols used to study this topic. Although only 5 were included, the heterogeneity and diversity in the ways results were expressed, as well as the different approaches, hinders comparisons among them. The prime limitations of this review are concerning the different methodologies used on each of the included articles. Firstly, the sample size does not seem to be sufficient to obtain clear results, only one of the studies included healthy controls and there were also a wide variety of cancer types, mixing solid tumours and haematological cancers, as well as plenty of different chemotherapeutic agents. The types of specimens are also a negative point, using whole saliva that has been previously described to be less accurate and representative of the whole oral microbiome than oral rinse (36). The focus of these studies was to analyse the microbiological aspects, leaving on one side most of the clinical information, which may be very relevant for healthcare providers such as oral mucositis assessment and toxic habits. In terms of outcomes, the lack of quantitative results that express relative abundances of each microorganism proportions makes it impossible to find similarities and discrepancies that can generate overall conclusions and focus on specific microorganisms that may be directly involved in oral mucositis development. The variety of results found are confusing and their interpretation requires a rather arduous task of deciphering.

- Conclusion and future insights

The aim of this research was to characterize shifts in the proportions of oral microbiome components that arise because of systemic antineoplastics treatment. The results reveal insufficient scientific evidence of oral microbiological changes in patients undergoing systemic antineoplastics. Subsequently, we foresee an investigation niche focused on deciphering those imbalances as well as possible interactions between oral microbiome and mucosa. Outcomes would help us to find possible biomarkers that allow identifying patients who are susceptible of developing oral mucositis, and either use or design novel preventive strategies or treatments that reduce the severity of this adverse event. In summary, research with an appropriate number of adult cancer patients undergoing systemic antineoplastics-based regimes, besides healthy controls, should be the aim in future studies. Oral rinse should be considered the most representative specimen type of the whole oral cavity-microbiome and outcomes should be expressed as relative abundance proportions of each microorganism. The analysis should, at least, include bacteria and fungi if virus study is not feasible.

References

References

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100:57-70.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71:209-49.
3. Wilson BE, Jacob S, Yap ML, Ferlay J, Bray F, Barton MB. Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study. Lancet Oncol. 2019;20:769-80.
4. Bashraheel SS, Domling A, Goda SK. Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. Biomed Pharmacother. 2020;125:110009.
5. Sonis ST. New thoughts on the initiation of mucositis. Oral Dis. 2010;16:597-600.
6. Peterson DE, Srivastava R, Lalla RV. Oral mucosal injury in oncology patients: perspectives on maturation of a field. Oral Dis. 2015;21:133-41.
7. Basile D, Di Nardo P, Corvaja C, Garattini SK, Pelizzari G, Lisanti C, *et al.* Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. Cancers (Basel). 2019;11:857.
8. Marcussen M, Sønderkær M, Bødker JS, Andersen M, Nielsen S, Vesteghem C, *et al.* Oral mucosa tissue gene expression profiling before, during, and after radiation therapy for tonsil squamous cell carcinoma. PLoS One. 2018;13:e0190709.
9. Villa A, Sonis ST. An update on pharmacotherapies in active development for the management of cancer regimen-associated oral mucositis. Expert Opin Pharmacother. 2020;21:541-8.
10. Pels EJ. Oral mucositis and saliva IgA, IgG and IgM concentration during anti-tumor treatment in children suffering from acute lymphoblastic leukemia. Adv Clin Exp Med. 2017;26:1351-8.
11. Napeñas JJ, Brennan MT, Bahrani-Mougeot FK, Fox PC, Lockhart PB. Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:48-59.
12. Mougeot JC, Stevens CB, Morton DS, Brennan MT, Mougeot FB. Oral Microbiome and Cancer Therapy-Induced Oral Mucositis. J Natl Cancer Inst Monogr. 2019;2019:lgz002.
13. Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

health. AIMS Microbiol. 2018;4:42-66.
14. Bunetel L, Tamanai-Shacoori Z, Martin B, Autier B, Guiller A, Bonnaure-Mallet M. Interactions between oral commensal Candida and oral bacterial communities in immunocompromised and healthy children. J Mycol Med. 2019;29:223-32.
15. Stringer AM, Logan RM. The role of oral flora in the development of chemotherapy-induced oral mucositis. J Oral Pathol Med. 2015;44:81-7.
16. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nat Rev Microbiol. 2018;16:745-59.
17. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. J Dent Res. 2010;89:1333-48.
18. Vanhoecke B, De Ryck T, Stringer A, Van de Wiele T, Keefe D. Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. Oral Dis. 2015;21:17-30.
19. Bowen J, Al-Dasooqi N, Bossi P, Wardill H, Van Sebille Y, Al-Azri A, *et al*. The pathogenesis of mucositis: updated perspectives and emerging targets. Support Care Cancer. 2019;27:4023-33.
20. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, *et al*. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. BMJ. 2021;372:71.
21. Aslam S, Emmanuel P. Formulating a researchable question: A critical step for facilitating good clinical research. Indian J Sex Transm Dis AIDS. 2010;31:47-50.
22. Peterson DE, Boers-Doets CB, Bensadoun RJ, Herrstedt J; ESMO Guidelines Committee. Management of oral and gastrointestinal mucosal injury: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. Ann Oncol. 2015;26:v139-51.
23. Mathes T, Pieper D. Clarifying the distinction between case series and cohort studies in systematic reviews of comparative studies: potential impact on body of evidence and workload. BMC Med Res Methodol. 2017;17:107.
24. Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. Eur J Epidemiol. 2010;25:603-5.
25. Hong BY, Sobue T, Choquette L, Dupuy AK, Thompson A, Burleson JA, *et al*. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. Microbiome. 2019;7:66.
26. Laheij AMGA, Raber-Durlacher JE, Koppelmans RGA, Huysmans MDNJM, Potting C, van Leeuwen SJM, *et al*. Microbial changes in relation to oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients. Sci Rep. 2019;9:16929.
27. Robinson S, Peterson CB, Sahasrabhojane P, Ajami NJ, Shelburne SA, Kontoyiannis DP, *et al*. Observational Cohort Study of Oral Mycobiome and Interkingdom Interactions over the Course of Induction Therapy for Leukemia. mSphere. 2020;5:e00048-20.
28. Galloway-Peña JR, Smith DP, Sahasrabhojane P, Wadsworth WD, Fellman BM, Ajami NJ, *et al*. Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients. Genome Med. 2017;9:21.
29. Diaz PI, Hong BY, Dupuy AK, Choquette L, Thompson A, Salner AL, *et al*. Integrated Analysis of Clinical and Microbiome Risk Factors Associated with the Development of Oral Candidiasis during Cancer Chemotherapy. J Fungi (Basel). 2019;5:49.
30. Reyes-Gibby CC, Wang J, Zhang L, Peterson CB, Do KA, Jenq RR, *et al*. Oral microbiome and onset of oral mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 2020;126:5124-36.
31. Chen C, Zhang Q, Yu W, Chang B, Le AD. Oral Mucositis: An Update on Innate Immunity and New Interventional Targets. J Dent Res. 2020;99:1122-30.
32. Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol. 2018;200:525-40.
33. Burcham ZM, Garneau NL, Comstock SS, Tucker RM, Knight R, Metcalf JL, *et al*. Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study. Sci Rep. 2020;10:2133.
34. Lacouture M, Sibaud V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. Am J Clin Dermatol. 2018;19:31-9.
35. Jo R, Nishimoto Y, Umezawa K, Yama K, Aita Y, Ichiba Y, *et al*. Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water. Sci Rep. 2019;9:16124.
36. Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, Soffritti I, Bassi C, Mazzacane S, *et al*. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. BMC Microbiol. 2020;20:120.

Funding
This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of interest
None declared.

Authors contributions
First and Second authors have participated equally. M.E.R.F and R.L.L. stablished the hypothesis. M.E.R.F and M.P.S. designed the project and stablished a framework in collaboration with G.B.C. and M.L.P.B. Bibliography review and data extraction was carried out by M.E.R.F. and L.A.C.B. with the assistance of M.P.S., in case of discrepancies. All authors provided critical feedback and helped shape the research, including data analysis and interpreting the results. The manuscript was written by M.P.S and M.E.R.F and format was applied accordingly.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.3 ARTÍCULO 3. Rodríguez-Fuentes, M. E., Pérez-Sayáns, M., Barbeito-Castiñeiras, G., Molares-Vila, A., Pena, I. B. P., Camolesi, G. V., & López-López, R. (2024). Oral specimens as a tool for accurate metagenomic analysis: A pilot study. Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery, 101991. Advance online publication.

Revista: Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery

Factor de impacto (JCR 2023): 1.8

Cuartil: Q2

Categoría: Dentistry, Oral Surgery & Medicine

Posición: 72/158

Tipo de licencia: Copyright © 2024 Autor(es). Publicado por Elsevier Masson SAS. Este es un artículo "*open-access*" o de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la "*Creative Commons CC-BY License*" (http://creativecommons.org/ licenses/by/4.0/), la cual permite uso no restringido, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre y cuando el trabajo original sea adecuadamente citado. No es necesario solicitar permiso para reutilizar este artículo.

Contribuciones de los autores:

- Manuel Eros Rodríguez-Fuentes: conceptualización, solicitud de aprobación del CEIC, extracción de datos, procesamiento de muestras y datos, ejecución de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

investigación, diseño de la metodología, redacción del manuscrito original, creación de gráficos, revisión y edición del manuscrito.

- Mario Pérez-Sayáns: conceptualización, extracción de muestras, administración del proyecto, revisión y corrección de manuscrito.
- Gema Barbeito Castiñeiras: optimización de la metodología de secuenciación, validación de protocolo de secuenciación, supervisión de la secuenciación, revisión del manuscrito.
- Alberto Molares Vila: procesamiento de datos crudos, análisis bioestadístico formal, uso de software de análisis de datos y obtención de financiación.
- Irene Prado-Pena: conceptualización, metodología y revisión del manuscrito.
- Gisela C.V. Camolesi: obtención de muestras de participantes, revisión del manuscrito.
- Rafael López López: conceptualización, adquisición de financiación, supervisión y revisión del manuscrito.

Enlace al artículo:

https://doi.org/10.1016/j.jormas.2024.101991

J Stomatol Oral Maxillofac Surg 000 (2024) 101991

Available online at ScienceDirect www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France EM|consulte www.em-consulte.com

Original Article

Oral specimens as a tool for accurate metagenomic analysis: A pilot study

Manuel Eros Rodríguez-Fuentes[a,b,#], Mario Pérez-Sayáns[a,b,#,*], Gema Barbeito-Castiñeiras[c], Alberto Molares-Vila[b,d], Irene B. Prado-Pena[a], Gisela C.V. Camolesi[a,b], Rafael López-López[a,e]

[a] Faculty of Medicine and Dentistry, Universidade de Santiago de Compostela, c/ Entrerríos s/n, Santiago de Compostela 15782, Spain
[b] Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS, ORALRES Group), Santiago de Compostela, A Coruña 15706, Spain
[c] Microbiology Unit, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña 15706, Spain
[d] Health Research Institute of Santiago de Compostela (IDIS, RESMET Group, https://resmet.org), Santiago de Compostela, A Coruña 15706, Spain
[e] Medical Oncology Unit, Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, A Coruña 15706, Spain

ARTICLE INFO

Article History:
Received 23 July 2024
Accepted 27 July 2024
Available online xxx

Keywords:
Metagenomics
Microbiota
Mouth
Mouth mucosa
Saliva

ABSTRACT

Objectives: Acute oral mucosal damage, as well as other inflammatory processes seem to be related to dysbiosis of the oral microbiome. The need to study changes in the oral microbiome led us to hypothesize what type of sample would provide the most representative picture of the entire human oral microbiome.
Materials and methods: An observational, and cross-sectional study was carried out. Six healthy adult participants provided 3 different sample types each, that included saliva, oral rinse and mucosal biopsy tissue. We performed 16S rRNA sequencing of the V3-V4 region of the 18 samples using Illumina MiSeq technology.
Results: Participants were 27 ± 6,3 years old. Bacterial alpha diversity was higher in oral rinse samples compared to whole unstimulated saliva and oral mucosa tissue (p = 0,005). However, saliva specimens showed a 56 % relative abundance of identified species followed by a 30 % in oral rinse and only 1 % in tissue samples.
Conclusions: This study found differences on oral microbiome composition for each type of sample. Oral rinse should be chosen when higher alpha diversity is needed, whereas whole unstimulated saliva should be more appropriate for larger amount of bacterial DNA.
Clinical relevance: The results obtained demonstrate the importance of a correct choice of the optimal type of oral sample for microbiome studies due to the differences found in its composition.

© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

1. Introduction

Acute oral mucosal damage is a frequently reported side effect in patients treated with systemic antineoplastic agents [1-2]. Its overall prevalence is 38,2 % [3], and its development is believed to have a multifactorial origin [4], where oral microbiota of the host seems to be a relevant component [5]. The study of changes in the oral microbiome composition may help to reveal certain biological mechanisms that may be amenable to intervention in order to prevent or treat this condition. This imbalance of the community structure of the microorganisms within the oral cavity is known as dysbiosis and appears to be closely related to local inflammatory processes [6]. The term oral microbiota refers to all microbes inhabiting the oral cavity including bacteria, fungi, archaea and viruses, meanwhile the oral microbiome also comprises their genes [2,5,7]. In most cases, the word microbiome is used imprecisely when meaning bacteriome, since it is the most studied and known of the biomes [5]. Although the oral microbiome is considered a single complex entity, evidence shows that its composition can substantially differ among oral anatomical locations within the same individual [8-9]. Multiple techniques have been used throughout the years to identify microorganisms; however Next Generation Sequencing has been accepted as the most reliable technology [5,10-12]. Within this method, shotgun metagenomics has proved to be useful when profiling taxonomic composition [13–14]. Despite the technological advances achieved so far, there are still difficulties in the taxonomic identification of the different species of microorganisms. Previous studies have analysed numerous types of samples from the oral cavity that include supra- and subgingival dental plaque; tongue, palate and retropharyngeal swabs, whole unstimulated saliva as well as oral rinse and mucosa [9,15-16]. Logical thinking leads us to believe that many of these samples, such as swabs and dental plaque, due to their method of collection, provide us with information on subpopulations of microorganisms. Nevertheless, acute oral mucosal damage onset might occur at any region of the oral cavity [1]. Hence, we designed a preliminary verification study to determine the optimal sample type to allow the most accurate metagenomic analysis.

* Corresponding author.
E-mail address: mario.perez@usc.es (M. Pérez-Sayáns).
First and Second authors have participated equally.

https://doi.org/10.1016/j.jormas.2024.101991
2468-7855/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Please cite this article as: M.E. Rodríguez-Fuentes, M. Pérez-Sayáns, G. Barbeito-Castiñeiras et al., Oral specimens as a tool for accurate metagenomic analysis: A pilot study, Journal of Stomatology oral and Maxillofacial Surgery (2024), https://doi.org/10.1016/j.jormas.2024.101991

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARTICLE IN PRESS
JID: JORMAS [m5G;August 1, 2024;22:59]

2. Material and methods

2.1. Study design and study population

This study was conceived as an observational, descriptive, and cross-sectional pilot study. Every participant was recruited at the Clinic of the Faculty of Dentistry by MPS. All the subjects were offered to participate, and those that met eligibility criteria were voluntarily enrolled. Inclusion criteria was as follows: healthy subjects who have not been diagnosed with or are not suffering from systemic diseases as well as not receiving treatments that alter the immune system [13]. All of them were ≥ 18 years old and able to understand and agreed to participate. On the other side, subjects could not enrol if they were receiving anticoagulants or antiaggregant, had previous allergic reaction to local anaesthetic drugs, were unable to comprehend the implications of the study, not willing to participate or unable to give written consent. Furthermore, subjects were not eligible if they performed oral washout or brushed their teeth 12 h prior to collecting the samples. Moreover, candidates with decrease overall saliva rate were also excluded.

Participants' data were collected and registered in a coded database to avoid their identification through personal information and to ensure privacy. Also, three different samples were taken from each subject following a strict order to minimize possible interferences in the specimens: First whole unstimulated saliva, second oral rinse, and lastly an oral mucosa biopsy. In order to reduce risks and unnecessary invasive techniques such as the extraction of oral mucosa biopsy in healthy people, we chose to select candidates who required extraction of a third molar for non-infectious causes.

The present research was approved by the Galician Ethics Committee of Clinical Research (Ref. No. 2020/552) and conducted in accordance with the guidelines for Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki. All participants signed the informed consent form.

2.2. Specimen's collection

Each subject agreed to provide three different biological specimens for the study. Unstimulated whole saliva was the first sample obtained from patients by leaning their heads forward and letting saliva flow towards a sterile empty Eppendorf sample container until reaching a volume of 5 mL. Next, participants were asked to rinse mouth with 5 mL of 0,9 % sodium chloride (NaCl) solution for 1 min [16], ensuring they reached every part of the oral cavity with it and finally spitting it into a sterile empty sample container without any other medium. Finally, a biopsy of the oral mucosa was aseptically extracted by an odontologist who infiltrated local anaesthesia in the chosen area of the participant's oral cavity, a 5 × 5 mm tissue sample was removed with a scalpel and the resulting incision was sutured with silk to stop bleeding and prevent future infection. The selected fragment corresponded to tissue adjacent to the gingiva of the third molar. These tissue samples were collected into a sterile sample container with 0,9 % sodium chloride to avoid drying out of the specimen. All samples were stored frozen at −80 °C from collection, as subjects were enrolled, until all samples were collected for simultaneous processing.

2.3. DNA extraction, quantification and purity assessment

The isolation of DNA from all samples was carried out by using Maxwell® RSC PureFood GMO and Authentication Kit (Cat.# AS1600, Promega Corporation, Madison, WI) adhering to the manufacturer's instructions. Liquid samples such as whole saliva and oral rinse were centrifuged prior to DNA extraction treatment to increase the concentration of genetic material. Once supernatant was discarded, samples were re-suspended in lysis buffer (1 ml of CTAB), subsequently samples were processed following the same protocol as tissue samples. For solid samples, 150 mg of tissue were placed into a conical tube and 1 ml of CTAB Buffer was added followed by homogenization with a disposable pestle for 40 s. Resulting liquid was then transferred into a Lysing Matrix E bead beating tube and vortexed for 30 s. Next, samples were taken to 95 °C for 10 min and cooled down during 1 min at room temperature and vortexed once again. Then, 40μl of Proteinase K and 20μl of RNase A were added and mixed using a vortex followed by incubation at 70 °C for 10 min. Consecutively, RSC cartridges were prepared and placed in the rack according to manufacturer. Elution tubes with samples were filled with 100μl of Elution Buffers and placed in cartridge to, finally, run Maxwell® RSC with the PureFood GMO and Authentication Protocol. Extracted DNA samples were stored at −20 °C until further processing.

DNA concentrations were measured using the QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) on a Quantus® fluorometer (Promega Corporation). In addition, purity was also evaluated as previously described [17]. DNA samples were frozen at −20 °C until further processing.

2.4. Library construction and 16S rRNA gene sequencing

Library generation was carried out through amplification of the V3 - V4 region of the 16S ribosomal RNA gene. Sequencing was performed on an Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA) using the MiSeq v3 reagent kit. All samples were randomized and normalized to 5 ng/μL with PCR-grade water. Amplicons of approximately 460 bp were generated using primers from Integrated DNA Technologies, Inc. flanked by Illumina overhang adapters (Forward overhang: 5′TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG; Reverse overhang: 5′GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG.). The first PCR was carried out using a 25 μL reaction consisting of 5 ng/μL template DNA from 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, USA). The thermal cycler was set as follows: 95 °C (3:00) + [95 °C(0:30) + 55 °C(0:30) + 72 °C(0:30)] x 25 cycles + 72 °C (5:00) and holding at 4 °C. For the second round of PCR, we added Illumina sequencing adapters as well as dual-index barcodes were added in a 50 μL PCR reaction from 5 μL of amplicon PCR product for 8 cycles using 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix using the same parameters [17].

Database used was Silva version 138_99. Illumina sequencing raw data are available in the BioStudies database (https://www.ebi.ac.uk/biostudies/) under accession number S-BSST1150.

2.5. Microbiome and statistical analysis

The sequencing data generated from the Illumina MiSeq sequencer was analyzed adhering to the methodology described in the literature [17–24] using the following software: BaseSpace Sequence Hub version: 7.11.0; Python version: 3.8.13; QIIME 2 version: 2022.2.0 [19]; q2cli version: 2022.2.0; FastQC v0.11.9 [20]; fastp 0.23.2 [21]; cutadapt 3.7 [22]; multiqc, version 1.12 [24].

2.6. Bioinformatic quality control measures

FastQC was carried out with default flags. Cutadapt was used to remove forward TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG and reverse GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC primers from sequences to analyze, following suggestions from Illumina 16S Metagenomics Sequencing Workflow (https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/16s-metagenomics-faq-1270−2014−003.pdf), and rest of default flags.

Fastp was carried out with cutadapt output files and following flags (the rest are by default): trim_poly_x (enable polyX trimming in 3′ ends); cut_front –cut_tail (cutting extremes 5′ and 3′ of sequence,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

drop the bases in the window if its mean quality < threshold, stop otherwise); cut_mean_quality=15 (the mean quality requirement option shared by cut_front and cut_tail); length_required=220 (reads shorter will be discarded); qualified_quality_phred=15 (means phred quality >=Q15 is qualified); unqualified_percent_limit=40 (40 % of bases are allowed to be unqualified). Alpha-rarefaction, from Qiime 2 tool, was used with flags by default.

3. Results

3.1. Characteristics of the study cohort

This pilot study included 6 participants (4 female and 2 male) with a mean age of 27 ± 6,3 years. Other sociodemographic data of the subjects are shown in Table 1. All of them were healthy subjects with caries, however none of them suffered from periodontitis, had implants, prosthetic teeth or were diagnosed with any medical condition of the gastrointestinal tract. Only 2 (33,33 %) of them were current smokers (of 5 cigarettes daily) at that time. In addition, 4 (66,67 %) out of the 6 participants had received systemic antibiotics a mean of 578,75 (± 475,27) days prior to enrolment, therefore this is not expected to alter the results of the oral microbiome analysis. Antibiotic treatments received by the participants are also displayed on Table 1.

3.2. Sequence reads and composition of the salivary microbiome

Each participant provided 3 samples, which means that the study comprised 18 specimens (Supplementary Table 1). The quality control analysis performed demonstrates that nearly all reads of the samples were in the range between 30 (0.1 % reading errors) and 40 (0.01 % reading errors) on the Phred Score Scale (Fig. 1a and Fig. 1b).

3.3. Quantitative metagenomic data

The mean of total reads in saliva samples was 265,452 ± 507,833,57 while in oral rinse was 209,772 ± 382,954,80 and in tissue specimens 57,936,17± 27,466,13 as detailed in Table 2. Saliva was the type of sample where a higher mean number of species were identified (638,00 ± 559,99), followed by oral rinse (618,17 ± 426,2) and lastly by tissue samples (404,67 ± 125,42).

According to phylum level, *Firmicutes* were the most abundant microorganism throughout all the specimens (55,57% in saliva, 55,25 % in oral rinse and 34,35 % in oral mucosa). *Bacteroidetes* were the second most abundant phylum (18,25 %) in saliva samples followed by *Actinobacteria* (13,4 %). However, *Actinobacteria* (15,54 %) and *Bacteroidetes* (13,08 %) rank second and third in terms of oral rinse abundance. Whereas 12,68 % of oral mucosa bacteria were unclassified at phylum level and 14,71 % were *Fusobacteria* (14,71 %) as shown in Supplementary Figure 1.

Focusing on the lowest taxonomic category, illustrated in Supplementary Figure 2, we found that in saliva samples the highest percentage were unclassified species (35,86 %) followed by *Rothia mucilaginosa* (5,81 %), *Granulicatella adiacens* (5,09 %), *Prevotella melaninogenica* (4,43 %) and *Actinomyces odontolyticus* (3,42 %). In oral rinse 39,23 % were unclassified, 5,36 % *Rothia mucilaginosa*, 3,65 % *Actinomyces odontolyticus*, 2,96 % *Gemella sanguinis* and 2,73 % *Streptococcus salivarius*. On the other hand, 43,76 % of species in tissue samples were unclassified, 2,65 % *Rothia mucilaginosa*, 0,79 % *Granulicatella adiacens*, 0,54 % *Porphyromonas pasteri* and 0,36 % *Prevotella melaninogenica*.

The data for the other classification levels are detailed in Table 2. In addition, graphical representations have been made, considering the five major components in each type of sample as well as their respective percentages in the other samples, at the class (Supplementary Figure 3), order (Supplementary Figure 4), family (Supplementary Figure 5) and genus levels (Supplementary Figure 6).

3.4. OTUs analyses of all samples were adequate

First, bacterial species count revealed that half of the samples (9 out of 18) contained between 0 and 300 Operational Taxonomic Units (OTUs). Three samples contained more than 1200 OTUs, 2 samples had between 600 and 900 OTUs and only 1 sample had 900–1200 OTUs as shown in Supplementary Figure 7. Data analysis led us to exclude 3 samples (S2, S3 and OR1) from the study because OTUs features could not be identified in them (Supplementary Figure 8).

In order to evaluate sequencing depth, a rarefaction plot [23,25] was built. Fig. 2 reflects that, although not all the types of specimens

Table 1
Socio-demographic and clinical cohort data.

Subjects		S1	S2	S3	S4	S5	S6	TOTAL	
								Mean (±SD)	%
Gender		F	M	F	F	M	F		66,67 (F), 33,33 (M)
Age		29	35	30	18	21	29	27(± 6,29)	
Marital status (single)		X	X	X	X	X	X		100
Occupation	Student	X			X	X			50
	Unemployed		X						16,67
	Worker			X			X		33,33
Education	Primary		X	X	X		X		66,67
	College	X				X			33,33
Smoker		X			X				33,33
Numb. Cig/day		5			5			5 (± 0)	
Caries		X	X	X	X	X	X	X	100
Periodontitis									0
implants									0
Prosthetic dental pieces									0
Active drug treatment		X		X					33,33
Type of drug treatment		Allergy shots		Anxiolytics; oral contraceptive					
Gastrointestinal (GI) Tract Medical Conditions									0
Systemic antibiotic use		X		X		X	X		66,67
Time from antibiotics (days)		383		252		1285	395	578,75 (± 475,27)	
Type of antibiotic		Amoxicillin trihydrate, potassium clavulanate		Amoxicillin		Levofloxacin	Amoxicillin		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARTICLE IN PRESS
JID: JORMAS [m5G;August 1, 2024;22:59]
M.E. Rodríguez-Fuentes, M. Pérez-Sayáns, G. Barbeito-Castiñeiras et al. Journal of Stomatology oral and Maxillofacial Surgery 00 (2024) 101991

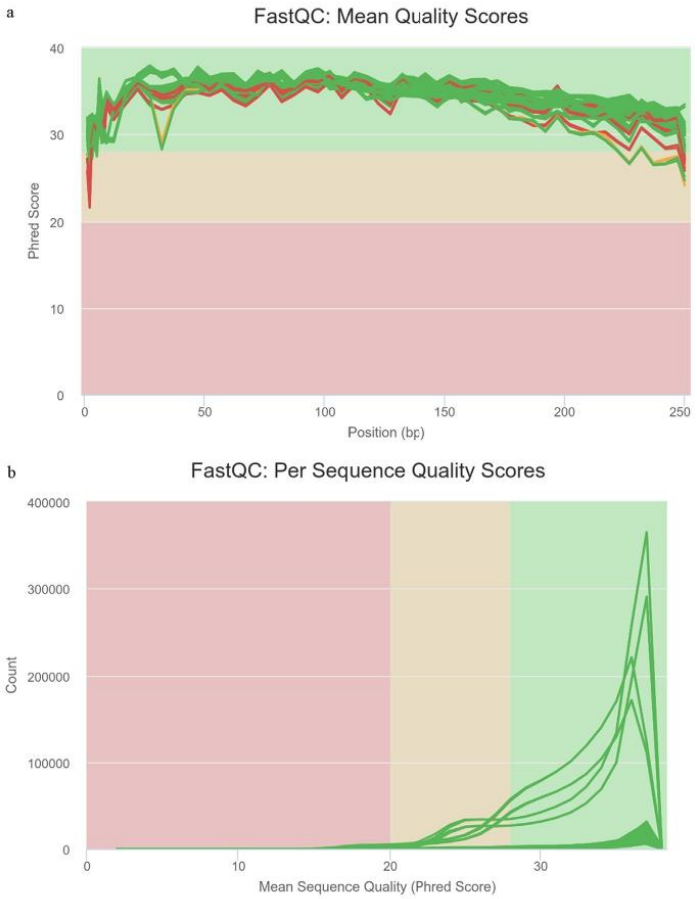


Fig. 1. Quality control analysis of the sequencing reads. a. FastQC: Mean Quality Score. The analysis shows that almost all sequencing reads were between 30 (0,1 % reading error) and 40 (0,01 % reading error) on the Phred Score Scale according to the number of base pairs. b. FastQC: Per Sequence Quality Scores. The analysis shows that almost all sequencing reads were between 30 (0,1 % reading error) and 40 (0,01 %) on the Phred Score Scale according to the sequencing read counts.

have the same number of reads, each one of them reached a *plateau*, that indicates an adequate sequencing depth. Thus, it was observed that from 30 reads on, the quality of the samples was comparable.

Fig. 3 shows the relative frequency of OTUs distribution on each sample. Regarding tissue samples, DNA from 4 out of 6 samples could not be assigned to any specific bacterial species and the remaining two contained less than 10 % of DNA from known bacterial species. Only 1 out of 4 saliva samples had 100 % relative frequency of known bacterial species, 2 samples contained 50–60 % of known bacterial species' DNA and 1 sample contained purely unassigned bacterial DNA. Three out of 5 oral rinse samples were optimal (100 % known OTUs), one contained >35 % and only 1 of the samples had 100 % unassigned bacterial DNA.

3.5. Alpha diversity was higher in oral rinse samples

The complete phylogenetic analysis of all processed samples resulted in the circular cladogram displayed in Fig. 4a Subsequently, a Krona chart [26] was constructed for each type of specimen, aiming to exhibit the differences of the microbiome composition among them (Fig. 4b shows saliva analysis, Fig. 4c illustrates composition of oral rinse samples, and Fig. 4d represents tissue sample data). The information obtained manifests that about 44 % of bacteria in the saliva samples belongs to unassigned species, whereas in oral rinse samples this percentage is 70 %, reaching 99 % in tissue biopsy specimens.

We next examined alpha diversity by using Simpson's Index [27] which showed a p-value=0,005. Thus, a statistically significant difference was found between the alpha diversity of oral rinse versus unstimulated saliva and tissue biopsy (Fig. 5). Herein, bacterial alpha diversity is higher in oral rinse samples.

4. Discussion

Despite the large number of studies published on the oral microbiome to date, there is still no clear evidence to determine the optimal type of oral sample for an adequate analysis of alterations in its composition, and this is where the novelty of this study lies.

Considering the results obtained, we ought to expect low percentages of known bacterial species (<1 %) in oral mucosal tissue samples. Beforehand, this seems consistent with current knowledge, since it is known that most of the germs of the oral flora are simply

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 2
Quantitative sequencing data from germs that constituted the five most abundant for each type of sample. Raw data obtained prior to processing for statistical quality purposes.

Type of sample	Saliva (Mean ± SD)	Oral rinse (Mean ± SD)	Tissue (Mean ± SD)
Number of Species Identified	638,00 ± 559,99	618,17 ± 426,2	404,67 ± 125,42
Total reads	265,452 ± 507,833,57	209,772 ± 382,954,80	57,936,17± 27,466,13
% of total Kingdom reads	99,95 ± 0,02	99,93 ± 0,13	87,64 ± 10,51
% of total Phylum reads	99,69 ± 0,1	99,65 ± 0,08	87,32 ± 10,4
% of total Class reads	98,41 ± 2,46	99,43 ± 0,12	87,10 ± 10,31
% of total Order reads	99,33 ± 0,15	99,33 ± 0,14	87,03 ± 10,33
% of total Family reads	98,99 ± 0,24	98,97 ± 0,19	86,34 ± 10,99
% of total Genus reads	98,24 ± 0,49	98,14 ± 0,56	85,22 ± 11,28
% of total Species reads	64,14 ± 4,24	60,77 ± 8,79	56,25 ± 20,27
% of Taxonomic_bacteria	99,95± 0,02	99,91 ± 0,05	87,61 ± 10,49
% of Taxonomic unclassified	0,05 ± 0,02	0,09 ± 0,05	12,36 ± 10,51
% of Taxonomic *Archaea*	0,00	0,00	0,14
% of Phylum *Firmicutes*	55,57 ± 5,27	55,25 ± 12,33	34,35 ± 20,11
% of Phylum *Bacteroidetes*	18,25 ± 5,52	13,08 ± 6,13	10,97 ± 7,19
% of Phylum *Fusobacteria*	5,30 ± 2,63	5,91 ± 6,03	14,71 ± 8,55
% of Phylum *Proteobacteria*	4,79 ± 2,83	7,65 ± 5,22	8,84 ± 7,4
% of Phylum *Actinobacteria*	13,40 ± 5,48	15,51 ± 7,09	11,14 ± 4,68
% of Phylum *Candidatus Saccharibacteria*	1,40 ± 0,99	1,30 ± 0,75	3,75 ± 4,54
% of Phylum *Absconditabacteria (SR1)*	0,32	0,19 ± 0,21	
% of Phylum *Unclassified*	0,31 ± 0,1	0,36 ± 0,08	12,68 ± 10,4
% of Phylum *Spirochaetes*	0,67 ± 0,73	0,78 ± 0,58	2,92 ± 3,56
% of Class unclassified	1,82 ± 1,35	2,09 ± 0,79	19,88 ± 10,81
% of Class *Bacilli*	43,95 ± 4,93	44,01 ± 11,95	26,83 ± 24,13
% of Class *Bacteroidia*	16,61 ± 5,48	11,19 ± 5,16	8,89 ± 6,13
% of Class *Fusobacteria*	5,30 ± 2,63	6,83 ± 6,25	14,71 ± 8,55
% of Class *Betaproteobacteria*	2,24 ± 1,05	4,46 ± 2,46	3,82 ± 3,88
% of Class *Clostridia*	4,49 ± 1,85	4,16 ± 2,14	7,42 ± 5,01
% of Class *Actinobacteria*	13,42 ± 5,5	15,51 ± 7,09	11,14 ± 4,68
% of Class *Negativicutes*	6,20 ± 4,63	6,83 ± 4,97	5,77 ± 3,38
% of Class *Gammaproteobacteria*	4,08 ± 1,48	3,58 ± 2,4	14,57
% of Order *Lactobacillales*	39,11 ± 3,78	37,91 ± 11,69	21,27 ± 24,36
% of Order *Bacteroidales*	16,61 ± 5,48	11,19 ± 5,16	8,21 ± 6,33
% of Order *Actinomycetales*	12,36 ± 5,75	14,22 ± 6,87	8,24 ± 5,79
% of Order *Selnomonadales*	6,20 ± 4,63	5,69 ± 4,97	4,81 ± 3,38
% of Order *Fusobacteriales*	5,30 ± 2,63	5,70 ± 6,25	14,71 ± 8,55
% of Order *Bacillales*	2,11 ± 0,32	2,19 ± 2,45	
% of Order *Clostridiales*	3,89 ± 1,97	3,15 ± 2,41	6,15 ± 4,99
% of Family *Streptococcaceae*	33,19 ± 6,34	33,86 ± 11,37	19,08 ± 20,89
% of Family *Prevotellaceae*	11,43 ± 5,05	7,96 ± 3,82	2,13 ± 0,57
% of Family *Micrococcaceae*	6,15 ± 5,67	7,47 ± 5,83	14,17
% of Family Unclassified			14,85 ± 10,37
% of Family *Carnobacteriaceae*	5,58 ± 2,66	2,58 ± 1,1	
% of Family *Veillonellaceae*	5,4 ± 4,6	5,69 ± 4,97	4,81 ± 3,38
% of Family *Bacillales Incertae Sedis XI*	3,74 ± 2,3	5,31 ± 3,82	
% of Family *Fusobacteriaceae*	1,77 ± 0,3	2,81 ± 6,22	9,38 ± 5,91
% of Family *Porphyromonadaceae*	4,93 ± 2,06	2,34 ± 0,67	5,01 ± 3,04
% of Genus *Streptococcus*	33,16 ± 6,40	33,81 ± 11,36	15,19 ± 15,50
% of Genus *Prevotella*	10,67 ± 4,40	7,61 ± 3,71	2,04 ± 0,67
% of Genus *Granulicatella*	5,54 ± 2,65	2,55 ± 1,08	
% of Genus *Fusobacteria*	1,76 ± 0,3	2,80 ± 6,2	9,36 ± 5,9
% of Genus *Veillonella*	4,86 ± 3,77	4,40 ± 4,25	
% of Genus *Actinomyces*	4,39 ± 1,05	5,19 ± 1,96	2,14 ± 1,27
% of Genus *Rothia*	3,87 ± 5,57	6,04 ± 4,72	2,34
% of Genus *Gemella*	4,06 ± 2,57	6,01 ± 3,54	
% of Genus Unclassified			14,78 ± 11,28
% of Genus *Leptotrichia*			4,3 ± 4,11
% of Species Unclassified	35,86 ± 4,24	39,23 ± 8,79	43,76 ± 20,27
% of Species *Granulicatella adiacens*	5,09 ± 2,58	2,28 ± 0,92	0,79 ± 1,26
% of *Prevotella melaninogenica*	4,43 ± 2,05	2,22 ± 1,41	0,36
% of Species *Porphyromonas pasteri*	2,99 ± 0,57	1.07 ± 1,42	0,54
% of Species *Actinomyces odontolyticus*	3,42 ± 0,48	3,65 ± 1,88	
% of Species *Gemella sanguinis*	2,35 ± 2,15	2,96 ± 3,33	0,12
% of Species *Gemella haemolysans*	2,15 ± 0,83	1,61 ± 0,57	
% of Species *Streptococcus salivarius*	1,89 ± 5,61	2,73 ± 6,1	
% Species *Rothia mucilaginosa*	5,81 ± 5,43	5,36 ± 4,51	2,65 ± 8,11

found in the oral biofilm lining the mucous membranes, therefore the rest of the sample tissue should presumably be bacteria free thanks to the protective function of the oral epithelium [28]. Thus, most DNA extracted from the sample should belong to the host and not to commensal microorganisms [29].

On the other hand, liquid samples like saliva and oral rinse have turned out to be quite different from each other. Saliva showed a 56 % relative abundance of identified species versus a 30 % found in oral rinse. In addition to this finding, it has been spotted that oral rinse statistically differed from saliva and tissue in terms of alpha

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ARTICLE IN PRESS
JID: JORMAS [m5G;August 1, 2024;22:59]
M.E. Rodríguez-Fuentes, M. Pérez-Sayáns, G. Barbeito-Castiñeiras et al. Journal of Stomatology oral and Maxillofacial Surgery 00 (2024) 101991

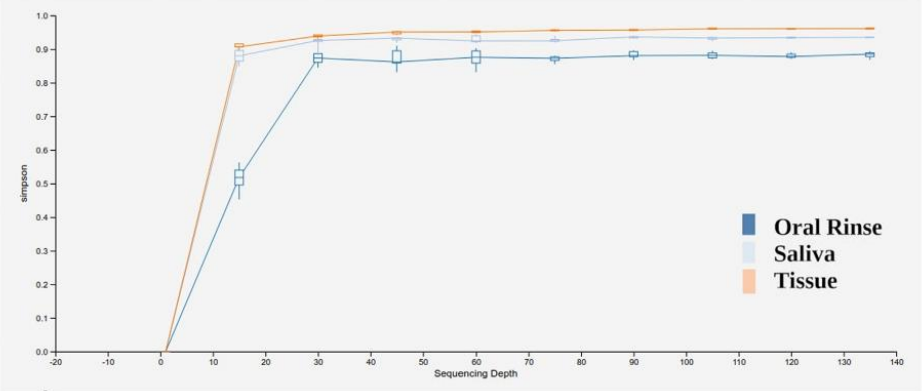


Fig. 2. Rarefaction curve plot. Simpson's Index analysis shows that from 30 reads on, the quality of the samples was comparable.

diversity, and therefore a higher microbial diversity was acknowledged. One of the hypotheses generated about this topic consists of the possibility that, the sample acquisition technique used for oral rinse may drag bacteria inhabiting different anatomical locations of the oral cavity. This phenomenon may not happen when obtaining unstimulated saliva as it simply flows, without stimulation, from the mouth into the sample collection container by gravity. In addition, the higher α diversity found in oral rinse within our study, compared to other specimens, also match previous investigations where oral rinse diversity was superior to heterogeneity detected with swabs collected from lesion and non-lesion sites [30]. Additionally, previous research has concluded that sample handling and processing can significantly affect the relative abundance of the identified microorganisms [31].

With regard to oral microbiome composition and given that our results showed superiority of saliva and oral rinse samples against mucosal tissue specimens, we compared our raw data with previously published studies. The main bacterial phyla identified in saliva samples were *Firmicutes* (55,57 %) similar to previous studies where authors identified 50–60 % [31]. The amount of *Bacteroidetes* differed in their relative abundance from our study (18,25 %) compared to <10 % in previous studies [32]. *Actinobacteria* relative abundance was slightly superior in our results (13,4 %) compared to a relative abundance close to 10 % in the literature [32]. *Fusobacteria* relative abundance was also comparable to previous results (5,30 %). Another study from the field identified the top five abundant genera in saliva samples to be *Prevotella, Neisseria, Streptococcus, Haemophilus* and *Rothia* [15] while in our results *Streptococcus, Prevotella, Granulicatella, Veillonela* and *Actinomyces* lead the ranking. In the case of oral rinse samples researchers found *Streptococcus, Prevotella, Neisseria, Haemophilus* and *Rothia* to constitute the majority of the genera [15], whereas we determined *Streptococcus, Prevotella, Rothia, Gemella* and *Actinomyces* to be the most prevalent genera in oral rinse samples.

Depending on the type of study we are planning to carry out, one sample is likely to be more appropriate than the other. In cases where we care about having a larger number of identified OTUs we would opt for a saliva sample, whereas if we are interested in analyzing more diverse populations of the oral biofilm, oral rinse would be the best choice. Knowing the best practice for oral bacteriome analysis and deciding the optimal specimen is fundamental when designing

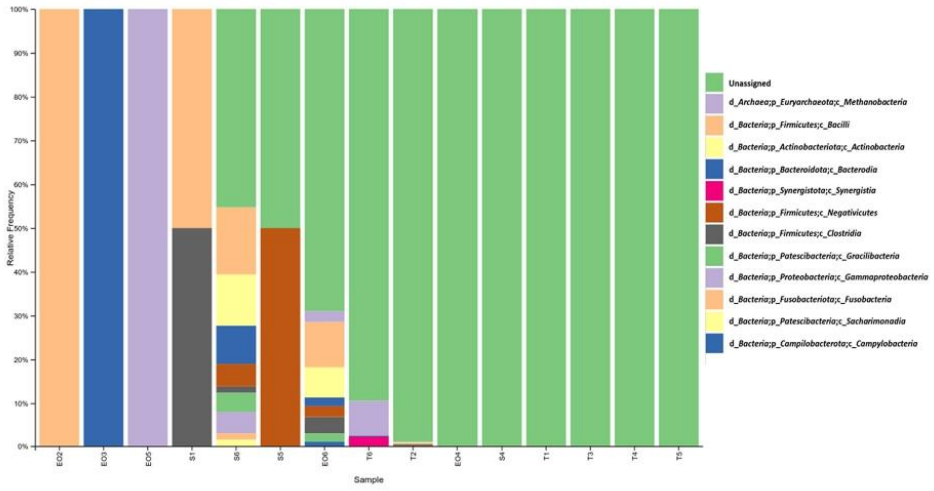


Fig. 3. Stacked bar plots represent the relative abundance at species level for each sample. Three samples were excluded due to DNA concentration insufficiency.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fig. 4. Phylogenetic analysis. a. Cladogram: Complete phylogenetic tree obtained from all the samples analyzed of the study population. b. Krona diagram of saliva samples at genus level. 44 % of the genetic material could not be assigned to any specific taxa. c. Krona diagram of oral rinse samples at genus level. 70 % of the genetic material could not be assigned to any specific taxa. d. Krona diagram of oral mucosal tissue samples at domain level. 99 % of the genetic material could not be assigned to any specific taxa.

an oral microbiome research study [33]. Our results support the importance of how selecting one sample type or another will reveal very diverse information and so results and conclusions would also substantially differ. Therefore, all studies should consider the relevance of the type of specimen when designing an investigation protocol that aim to study changes in the oral microbiome composition associated with local or systemic pathologies [16,34-36], as well as undesired effects associated with treatments [37].

The characteristics of this study, inherent to its conception and design, imply various limitations, therefore, the results should be taken with caution. We are aware that 6 subjects are a very small sample size. However, our aim is to expand this study in the near

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

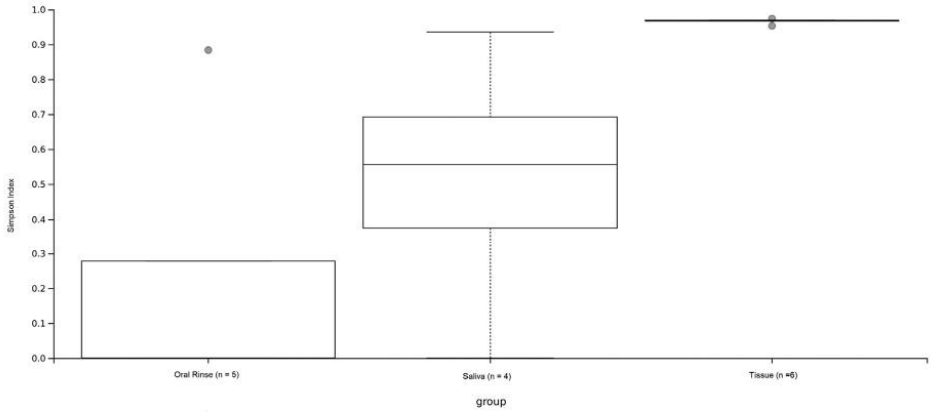


Fig. 5. Alpha diversity analysis: Box plot representing the Simpson's index for each type of sample. Box plots depict median (central horizontal line), 1st quartile and 3rd quartile, and outliers. Statistically significant difference between the alpha diversity of oral rinse and saliva samples (p-value 0,005). Oral rinse showed a superior alpha diversity.

future by recruiting a larger number of participants, so that more reliable conclusions can be drawn. This will also allow us to carry out a statistical analysis of clinical and socio-demographic characteristics of the patients that might be correlated with differences in the populations of microorganisms of the oral flora.

Having to discard 3 samples, for not being able to identify genetic characteristics attributable to bacterial taxonomic units, makes us think that some inaccuracy may have been occurred during samples' processing. Despite the quality analysis performed in terms of the reading depth, misleading in sample handling or treatment may have resulted in the loss of genetic information from specimens that subsequently had to be excluded from the study. Furthermore, these errors may have been accentuated because of the limited experience, given that these are unconventional techniques in a hospital environment due to the lack of clinical usefulness. Also, it is remarkable that there is a high percentage of genetic material that could not be assigned to any known bacterial species among the samples in which genetic features were identified. This fits with the fact that in our results we miss some of the main members of the oral microbiome such as *Streptococcus mitis* species [38] or *Neisseria* and *Haemophilus* genus [15]. This makes us wonder whether there are still technical limitations that may be attributable to an unoptimized or debugged protocol from the commercial companies, the specificity of the reagents and primers [13,18,31], or either a general lack of knowledge about the species that comprise the human oral microbiome [7,36]. The knowledge about the oral microbiome is increasing by leaps and bounds in recent years and, considering that our research was conducted in 2020, we can anticipate some barriers. For instance, recent investigations showed a superiority of V1-V2 sequencing in oral samples versus our method that aimed the V3-V4 region [38]. Besides the limitations of this study, we should also state that the specificity of the technology used in our study is higher than other methods that were traditionally used for bacterial identification such as culturing [7]. Nevertheless, the possibility that our observations were biased due to methodological limitations cannot be excluded.

The need to determine the optimal specimen for the oral microbiome analysis, justifies this research. This pilot study provides a basis for future research on the human oral microbiome. The differences found in the results obtained about microbiome on each sample type support the relevance of choosing an appropriate sample prior to carrying out an investigation of the oral microbiome. Depending on the objectives of the study, one sample should be more appropriate than another as a source of microbial DNA. Thus, oral rinse would be the best option in cases were a wider alpha diversity is needed, whereas whole unstimulated saliva would be more convenient in situations where a larger amount of bacterial genetic material is required.

Ethics approval statement

The present research was approved by the Galician Ethics Committee of Clinical Research (Ref. No. 2020/552) and conducted in accordance with the guidelines for Good Clinical Practice and the Declaration of Helsinki. All participants signed the informed consent form.

Financial interests

The authors declare they have no financial interests.

Funding

Molares-Vila. A. is supported by a fellowship co-funded by the State Investigation Agency from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) through the procedure file "PTA2021-019927-I" and by the European Social Fund+. No other funds, grants or support was received for conducting this study.

Data availability

The data that support the findings of this study are not openly available due to reasons of sensitivity and are available from the corresponding author upon reasonable request. Data are located in controlled access data storage in the Microbiology Unit of the Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela.

Declaration of competing interest

None

CRediT authorship contribution statement

Manuel Eros Rodríguez-Fuentes: Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Mario Pérez-Sayáns:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Writing –

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

review & editing. **Gema Barbeito-Castiñeiras:** Methodology, Validation, Writing – review & editing. **Alberto Molares-Vila:** Data curation, Formal analysis, Methodology, Software, Visualization, Funding acquisition. **Irene B. Prado-Pena:** Conceptualization, Methodology. **Gisela C.V. Camolesi:** Data curation, Investigation, Methodology. **Rafael López-López:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jormas.2024.101991.

References

[1] Ji L, Hao S, Wang J, Zou J, Wang Y. Roles of toll-like receptors in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis: a concise review. Front Cell Infect Microbiol 2022;12:831387 Published 2022 Jun 2. doi: 10.3389/fcimb.2022.831387.
[2] Zagury-Orly I, Khaouam N, Noujaim J, Desrosiers MY, Maniakas A. The effect of radiation and chemoradiation therapy on the head and neck mucosal microbiome: a Review. Front Oncol 2021;11:784457 Published 2021 Dec 2. doi: 10.3389/fonc.2021.784457.
[3] Rodríguez-Fuentes ME, Pérez-Sayáns M, Carreras-Presas CM, Marichalar-Mendia X, Bagán-Debón L, López-López R. Prevalence of acute oral mucosal damage secondary to the use of systemic antineoplastics: a systematic review and meta-analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2023;135(3):385–95. doi: 10.1016/j.oooo.2022.11.016.
[4] Shetty SS, Maruthi M, Dhara V, et al. Oral mucositis: current knowledge and future directions. Dis Mon 2022;68(5):101300. doi: 10.1016/j.disamonth.2021.101300.
[5] Girija ASS, Ganesh PS. Functional biomes beyond the bacteriome in the oral ecosystem. Jpn Dent Sci Rev 2022;58:217–26. doi: 10.1016/j.jdsr.2022.05.002.
[6] Elias-Oliveira J, Leite JA, Pereira ÍS, et al. NLR and intestinal dysbiosis-associated inflammatory illness: drivers or dampers? Front Immunol 2020;11:1810. Published 2020 Aug 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.01810.
[7] Zhang JS, Chu CH, Yu OY. Oral Microbiome and Dental Caries Development. Dent J (Basel) 2022;10(10):184. Published 2022 Sep 30. doi: 10.3390/dj10100184.
[8] Hong BY, Sobue T, Choquette L, et al. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. Microbiome 2019;7(1):66. Published 2019 Apr 25. doi: 10.1186/s40168-019-0679-5.
[9] Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nat Rev Microbiol 2018;16(12):745–59. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.
[10] Mougeot JC, Stevens CB, Morton DS, Brennan MT, Mougeot FB. Oral Microbiome and Cancer Therapy-Induced Oral Mucositis. J Natl Cancer Inst Monogr 2019;2019(53) lgz002. doi: 10.1093/jncimonographs/lgz002.
[11] Saito S, Aoki Y, Tamahara T, et al. Oral microbiome analysis in prospective genome cohort studies of the Tohoku Medical Megabank Project. Front Cell Infect Microbiol 2021;10:604596 Published 2021 Jan 29. doi: 10.3389/fcimb.2020.604596.
[12] Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. Arch Microbiol 2018;200(4):525–40. doi: 10.1007/s00203-018-1505-3.
[13] Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, et al. Best practices for analysing microbiomes. Nat Rev Microbiol 2018;16(7):410–22. doi: 10.1038/s41579-018-0029-9.
[14] Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis [published correction appears. Nat Biotechnol 2017;35(9):833–44. doi: 10.1038/nbt.3935.
[15] Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. BMC Microbiol 2020;20(1):120. Published 2020 May 18. doi: 10.1186/s12866-020-01801-y.
[16] Zhu XX, Yang XJ, Chao YL, et al. The potential effect of oral microbiota in the prediction of mucositis during radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. EBioMedicine 2017;18:23–31. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.02.002.
[17] McGaughey KD, Yilmaz-Swenson T, Elsayed NM, et al. Comparative evaluation of a new magnetic bead-based DNA extraction method from fecal samples for downstream next-generation 16S rRNA gene sequencing [published correction appears in PLoS One. 2019 Feb 19;14(2):e0212712]. PLoS ONE 2018;13(8):e0202858 Published 2018 Aug 23. doi: 10.1371/journal.pone.0202858.
[18] Kim YT, Jeong J, Mun S, Yun K, Han K, Jeong SN. Comparison of the oral microbial composition between healthy individuals and periodontitis patients in different oral sampling sites using 16S metagenome profiling. J Periodontal Implant Sci 2022;52(5):394–410. doi: 10.5051/jpis.2200680034.
[19] Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nat Biotechnol 2019;37:852–7. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9.
[20] Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc
[21] Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 2018;34(17):i884–90. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
[22] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. EMBnet.journal 2011;17(1):10–2. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
[23] Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, Amir A, Bittinger K, Gonzalez A, Lozupone C, Zaneveld JR, Vázquez-Baeza Y, Birmingham A, Hyde ER, Knight R. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. Microbiome 2017;5(1):27. doi: 10.1186/s40168-017-0237-y.
[24] Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics 2016;32(19):3047–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354.
[25] Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics 2011;12:385. Published 2011 Sep 30. doi: 10.1186/1471-2105-12-385.
[26] Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol 2007;62(2):142–60. doi: 10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
[27] Brizuela M, Winters R. Histology, oral mucosa. Treasure Island (FL): StatPearls; 2023 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572115/ Accessed 8 May 2023.
[28] Bruggeling CE, Garza DR, Achouiti S, Mes W, Dutilh BE, Boleij A. Optimized bacterial DNA isolation method for microbiome analysis of human tissues. Microbiologyopen 2021;10(3):e1191. doi: 10.1002/mbo3.1191.
[29] Shitozawa Y, Haro K, Ogawa M, Miyawaki A, Saito M, Fukuda K. Differences in the microbiota of oral rinse, lesion, and normal site samples from patients with mucosal abnormalities on the tongue. Sci Rep 2022;12(1):16839. Published 2022 Oct 7. doi: 10.1038/s41598-022-21031-8.
[30] Liu F, Lu H, Dong B, et al. Systematic evaluation of the viable microbiome in the human oral and gut samples with spike-in gram+/- bacteria. mSystems 2023;8(2):e0073822. doi: 10.1128/msystems.00738-22.
[31] Nearing JT, DeClercq V, Van Limbergen J, Langille MGI. Assessing the variation within the oral microbiome of healthy adults. mSphere 2020;5(5):e00451.-20Published 2020 Sep 30. doi: 10.1128/mSphere.00451-20.
[32] Gopinath D, Menon RK, Wie CC, et al. Differences in the bacteriome of swab, saliva, and tissue biopsies in oral cancer. Sci Rep 2021;11(1):1181. Published 2021 Jan 13. doi: 10.1038/s41598-020-80859-0.
[33] D'Souza G, Clemens G, Troy T, et al. Evaluating the utility and prevalence of HPV biomarkers in oral rinses and serology for HPV-related oropharyngeal cancer. Cancer Prev Res (Phila) 2019;12(10):689–700. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0185.
[34] Soffritti I, D'Accolti M, Fabbri C, et al. Oral microbiome dysbiosis is associated with symptoms severity and local immune/inflammatory response in COVID-19 patients: a cross-sectional study. Front Microbiol 2021;12:687513 Published 2021 Jun 23. doi: 10.3389/fmicb.2021.687513.
[35] Wright M.L., Podnar J., Longoria K.D., et al. Comparison of commercial DNA extraction kits for whole metagenome sequencing of human oral, vaginal, and rectal microbiome samples. Preprint. bioRxiv. 2023; 2023.02.01.526597. Published 2023 May 4. doi:10.1101/2023.02.01.526597
[36] Rodríguez-Fuentes ME, Pérez-Sayáns M, Chauca-Bajaña LA, Barbeito-Castiñeiras G, Molino-Bernal ML, López-López R. Oral microbiome and systemic antineoplastics in cancer treatment: a systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal 2022;27(3):e248–56 Published 2022 May 1. doi: 10.4317/medoral.25121.
[37] Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. Oral mitis group streptococci: a silent majority in our oral cavity. Microbiol Immunol 2022;66(12):539–51. doi: 10.1111/1348-0421.13028.
[38] Na HS, Song Y, Yu Y, Chung J. Comparative analysis of primers used for 16S rRNA gene sequencing in oral microbiome studies. Methods Protoc 2023;6(4):71. Published 2023 Aug 6. doi: 10.3390/mps6040071.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5

Discusión

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN

5.1 Prevalencia del daño agudo en la mucosa oral asociado a la terapia antineoplásica sistémica en pacientes con cáncer no irradiados.

El daño en la mucosa oral es un efecto secundario de los antineoplásicos sistémicos con una prevalencia notable en pacientes con cáncer (6). Además, el hecho de que 82 artículos hayan cumplido criterios de elegibilidad apoya la relevancia clínica de esta condición médica a nivel mundial. Esta afirmación es consistente con nuestro hallazgo que estima una prevalencia de daño agudo en mucosa oral de pacientes con cáncer no irradiados y sometidos a tratamientos antineoplásicos sistémicos del 38,2% (95% CI: 33,1%-43,3%). Pese a todos los descubrimientos y avances científicos sobre la fisiopatología del cáncer, así como en investigación y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas específicas para el cáncer en los últimos años, los efectos secundarios que generan siguen siendo preocupantes (63). Aparte de eso, los procesos de aprobación de los fármacos y las instituciones responsables de los mismos difieren sustancialmente entre países al igual que el acceso a nuevos tratamientos contra el cáncer (64). De esta forma, conocer datos sobre la prevalencia de este efecto secundario de los tratamientos oncológicos sistémicos podría fomentar la investigación de las bases biológicas que desencadenan las lesiones en la mucosa oral, y consecuentemente descifrar nuevas vías para el desarrollo de tratamientos preventivos o terapéuticos. Así, nuestros resultados sugieren que, a pesar de que la quimioterapia convencional mostró una prevalencia de mucositis oral aguda del 42,9% (95% CI: 32,8%-53%), las terapias dirigidas un 32,1% (95% CI: 26,8%-37,5%) de estomatitis, o la combinación de ambas un 38% (95% CI: 29,1%-47%) de daño agudo en la mucosa oral, las diferencias entre ellas no fueron estadísticamente significativas (p=0,15). Las implicaciones clínicas de estos hallazgos sostienen que, aunque los agentes quimioterápicos tradicionales se consideran más agresivos en cuanto a su capacidad inductora de efectos adversos, otros regímenes más vanguardistas o novedosos como las inmunoterapias o las terapias dirigidas también presentan unas cifras similares de toxicidad a nivel de la mucosa oral. Con esto se pone de manifiesto la necesidad de abordar a todos los pacientes con cáncer de la misma manera, sin importar la terapia de elección, promoviendo la colaboración del equipo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

clínico multidisciplinar en beneficio del paciente. Esto quiere decir que los oncólogos médicos deberían estar apoyados por otros profesionales sanitarios como odontólogos, cirujanos maxilofaciales, dermatólogos, especialistas en cuidados paliativos y enfermería, con el objetivo de proporcionar tratamientos adecuados o métodos preventivos. Con respecto al tipo de cáncer, los artículos que incluyeron a pacientes con diversos tipos de cáncer presentaron unos niveles de toxicidad aguda en la mucosa oral superiores con un 62,3% (95% CI: 33,1%-91,4%) de prevalencia, seguidos de los pacientes con cáncer hematológico con una prevalencia del 47,5% (95% CI: 32,4%-62,6%), linfoma con un 38,3% (95% CI: 8%-68,6%), ovario con un 39,1% (95% CI: 36,8%-41,3%), cáncer renal con un 33,6% (95% CI: 26,7%-40,5%), y cáncer de mama con un 33,1% (95% CI: 22,8%-43,4%). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos (p = 0,19). La prevalencia del daño agudo en la mucosa oral no varió de forma estadísticamente significativa entre las diferentes localizaciones geográficas en las cuales se llevaron a cabo los estudios (p = 0,24), siendo un 48,6% (95% CI: 28,1%-69%) en Norte América, 42% (95% CI: 32,7%-51,2%) en Europa, 34,1% (95% CI: 27,8%-40,3%) en Asia y 28,65% (14,91%-42,39%) en Australia. El principal motivo que nos podría llevar a considerar las posibles diferencias en función de la localización geográfica sería la distribución irregular del acceso a fármacos en ciertas regiones (86). En tanto en que ninguno de los estudios evaluados fue realizado en África, este aspecto en sí mismo, podría llevar implícito ciertas connotaciones. Por un lado, se podría asumir que las toxicidades en la mucosa oral no se consideran una prioridad en el tratamiento contra el cáncer en este continente, pero también se podría creer bien que el acceso a antineoplásicos sistémicos o incluso la propia asistencia médica es más limitada en esta región en comparación con otras partes del mundo.

Los ensayos clínicos no aleatorizados, los estudios de cohortes amplios, o los estudios de casos y controles, tradicionalmente han sido considerados óptimos para determinar la incidencia o prevalencia de los eventos adversos en farmacovigilancia (65). La propia naturaleza de este estudio para evaluar la prevalencia del daño en la mucosa oral, en tanto en que solamente considera fármacos antineoplásicos sistémicos disponibles en el mercado, ha sido decisivo a la hora de diseñar el planteamiento sobre el abordaje del tema. Esto nos llevó a realizar una revisión sistemática de los datos disponibles con el fin de alcanzar mediciones representativas, e investigaciones previas han demostrado la fiabilidad de esta clase de estudios (66). Además, se consensuó establecer un marco temporal para la inclusión que comenzase en el año 2010, coincidiendo con el desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos

tumorales o receptores de células T, y la expansión de las terapias dirigidas a nivel mundial (67). Este planteamiento estratégico, además de restringir el alcance en la búsqueda de publicaciones científicas, también permite balancear la cantidad de investigaciones sobre agentes quimioterápicos con las de terapias dirigidas e inmunoterapias, dado que el primer inhibidor de punto de control fue comercializado en el año 2011 desatando el desarrollo de numerosos ensayos clínicos, para los cuales se habían estado realizando estudios preclínicos durante años (68).

A lo largo de esta investigación, nos hemos enfrentado a varios retos. Por ejemplo, el método o instrumento de evaluación de la afectación de la mucosa oral no fue homogéneo en todos los artículos, ya que algunos utilizaron la escala WHO-OTS de la Organización Mundial de la Salud, mientras que otros optaron por la NCI-CTCAE en sus sucesivas versiones, y, en algunos casos el método empleado ni siquiera fue comunicado. Para solventar esta discrepancia se tomaron en cuenta solamente los casos notificados de daño en la mucosa oral en general, lo que implica una puntuación >0 en la WHO-OTS o ≥1 en la NCI-CTCAE (28). Por el contrario, varios artículos reportaron solamente aquellos casos en los que la afectación era ≥3, o ≥2, ignorando así los casos más leves de daño en la mucosa oral. El hecho de que no se reportase el número exacto de pacientes que desarrollaban cada grado de afectación de las lesiones puede haber influido en los resultados obtenidos. Sin embargo, sería razonable pensar que no tiene las mismas implicaciones para un paciente sufrir un daño en la mucosa de grado 1 (que implica un mero eritema) que sufrir ulceración, lo que puntuaría “4” en la escala WHO-OTS (28). Asimismo, este déficit de exhaustividad en el detalle o concreción nos ha limitado en el estudio de posibles asociaciones entre el tipo de tratamiento antineoplásicos sistémico con la gravedad de las lesiones orales agudas. Se debe tener en cuenta que la gran variedad de tratamientos, dosis, vías de administración y los tratamientos adyuvantes utilizados en los estudios incluidos podrían haber afectado a los resultados obtenidos. En estudios futuros sería conveniente especificar la gravedad o grado de afectación del daño en la mucosa oral para poder permitir la asociación entre éstas y otras variables como el tipo de tratamiento o la dosis.

Por otro lado, el análisis de datos basado en características sociodemográficas (p.ej. género y edad) no ha sido posible debido a las diferencias de las muestras. Algunos de los artículos científicos incluidos no describen ciertos aspectos de la muestra y otros solamente incluyen a pacientes mujeres, dado que son pacientes con cáncer de ovario o mama.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, aunque se podría pensar que los pacientes con cáncer hematológico presentarían datos de prevalencia de daño agudo en la mucosa oral diferentes a los de pacientes con tumores sólidos, debido a las peculiaridades propias del abordaje terapéutico de la enfermedad y a los tratamientos utilizados (incluido el trasplante de precursores hematopoyéticos), no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Este estudio podría impulsar a investigadores para continuar trabajando sobre este efecto adverso de tan elevada prevalencia en pacientes con cáncer tratados con antineoplásicos sistémicos, ya sea descubriendo tratamientos efectivos para esta condición, terapias preventivas, o desarrollando terapias oncológicas innovadoras que no produzcan este efecto secundario.

5.2 Relación entre la microbiota oral y el uso de antineoplásicos sistémicos en pacientes con cáncer no irradiados.

La mucositis oral es un problema importante en el tratamiento contra el cáncer y el microbioma oral podría jugar un papel clave en este proceso (8). De esta manera, cualquier hallazgo en este campo podría resultar de utilidad en la búsqueda de nuevos tratamientos o métodos preventivos para esta patología (23). Es posible que parezca que el estudio de la microbiota está en tendencia, sin embargo la realidad es diferente en el ámbito específico del daño oral en pacientes sometidos a tratamientos antineoplásicos sistémicos. A pesar de que se obtuvieron 155 artículos tras aplicar los criterios de búsqueda bibliográfica, ciento cincuenta de ellos no fueron aptos para su inclusión en el análisis. Numerosas publicaciones de investigación se llevaron a cabo utilizando métodos para la detección de microorganismos que han demostrado ser imprecisos (69). Además, una gran cantidad de la literatura obtenida incluía pacientes pediátricos, y las evidencias conocidas de los cambios en la composición de la microbiota oral propios de esta población nos condujo a su exclusión (70). De forma semejante, una gran proporción de los estudios obtenidos centrados en el análisis de la microflora oral de pacientes con cáncer analizaban a pacientes sometidos a radioterapia, lo cual probablemente se correlacione con la elevada incidencia de la mucositis oral en este tipo de pacientes (2). No obstante, la razón de ser de este estudio que surgió desde la perspectiva de la medicina oncológica condujo a su exclusión del análisis, incluyendo solamente artículos científicos donde los participantes estuviesen sometidos a agentes quimioterápicos, inmunoterapias o terapias dirigidas (33, 71, 72, 73, 74). Estos hallazgos fundamentan la necesidad de profundizar

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en las investigaciones en este campo en concreto, debido a que la evidencia actual es bastante deficitaria, a pesar de la enorme contribución que ha supuesto para el desarrollo del conocimiento actual la aparición de los métodos de Secuenciación de Nueva Generación (50).

Todos los artículos analizados contaron con grupos muestrales de pacientes con cáncer bastante homogéneos, en cuanto a edad y género (33, 71, 72, 73, 74). Con respecto a otros aspectos, no ha habido un consenso clínico o microbiológico entre ellos, por este motivo no fue posible realizar un metaanálisis. Sorprendentemente, no se encontraron estudios centrados en el análisis del microbioma oral en pacientes tratados principalmente con inmunoterapias o terapias dirigidas. Esto podría deberse, por un lado, a la menor incidencia de daño en la mucosa oral en este tipo de tratamientos frente a otros regímenes oncológicos (10), a la relativa novedad o recencia de estas terapias (12), o incluso al uso prevalente de los agentes quimioterápicos convencionales frente a las demás opciones de agentes terapéuticos sistémicos disponibles (11, 16, 17).

En relación con el tipo de muestra oral, el enjuague resultó ser la más representativa del microbioma completo de toda la cavidad oral, mientras que la muestra de mucosa oral recogida con hisopo mostró limitar sus resultados a las zonas específicas de la cavidad oral de donde habían sido recogidas (75, 76). La diversidad de la exposición de los hallazgos en los estudios analizados condujo a aceptar que la abundancia relativa de cada tipo de microrganismo podría ser la medida más acertada para permitir un análisis cuantitativo. Haber contado con este dato en cada uno de los artículos revisados habría permitido concluir con una evidencia más robusta y fundamentada.

Se encontraron numerosos hallazgos sobre la microbiota oral en cada publicación. No obstante, éstos deberían ser contrastados en futuras investigaciones. En lo que respecta al bacterioma oral, Galloway-Peña y colaboradores identificaron una asociación entre el incremento de las proporciones de tres géneros de bacterias asociadas a procesos patógenos (*Streptococcus*, *Staphylococcus* & *Stenotrophomonas*) y la variabilidad transitoria de la diversidad α y β, en la mucosa oral de pacientes con cáncer que recibían tratamiento con quimioterapia (71). En línea con esto, el género *Streptococcus* es conocido por evitar la proliferación de especies patógenas mediante la secreción de metabolitos secundarios (38, 45).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hong y colaboradores encontraron una disminución en la diversidad alfa en la saliva de pacientes que recibían tratamiento con agentes quimioterápicos (33) este mismo hallazgo fue identificado por Diaz y colaboradores en pacientes con cáncer que recibían quimioterapia y que sufrían candidiasis oral (73). Esta disbiosis se caracterizaba por un aumento de *Fusobacterium nucleatum subsp. Vicentii*, *Clostridiales*, *Treponema maltophilum* en muestras de saliva y de *Prevotella oris* en muestras de mucosa oral. Por otro lado identificaron una disminución de las concentraciones en saliva de *Streptococcus parasanguinis II, Solobacterium moorei, Granulicatella adiacens, Lachnoanaerobaculum orale, Prevotella melaninogenica, Prevotella sp.* HOT305, *Streptococcus salivarius, Oribacterium sinus, Veillonella rogosae, Gemella sanguinis, Veillonella denticariosi, Acinomyces graevenitzii, Prevotella pallens, Veillonella atypica, Acinomyces odontolycus, Streptococcus sp*. HOT066, *Streptococcus sp*. HOT061, *Leptotrichia sp*. HOT215, *Actinomyces sp*. HOT172, *Stomatobaculum sp*. HOT097, *Prevotella sp*. HOT313, *Peptostreptococcaceae, Prevotella histicola, Actinomyces lingnae,* mientras que en las muestras de mucosa oral las proporciones de *Streptococcus parasanguinis II, Streptococcus vestibularis, Veillonella rogosae, Actinomyces graevenitzii* habían disminuido (33). Estos resultados respaldan la hipótesis de que *S. parasanguinis* y *S. salivarius* se asocian con una mejor salud oral (38, 40), y que *F. nucleatum* es considerado un microorganismo oportunista (77) así como *Prevotella oris* un periodonto-patógeno (78). Alternativamente, Laheij y colaboradores encontraron un incremento de *Streptococcus australis, Streptococcus parasanguinis, Veillonella atypica, Veillonella dispar,* genus *Actinomyces, Actinomyces sp. OT172, Actinomyces graevenitzii, Gemella haemolysans, Gemella morbillorum,* y de taxón *Gemella sanguinis* en casos de mucositis oral ulcerativa (MOU) que podría predecir cierta susceptibilidad a sufrir cuadros más graves de daño en la mucosa oral. Además, se observe un incremento de ciertos patógenos como *Staphylococcus aureus* (79), *Staphylococcus epidermidis,* que inhiben mecanismos de protección del huésped (80), y de otros microorganismos como *Staphylococcus caprae, Staphylococcus warneri, Scardovia wiggsiae,* y *Enterococcus faecalis* que poseen características virulentas que les otorgan la capacidad de adherirse y penetrar células del huésped desencadenando respuestas inflamatorias (81). Todo esto se observó durante la primera y segunda semana de tratamiento lo que podría suponer un potencial nocivo para el huésped. En general, los casos más graves de daño en la mucosa oral estaban asociados con un incremento en las proporciones de *Veillonella* lo que parece contradecir el conocimiento y la evidencia sobre su capacidad para promover y/o garantizar la

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

salud oral debido a su capacidad para generar sinergias con otros componentes del biofilm oral (82)*, Enterococcus faecalis, Streptococcus, Staphylococcus spp., Fusobacterium, Prevotella oris,* y *Prevotella verorallis.* Por el contrario, los casos más leves de daño en la mucosa oral mostraron un incremento total en las proporciones de *Actinomyces graevenitzii* y *Streptococcus constellatus*. El incremento previo al tratamiento y tras 3 meses de las proporciones de *Veillonella atypica, Veillonella dispar, Actinomyces sp*. OT172, *Actinomyces graevenitzii,* género *Prevotella,* género *Leptotrichia, Megasphaera micronuciformis* y V*eillonella sp*. OT917 parecen indicar una menor susceptibilidad a sufrir lesiones graves en la mucosa oral, e incluso un incremento en los géneros *Lactobacillus, Lactobacillus fermentum* y *Scardovia wiggsiae* durante la primera y segunda semana de quimioterapia podrían indicar un potencial mecanismo protector sobre la gravedad del daño en la mucosa oral.

En referencia al micobioma oral, Robison y colaboradores identificaron los 10 géneros más abundantes en la cavidad oral humana que son *Alternaria*, *Candida*, *Cladosporium*, *Fungi sp*., *Fusarium*, *Malassezia*, *Malasseziales sp*., *Meyerozyma*, *Ramularia*, *Saccharomyces* y al mismo tiempo afirmaron que la diversidad α y β no variaba significativamente a lo largo del periodo en el que los pacientes iban recibiendo tratamiento sistémico con antineoplásicos. Asimismo, determinaron una disminución en la abundancia relativa de *Aspergillus* en comparación con los controles sanos y una reducción en las proporciones de *Malassezia* en aquellos individuos sometidos a quimioterapia en dosis alta (QDA) y que podría ser indicativo de atributos protectores de estos microorganismos (72). Curiosamente, se observó un acrecentamiento en las proporciones de *Rothia mucilaginosa* en la saliva de pacientes que sufrían candidiasis oral, conocida por ser una de las especies más abundantes en personas (45), al igual que se apreciaron incrementos en las proporciones de *Candida, mycoplasma faucium, Candida albicans* y *Porphyromonas endodontalis,* mientras que por el contrario una disminución en *Porphyromonas sp.* HOT279, Unclassified *Saccharomycetacea*e podrían predecir afectación por candidiasis oral (73). A grandes rasgos, se han identificado más de cien especies de hongos en la cavidad oral humana, siendo *Candida spp.* una de las más abundantes (69). Concretamente, *Candida albicans* es considerado un germen que podría pasar de mero comensal a patógeno mortal en caso de invadir el torrente sanguíneo (83).

La presente revisión sistemática se encuadra en los límites de los cinco artículos científicos incluidos y analizados, lo que supone un hallazgo pobre o anodino. De acuerdo con los criterios

de elegibilidad aplicados, se evidencia una falta de consenso en los protocolos implementados a la hora de abordar este tema de investigación A pesar del reducido número de artículos incluidos, se ha observado una importante heterogeneidad y diversidad en el modo de difusión y publicación de los resultados, así como en los diferentes abordajes implementados, lo cual impide posibles comparaciones entre unos y otros. Las principales limitaciones de esta revisión conciernen a las metodologías utilizadas en cada uno de los artículos. En primer lugar, el tamaño muestral no parece suficiente para obtener resultados claros, únicamente una de las cinco publicaciones incluyó como comparadores a sujetos sanos. Por otro lado, se incluyeron pacientes con una amplia variedad de tipologías de cáncer, mezclando pacientes diagnosticados con tumores sólidos con otros que padecían otros tipos de cáncer hematológico, y todos ellos recibiendo una gran variedad de agentes quimioterápicos. La clase de muestra utilizada para el análisis del microbioma oral también supone un aspecto negativo, dado que en utilizan saliva completa y ésta ha demostrado previamente ser menos exacta y representativa del microbioma oral en su conjunto que la muestra por enjuague oral (76). El objetivo principal de estos estudios ha sido analizar los aspectos microbiológicos, dejando de lado la mayor parte de la información clínica, que podría resultar ciertamente relevante para los profesionales sanitarios como pueden ser la evaluación de la mucositis oral o incluso los hábitos tóxicos de los participantes. En relación con los resultados obtenidos, el déficit de datos cuantitativos sobre abundancias relativas de cada uno de los microorganismos imposibilita la búsqueda de similitudes o discrepancias y esta debería ser la parte relevante que permita generar conclusiones o futuras hipótesis para focalizar las investigaciones en determinados microrganismos que podrían estar directamente relacionados con el desarrollo de la mucositis oral. Por su parte, los diferentes métodos o técnicas de secuenciación genética y los protocolos implementados podrían ser fuente de variabilidad o sesgado que estaría afectando a los resultados y su extrapolación al conocimiento general podría no ser adecuado o acertado (40). La diversidad en los resultados encontrados es confusa y su interpretación supone una ardua tarea de descifrado. En este punto, resulta conveniente mencionar las múltiples causas etiológicas o médicas que pueden afectar a la ecología oral. En concreto, estudios previos han demostrado la estrecha relación existente entre la carcinogénesis oral y la disbiosis en la cavidad bucal (84, 85). Sin embargo, otros tipos de cáncer también parecen estar relacionados con procesos de disbiosis del microbioma oral como el cáncer colorrectal (86), cáncer de páncreas (87), pulmonar (88), esofágico y gástrico (89). Por lo tanto, el estudio de las alteraciones de la microbiota oral en pacientes con cáncer

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

no irradiados se convierte en un reto para los investigadores debido a la dificultad a la hora de establecer una relación causa-efecto, ya que la disbiosis podría estar inducida por el tratamiento contra el cáncer o incluso originada por el propio cáncer. Sumado a esto, aparece otro factor de confusión que surge de la falta de conocimiento o certeza sobre si el cáncer pudiera ser un desencadenante de la disbiosis oral o si, por el contrario, son los microorganismos los que mediante algún mecanismo desconocido podrían estar induciendo el desarrollo de cáncer. En otras palabras, *The International Association for Cancer Registries* (IACR) identificó 11 "oncomicrobios" o especies de microorganismos que son capaces de inducir carcinogénesis (90). Todo esto supone una dificultad añadida a la investigación y por lo tanto es importante continuar trabajando en este campo.

5.3 Muestras orales como herramienta para un análisis metagenómico exacto.

El microbioma oral es uno de los nichos ecológicos más diversos del cuerpo humano y se caracteriza por una estructura organizada, diversa y compleja de comunidades microbianas. Se conoce que existe una variación interpersonal determinada por factores ambientales y genéticos del propio huésped (91). Según los resultados obtenidos del estudio llevado a cabo para evaluar la relación entre la administración de agentes antineoplásicos sistémicos y los cambios en la microbiota oral se considera que existe una evidencia científica deficitaria e insuficiente sobre los cambios microbiológicos orales en pacientes sometidos a este tipo de tratamientos oncológicos a nivel filo, clase, orden, familia género o especie. Debido a la falta de un protocolo estandarizado para realizar análisis sobre el microbioma oral (40), se propuso realizar un estudio piloto que nos permitiese identificar el tipo de muestra óptima para sentar las bases de un proyecto de investigación futuro en pacientes con cáncer no irradiados que reciban tratamientos antineoplásicos sistémicos.

Actualmente, se conoce que *Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Saccharibacteria (TM7)* y *Gracilibacteria (GN02)* son componentes habituales de la microbiota oral a nivel de división o filo (85). Teniendo en cuenta nuestros hallazgos en cuanto a la composición del microbioma oral y que demostraron superioridad en las muestras de saliva completa y enjuague oral frente a las muestras de tejido de mucosa oral, se han contrastado

nuestros datos no procesados con publicaciones de estudios previos. Por ende, nuestros resultados mostraron que el tipo de microorgarnismo más abundante en todos los tipos de muestras fue *Firmicutes* (55,57 % en saliva completa, 55,25% en enjuague oral y 34,35% en mucosa oral), lo que se corresponde con las cifras de estudios previos en los que los autores identificaron un 50-60% de *Firmicutes* en muestras de saliva completa (92). Los *Bacteroidetes* fueron la segunda división o filo más abundante en las muestras de saliva de nuestro estudio (18,25%), mientras que en los datos de Nearing y colaboradores solamente supusieron un 8,25%. Seguidamente, la abundancia relativa de *Actinobacteria* fue de un 13,4% en nuestros resultados, también ligeramente superior al 10% detectado en investigaciones previas en saliva completa (92). Por otro lado, la abundancia relativa de *Actinobacteria* fue del 15,54%, posicionándose en segundo lugar, seguido de *Bacteroidetes* en tercer lugar con un 13,08% en las muestras de enjuague oral. En tercer lugar, en las muestras de tejido de mucosa oral un 12,68% de la abundancia relativa nivel de división no se pudo clasificar y un 14,71% pertenecía a *Fusobacteria* (14,71%). Sumado a esto, la abundancia relativa de *Fusobacteria* en saliva completa también fue similar a resultados previos (5,30%) (92). Por lo tanto, es posible confirmar que la división taxonómica identificada se corresponde en cierta medida con la principal división presente en la ecología oral humana descrita (85, 92).

Realizando un análisis a nivel de género, encontramos que un estudio del mismo campo fue capaz de identificar los 5 géneros más abundantes en muestras de saliva entre los que se encontraron *Prevotella*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Haemophilus* y *Rothia* (76) mientras que nuestros resultados identificaron *Streptococcus*, *Prevotella*, *Granulicatella*, *Veillonela* y *Actinomyces* encabezando el ranking. En el caso de las muestras de enjuague oral, los investigadores determinaron que *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria*, *Haemophilus* y *Rothia* constituyen la gran mayoría de los géneros en el microbioma oral humano (76), mientras que nuestros datos identificaron *Streptococcus*, *Prevotella*, *Rothia*, *Gemella* y *Actinomyces* como los géneros más prevalentes en las muestras de enjuague oral.

La *expanded Human Oral Microbiome Database* (eHOMD) reconoce 774 especies de microorganismos de los cuales solamente un 58% han sido nombrados oficialmente (50). Centrándose en la categoría taxonómica más inferior de este estudio, se concluyó que el grupo de mayor tamaño en las muestras de saliva estaba integrado por especies no clasificadas, con 35,86% de abundancia relativa. A pesar de ser un porcentaje elevado, al comparar los resultados

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

con la base de datos eHOMD, no parecen conclusiones muy desacertadas. El segundo grupo más abundante muestras de salivaa nivel de especie fue *Rothia mucilaginosa* (5,81%), seguido de *Granulicatella adiacens* (5,09%), *Prevotella melaninogenica* (4,43%) y *Actinomyces odontolyticus* (3,42%). En el caso de las muestras de enjuague oral el 39,23% del total también fueron especies no clasificadas e incluso en proporciones superiores a las halladas en las muestras de saliva. A continuación, *Rothia mucilaginosa* supuso un 5,36%, *Actinomyces odontolyticus* un 3,65%, *Gemella sanguinis* un 2,96% y *Streptococcus salivarius* un 2,73%. Esto concuerda con las teorías que confirman que la especie *Streptococci* es el *Bacilli* más común, y la especie *Prevotella* una importante fracción de división o filo *Bacteroidetes* phylum en salud oral (69). Por otra parte, un 43,76% de las especies detectadas en muestras de tejido de mucosa oral fueron no clasificadas, 2,65% *Rothia mucilaginosa*, 0,79% *Granulicatella adiacens*, 0,54% *Porphyromonas pasteri* y 0,36% *Prevotella melaninogenica*.

La profundidad del análisis de secuenciación ha demostrado su relevancia a la hora de evaluar la calidad de los análisis metagenómicos (40, 93). Por lo tanto, se construyó una curva de rarefacción (94) con los datos obtenidos para asegurar una profundidad de lecturas adecuada que aporte fiabilidad a los resultados obtenidos. Aunque no todos los tipos de muestras alcanzaron el mismo número de lecturas, cada uno de ellos alcanzó una meseta, lo que es indicativo de una adecuada profundidad de secuenciación. Así, se concluyó que a partir de las 30 lecturas la calidad era consistente, y por lo tanto los resultados presentaban suficiente exactitud.

En paralelo a lo mencionado con anterioridad, el análisis bioinformático llevado a cabo mostró que cerca de un 44% de las bacterias de las muestras de saliva pertenecían a especies no asignadas, mientras que en las muestras de enjuague oral el porcentaje fue de un 70%, alcanzando cifras de 99% en muestras de tejido mucoso de biopsia oral. En cuanto a las muestras de tejido, el material genético en 4 de las 6 muestras no pudo ser asignado a ninguna especie bacteriana y las dos muestras restantes contenían menos de un 10% de material genético bacteriano. Solamente 1 de las 4 muestras de saliva tuvo una abundancia relativa 100% de especies bacterianas conocidas, 2 muestras contuvieron entre un 50-60% y 1 de ellas estaba íntegramente constituida por material genético de especies bacterianas no clasificadas. Tres de las 5 muestras de enjuague oral resultaron óptimas (100% de OTUs conocidas), una estaba formada por más de un 35% de especies conocidas y solamente una de ellas estaba formada en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

su totalidad (100%) por material genético de especies bacterianas no asignadas. Teniendo en cuenta estos resultados, sería esperable determinar niveles bajos de especies conocidas (<1%) en muestras de tejido de mucosa oral. A priori, esto parece consistente con el conocimiento actual, dado que se sabe que la mayoría de los microrganismos de la flora oral simplemente se suelen ubicar en recubrimiento de biofilm oral de las membranas mucosas, por lo tanto, el resto de la pieza de tejido de mucosa oral recogido mediante biopsia debería, teóricamente, estar libre de bacterias como consecuencia de la función protectora del epitelio oral (95). De esta manera, la mayoría del ADN extraído de la muestra debería pertenecer al huésped y no a los microorganismos comensales (96). Por otra parte, las muestras líquidas como la saliva o el enjuague oral han resultado ser diferentes entre sí. Las muestras de saliva mostraron una abundancia relativa de especies identificadas del 56% frente a un 30% en muestras de enjuague oral. Por consiguiente, se examinó la diversidad alfa utilizando el índice de Simpson (97) que mostró un valor $p = 0{,}005$. El resultado determinó una diferencia estadísticamente significativa entre la diversidad alfa del enjuague oral frente a la saliva completa no estimulada y frente al tejido de mucosa oral. Así, la diversidad alfa bacteriana es superior en las muestras de enjuague oral. Además de este hallazgo, también se concluyó que el enjuague oral fue estadísticamente diferente de las muestras de tejido y saliva, en términos de diversidad alfa, y por lo tanto se reconoce una mayor diversidad alfa del microbioma oral en muestras de enjuague oral. Una de las hipótesis generadas sobre este tema consiste en la posibilidad de que, el método utilizado para la recogida de las muestras de enjuague oral podría ocasionar el arrastre de bacterias localizadas en determinadas regiones anatómicas de la cavidad oral poco accesibles (41). Existe la posibilidad de que este fenómeno no suceda en los casos de obtención de saliva no estimulada al dejar fluir la saliva por gravedad, sin aplicación de estímulo desde la cavidad oral hacia el recipiente de recogida de la muestra. Además, la elevada diversidad α identificada en las muestras de enjuague oral de este estudio, en comparación con las otras muestras, también concuerdan con investigaciones previas en las que la diversidad alfa mostró ser más heterogénea en muestras de enjuague oral frente a las muestras recogidas con hisopo en zonas lesionales y no lesionales (98). Asimismo, una investigación previa ha concluido que el procesamiento y tratamiento de las muestras puede afectar significativamente a la determinación de la abundancia relativa de los microorganismos hallados en ella (99).

En función del tipo de estudio que vayamos a implementar o llevar a cabo, es posible que un tipo de muestra se más apropiado que otro. En los casos en los que el principal interés sea

alcanzar cifras elevadas de superiores de OTUs identificados, se optaría por muestras de saliva completa, mientras que, si el objetivo es analizar poblaciones más diversas del biofilm oral, el enjuague oral sería más interesante y mejor opción. Es fundamental conocer la metodología óptima en la práctica de análisis de bacterioma así como seleccionar la mejor muestra a la hora de diseñar un estudio de investigación sobre microbioma oral (100). Los resultados de esta investigación respaldan la importancia de cómo el hecho de seleccionar un tipo de muestra u otra puede revelar información muy diversa y por lo tanto los resultados y conclusiones podrían diferir sustancialmente. Entonces, todos los estudios deberían considerar la relevancia del tipo de muestra en el momento de diseñar el protocolo de un proyecto de investigación cuyo objetivo sea estudiar los cambios en la composición del microbioma oral asociado patologías sistémicas o localizadas (40, 60, 101, 102, 103), al igual que para asociar los mismos a efectos secundarios de tratamientos, como por ejemplo descifrar cambios en el microbioma oral pacientes con lesiones agudas de la mucosa oral como consecuencia del uso de tratamientos antineoplásicos sistémicos.

Teniendo en cuenta los objetivos definidos para esta investigación, se determina que un estudio transversal supondría evidencia suficiente para respaldar los resultados obtenidos dado su ámbito de validez (104). No obstante, otras características de este, inherentes a su concepción y diseño, implican varias limitaciones, por lo tanto, los resultados deberían ser tomados con cautela. Resulta evidente que un tamaño muestral de 6 sujetos es bastante reducido. Sin embargo, el objetivo es expandir este estudio en el futuro mediante el reclutamiento de un mayor número de participantes, con el fin de alcanzar conclusiones más fiables. Esto permitirá realizar análisis estadísticos más extensos que incluyan datos clínicos y sociodemográficos de los sujetos y posibles correlaciones con las diferencias en la composición de las poblaciones de microrganismos de la flora oral.

El recuento de especies bacterianas reveló que la mitad de las muestras (9 de 18) contenían entre 0-300 Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Tres muestras contenían más de 1200 OTUs, 2 muestras entre 600-900 OTUs y solamente 1 muestra entre 900-1200 OTUs. En estudios previos se mostró una media de 71,25± 26,40 OTUs en muestras orales (105), lo que permite concluir que la metodología de procesamiento de las muestras ha sido superior en términos generales. No obstante, el análisis de datos determinó la necesidad de excluir 3 muestras (S2, S3 and OR1) del estudio debido a que determinadas características de OTUs no

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pudieron ser identificadas en ellas. Tener que descartar estas 3 muestras, debido a la imposibilidad de identificar características genéticas atribuibles a Unidades Taxonómicas, podría indicar cierta inexactitud durante el procesamiento de las muestras.

A pesar de los análisis de calidad realizados en cuanto a profundidad de lectura, los errores en la manipulación o tratamiento de las muestras han podido resultar en una pérdida de información genética de las muestras que tuvieron que ser excluidas del análisis. Además, estos inconvenientes podrían haberse acentuado debido a la limitada experiencia, teniendo en cuenta que estos procedimientos son poco convencionales en un contexto hospitalario debido a la falta de utilidad clínica hasta el momento. También, es reseñable el elevado porcentaje de material genético que no se pudo atribuir a ninguna especie conocida dentro de las muestras en las que se identificaron características genéticas propias de especies bacterianas. De aquí surge la hipótesis de una posible limitación técnica que podría atribuirse tanto a un protocolo no optimizado o depurado por parte de las compañías comerciales, a una falta de especificidad de sus reactivos y/o cebadores (59, 62, 99, 106) o incluso a un desconocimiento general sobre las especies que componen el microbioma oral humano (49, 103, 10). A parte de las limitaciones de este estudio, es importante remarcar que la especificidad de la tecnología utilizada en este estudio es superior a otros métodos utilizados tradicionalmente para la identificación de bacterias y otros microorganismos como es el cultivo celular (107). Sin embargo, la posibilidad de que las observaciones de esta investigación hayan estado sesgadas por limitaciones metodológicas no puede ser excluida.

Esta investigación se justifica en base a la necesidad de determinar el tipo de muestra óptima para el análisis del microbioma oral, así como por la falta de definición de un protocolo estricto para este fin (40). Este estudio piloto proporciona una base para investigaciones futuras sobre el microbioma oral. Las diferencias halladas en los resultados obtenidos en cuanto al microbioma en los distintos tipos de muestras defienden la importancia de elegir una muestra apropiada, previo a la implementación de una investigación sobre este tema. En función de los objetivos del estudio, un tipo de muestra podría ser más apropiado que otro como fuente de material genético de microorganismos. Por ende, los resultados obtenidos en este estudio sustentan a lo apuntado por otros investigadores que difundieron que el enjuague oral debería asumirse como la muestra de elección en los casos en los que se desea recoger una mayor diversidad alfa de la cavidad oral (75, 76), mientras que la saliva completa no estimulada sería

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

más apropiada en aquellas situaciones en las que se precisa una mayor cantidad de material genético bacteriano de la cavidad oral.

Por último, es importante resaltar que tanto los análisis sobre el micobioma y el viroma son campos semi huérfanos. Las dificultades técnicas para su secuenciación e identificación, así como la prominente abundancia relativa del bacterioma oral limitan su avance (34, 38, 108). Sin embargo, su desarrollo podría indudablemente suponer un cambio de paradigma en el estudio del microbioma.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6

Conclusiones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de esta investigación han determinado una prevalencia media de daño agudo en la mucosa oral del 38.2% en pacientes con cáncer no irradiados que reciben tratamiento con antineoplásicos sistémicos. A pesar de que el tratamiento con agentes quimioterápicos resultó ser el que presentaba una mayor prevalencia de este evento adverso, seguido de los tratamientos combinados y por último las terapias dirigidas, no se pudieron establecer diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del daño agudo en la mucosa oral entre los distintos tipos de terapias antineoplásicas sistémicas.
2. La prevalencia del daño agudo en mucosa oral es independiente del tipo de cáncer primario del paciente, así como de su ubicación geográfica.
3. La diversidad α bacteriana en la cavidad oral disminuye durante el tratamiento con agentes quimioterápicos coincidiendo con el momento de mayor afectación de la mucosa oral en pacientes con cáncer. Un incremento en las proporciones de especies bacterianas patógenas en la cavidad oral de los géneros *estreptococo, estafilococo y estenotrofomona* se asocia con una mayor inestabilidad de la diversidad bacteriana α y β.
4. La diversidad alfa y beta del micobioma oral no se altera significativamente con el tratamiento con agentes quimioterápicos. Sin embargo, se ha determinado una mayor incidencia de micosis orales en pacientes con una menor diversidad fúngica y bacteriana basal.
5. El enjuague oral es la muestra oral con una mayor diversidad bacteriana. La saliva completa no estimulada es el tipo de muestra que contiene una mayor cantidad especies identificadas del microbioma oral. La biopsia oral es la que aporta un mayor número de especies no identificadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. El microbioma oral podría jugar un papel fundamental en el desarrollo de lesiones agudas en la mucosa oral en pacientes oncológicos no irradiados tratados con antineoplásicos sistémicos. Su análisis detallado podría esclarecer las bases fisiopatológicas de este evento adverso y permitir el desarrollo de estrategias terapéuticas o preventivas eficaces.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7

Referencias

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. REFERENCIAS

(1) Sonis ST. Pathobiology of mucositis. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(1):11-15. doi:10.1053/j.soncn.2003.10.003

(2) Basile D, Di Nardo P, Corvaja C, et al. Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6):857. Published 2019 Jun 20. doi:10.3390/cancers11060857

(3) Peterson DE, Srivastava R, Lalla RV. Oral mucosal injury in oncology patients: perspectives on maturation of a field. *Oral Dis*. 2015;21(2):133-141. doi:10.1111/odi.12167

(4) Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, et al. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy [published correction appears in Cancer. 2021 Oct 1;127(19):3700]. *Cancer*. 2020;126(19):4423-4431. doi:10.1002/cncr.33100

(5) Ihara Y, Crary MA, Madhavan A, et al. Dysphagia and Oral Morbidities in Chemoradiation-Treated Head and Neck Cancer Patients. *Dysphagia*. 2018;33(6):739-748. doi:10.1007/s00455-018-9895-6

(6) Elad S, Yarom N, Zadik Y, Kuten-Shorrer M, Sonis ST. The broadening scope of oral mucositis and oral ulcerative mucosal toxicities of anticancer therapies. *CA Cancer J Clin*. 2022;72(1):57-77. doi:10.3322/caac.21704

(7) Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(9):702-713. doi:10.1038/nrc1950

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(8) Reyes-Gibby CC, Wang J, Zhang L, et al. Oral microbiome and onset of oral mucositis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 2020;126(23):5124-5136. doi:10.1002/cncr.33161

(9) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660

(10) Lacouture M, Sibaud V. Toxic Side Effects of Targeted Therapies and Immunotherapies Affecting the Skin, Oral Mucosa, Hair, and Nails. *Am J Clin Dermatol*. 2018;19(Suppl 1):31-39. doi:10.1007/s40257-018-0384-3

(11) Wilson BE, Jacob S, Yap ML, Ferlay J, Bray F, Barton MB. Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study [published correction appears in Lancet Oncol. 2019 Jul;20(7):e346]. *Lancet Oncol*. 2019;20(6):769-780. doi:10.1016/S1470-2045(19)30163-9

(12) Hamdan F and Cerullo V (2023), Cancer immunotherapies: A hope for the uncurable? Front. Mol. Med. 3:1140977. doi: 10.3389/fmmed.2023.1140977

(13) Katz MHG, Francescatti AB, Hunt KK; Cancer Surgery Standards Program of the American College of Surgeons. Technical Standards for Cancer Surgery: Commission on Cancer Standards 5.3-5.8. *Ann Surg Oncol*. 2022;29(11):6549-6558. doi:10.1245/s10434-022-11375-w

(14) Calvo FA, Chera BS, Zubizarreta E, et al. The role of the radiation oncologist in quality and patient safety: A proposal of indicators and metrics. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;154:103045. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103045

(15) Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018;106:1098-1107. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.049

(16) Haslam A, Prasad V. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Netw Open*. 2019;2(5):e192535. Published 2019 May 3. doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.2535

(17) Haslam A, Kim MS, Prasad V. Updated estimates of eligibility for and response to genome-targeted oncology drugs among US cancer patients, 2006-2020. *Ann Oncol*. 2021;32(7):926-932. doi:10.1016/j.annonc.2021.04.003

(18) Du R, Wang X, Ma L, et al. Adverse reactions of targeted therapy in cancer patients: a retrospective study of hospital medical data in China. *BMC Cancer*. 2021;21(1):206. Published 2021 Feb 28. doi:10.1186/s12885-021-07946-x

(19) Pearce A, Haas M, Viney R, et al. Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study. *PLoS One*. 2017;12(10):e0184360. Published 2017 Oct 10. doi:10.1371/journal.pone.0184360

(20) Wang F, Yang S, Palmer N, et al. Real-world data analyses unveiled the immune-related adverse effects of immune checkpoint inhibitors across cancer types. *NPJ Precis Oncol*. 2021;5(1):82. Published 2021 Sep 10. doi:10.1038/s41698-021-00223-x

(21) Maria OM, Eliopoulos N, Muanza T. Radiation-Induced Oral Mucositis. *Front Oncol*. 2017;7:89. Published 2017 May 22. doi:10.3389/fonc.2017.00089

(22) Villa A, Sonis ST. Pharmacotherapy for the management of cancer regimen-related oral mucositis. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(13):1801-1807. doi:10.1080/14656566.2016.1217993

(23) Chen C, Zhang Q, Yu W, Chang B, Le AD. Oral Mucositis: An Update on Innate Immunity and New Interventional Targets. *J Dent Res*. 2020;99(10):1122-1130. doi:10.1177/0022034520925421

(24) Lee CT, Galloway TJ. Pathogenesis and Amelioration of Radiation-Induced Oral Mucositis. *Curr Treat Options Oncol*. 2022;23(3):311-324. doi:10.1007/s11864-022-00959-z

(25) Lalla RV, Brennan MT, Gordon SM, Sonis ST, Rosenthal DI, Keefe DM. Oral Mucositis Due to High-Dose Chemotherapy and/or Head and Neck Radiation Therapy. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2019;2019(53):lgz011. doi:10.1093/jncimonographs/lgz011

(26) Curra M, Soares Junior LAV, Martins MD, Santos PSDS. Chemotherapy protocols and incidence of oral mucositis. An integrative review. *Einstein (Sao Paulo)*. 2018;16(1):eRW4007. doi:10.1590/s1679-45082018rw4007

(27) Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, et al. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

chemotherapy. Mucositis Study Group. *Cancer*. 1999;85(10):2103-2113. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19990515)85:10<2103::aid-cncr2>3.0.co;2-0

(28) Villa A, Sonis ST. An update on pharmacotherapies in active development for the management of cancer regimen-associated oral mucositis. *Expert Opin Pharmacother*. 2020;21(5):541-548. doi:10.1080/14656566.2020.1718652

(29) Marcussen M, Sønderkær M, Bødker JS, et al. Oral mucosa tissue gene expression profiling before, during, and after radiation therapy for tonsil squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190709. Published 2018 Jan 16. doi:10.1371/journal.pone.0190709

(30) Sonis ST. A hypothesis for the pathogenesis of radiation-induced oral mucositis: when biological challenges exceed physiologic protective mechanisms. Implications for pharmacological prevention and treatment. *Support Care Cancer*. 2021;29(9):4939-4947. doi:10.1007/s00520-021-06108-w

(31) Pels EJ. Oral mucositis and saliva IgA, IgG and IgM concentration during anti-tumor treatment in children suffering from acute lymphoblastic leukemia. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(9):1351-1358. doi:10.17219/acem/64940

(32) Jensen SB, Peterson DE. Oral mucosal injury caused by cancer therapies: current management and new frontiers in research. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(2):81-90. doi:10.1111/jop.12135

(33) Hong BY, Sobue T, Choquette L, et al. Chemotherapy-induced oral mucositis is associated with detrimental bacterial dysbiosis. *Microbiome*. 2019;7(1):66. Published 2019 Apr 25. doi:10.1186/s40168-019-0679-5

(34) Deo PN, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2019;23(1):122-128. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_304_18

(35) Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The Oral Microbiota: Community Composition, Influencing Factors, Pathogenesis, and Interventions. *Front Microbiol*. 2022;13:895537. Published 2022 Apr 29. doi:10.3389/fmicb.2022.895537

(36) Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol*. 2018;4(1):42-66. Published 2018 Jan 12. doi:10.3934/microbiol.2018.1.42

(37) Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*. 2012;18(2):109-120. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01851.x

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(38) Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr*. 2018;6(5):10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018. doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018

(39) Zafar H, Saier MH Jr. Understanding the Relationship of the Human Bacteriome with COVID-19 Severity and Recovery. *Cells*. 2023;12(9):1213. Published 2023 Apr 22. doi:10.3390/cells12091213

(40) Morrison AG, Sarkar S, Umar S, Lee STM, Thomas SM. The Contribution of the Human Oral Microbiome to Oral Disease: A Review. *Microorganisms*. 2023;11(2):318. Published 2023 Jan 26. doi:10.3390/microorganisms11020318

(41) Mark Welch JL, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of the Oral Microbiome: The Site-Specialist Hypothesis. *Annu Rev Microbiol*. 2019;73:335-358. doi:10.1146/annurev-micro-090817-062503

(42) Avila M, Ojcius DM, Yilmaz O. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol*. 2009;28(8):405-411. doi:10.1089/dna.2009.0874

(43) Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(12):745-759. doi:10.1038/s41579-018-0089-x

(44) Vanhoecke B, De Ryck T, Stringer A, Van de Wiele T, Keefe D. Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis. *Oral Dis*. 2015;21(1):17-30. doi:10.1111/odi.12224

(45) Uranga CC, Arroyo P Jr, Duggan BM, Gerwick WH, Edlund A. Commensal Oral Rothia mucilaginosa Produces Enterobactin, a Metal-Chelating Siderophore. *mSystems*. 2020;5(2):e00161-20. Published 2020 Apr 28. doi:10.1128/mSystems.00161-20

(46) Min Z, Yang L, Hu Y, Huang R. Oral microbiota dysbiosis accelerates the development and onset of mucositis and oral ulcers. *Front Microbiol*. 2023;14:1061032. Published 2023 Feb 9. doi:10.3389/fmicb.2023.1061032

(47) Mougeot JC, Stevens CB, Morton DS, Brennan MT, Mougeot FB. Oral Microbiome and Cancer Therapy-Induced Oral Mucositis. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2019;2019(53):lgz002. doi:10.1093/jncimonographs/lgz002

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(48) Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-810. doi:10.1038/nature06244

(49) Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*. 2010;2010:baq013. Published 2010 Jul 6. doi:10.1093/database/baq013

(50) Escapa IF, Chen T, Huang Y, Gajare P, Dewhirst FE, Lemon KP. New Insights into Human Nostril Microbiome from the Expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD): a Resource for the Microbiome of the Human Aerodigestive Tract. *mSystems*. 2018;3(6):e00187-18. Published 2018 Dec 4. doi:10.1128/mSystems.00187-18

(51) Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. Published 2021 Mar 29. doi:10.1136/bmj.n71

(52) Aslam S, Emmanuel P. Formulating a researchable question: A critical step for facilitating good clinical research. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2010;31(1):47-50. doi:10.4103/0253-7184.69003

(53) Ma LL, Wang YY, Yang ZH, Huang D, Weng H, Zeng XT. Methodological quality (risk of bias) assessment tools for primary and secondary medical studies: what are they and which is better?. *Mil Med Res*. 2020;7(1):7. Published 2020 Feb 29. doi:10.1186/s40779-020-00238-8

(54) Sterne JA, Hernán MA, Reeves BC, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ*. 2016;355:i4919. Published 2016 Oct 12. doi:10.1136/bmj.i4919

(55) Sterne JAC, Savović J, Page MJ, et al. RoB 2: a revised tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ*. 2019;366:l4898. Published 2019 Aug 28. doi:10.1136/bmj.l4898

(56) Peterson DE, Boers-Doets CB, Bensadoun RJ, Herrstedt J, ESMO Guidelines Committee. Management of oral and gastrointestinal mucosal injury: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26:v139–51.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(57) Mathes T, Pieper D. Clarifying the distinction between case series and cohort studies in systematic reviews of comparative studies: potential impact on body of evidence and workload. *BMC Med Res Methodol*. 2017;17(1):107. Published 2017 Jul 17. doi:10.1186/s12874-017-0391-8

(58) Stang A. Critical evaluation of the Newcastle-Ottawa scale for the assessment of the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(9):603-605. doi:10.1007/s10654-010-9491-z

(59) Knight R, Vrbanac A, Taylor BC, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(7):410-422. doi:10.1038/s41579-018-0029-9

(60) Zhu XX, Yang XJ, Chao YL, Zheng HM, Sheng HF, Liu HY, He Y, Zhou HW (2017) The Potential Effect of Oral Microbiota in the Prediction of Mucositis During Radiotherapy for Nasopharyngeal Carcinoma. EBioMedicine, 18, 23–31. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.02.002

(61) McGaughey KD, Yilmaz-Swenson T, Elsayed NM, et al. Comparative evaluation of a new magnetic bead-based DNA extraction method from fecal samples for downstream next-generation 16S rRNA gene sequencing [published correction appears in PLoS One. 2019 Feb 19;14(2):e0212712]. *PLoS One*. 2018;13(8):e0202858. Published 2018 Aug 23. doi:10.1371/journal.pone.0202858

(62) Kim YT, Jeong J, Mun S, Yun K, Han K, Jeong SN. Comparison of the oral microbial composition between healthy individuals and periodontitis patients in different oral sampling sites using 16S metagenome profiling. *J Periodontal Implant Sci*. 2022;52(5):394-410. doi:10.5051/jpis.2200680034

(63) Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66(4):271-289. doi:10.3322/caac.21349

(64) Uyl-de Groot CA, Heine R, Krol M, Verweij J. Unequal Access to Newly Registered Cancer Drugs Leads to Potential Loss of Life-Years in Europe. *Cancers (Basel)*. 2020;12(8):2313. Published 2020 Aug 17. doi:10.3390/cancers12082313

(65) Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. 2nd Edition. Chichester (UK): John Wiley & Sons, 2019.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(66) Golder S, Loke YK, Bland M. Meta-analyses of adverse effects data derived from randomised controlled trials as compared to observational studies: methodological overview. *PLoS Med*. 2011;8(5):e1001026. doi:10.1371/journal.pmed.1001026

(67) Falzone L, Salomone S, Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol*. 2018;9:1300. Published 2018 Nov 13. doi:10.3389/fphar.2018.01300

(68) Dobosz P, Dzieciątkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 2019;10:2965. Published 2019 Dec 17. doi:10.3389/fimmu.2019.02965

(69) Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol.* 2018;200:525–40.

(70) Burcham ZM, Garneau NL, Comstock SS, et al. Patterns of Oral Microbiota Diversity in Adults and Children: A Crowdsourced Population Study. *Sci Rep*. 2020;10(1):2133. Published 2020 Feb 7. doi:10.1038/s41598-020-59016-0

(71) Galloway-Peña JR, Smith DP, Sahasrabhojane P, et al. Characterization of oral and gut microbiome temporal variability in hospitalized cancer patients. *Genome Med*. 2017;9(1):21. Published 2017 Feb 28. doi:10.1186/s13073-017-0409-1

(72) Robinson S, Peterson CB, Sahasrabhojane P, et al. Observational Cohort Study of Oral Mycobiome and Interkingdom Interactions over the Course of Induction Therapy for Leukemia. *mSphere*. 2020;5(2):e00048-20. Published 2020 Apr 15. doi:10.1128/mSphere.00048-20

(73) Diaz PI, Hong BY, Dupuy AK, et al. Integrated Analysis of Clinical and Microbiome Risk Factors Associated with the Development of Oral Candidiasis during Cancer Chemotherapy. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(2):49. Published 2019 Jun 13. doi:10.3390/jof5020049

(74) Laheij AMGA, Raber-Durlacher JE, Koppelmans RGA, et al. Microbial changes in relation to oral mucositis in autologous hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Sci Rep*. 2019;9(1):16929. Published 2019 Nov 15. doi:10.1038/s41598-019-53073-w

(75) Jo R, Nishimoto Y, Umezawa K, et al. Comparison of oral microbiome profiles in stimulated and unstimulated saliva, tongue, and mouth-rinsed water. *Sci Rep*. 2019;9(1):16124. Published 2019 Nov 6. doi:10.1038/s41598-019-52445-6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(76) Caselli E, Fabbri C, D'Accolti M, et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):120. Published 2020 May 18. doi:10.1186/s12866-020-01801-y

(77) Chen Y, Shi T, Li Y, Huang L, Yin D. *Fusobacterium nucleatum*: The Opportunistic Pathogen of Periodontal and Peri-Implant Diseases. *Front Microbiol*. 2022;13:860149. Published 2022 Mar 11. doi:10.3389/fmicb.2022.860149

(78) Sato T, Nakazawa F. Coaggregation between Prevotella oris and Porphyromonas gingivalis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014;47(3):182-186. doi:10.1016/j.jmii.2012.09.005

(79) Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, et al. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins (Basel)*. 2021;13(10):677. Published 2021 Sep 23. doi:10.3390/toxins13100677

(80) Otto M. Staphylococcus epidermidis pathogenesis. *Methods Mol Biol*. 2014;1106:17-31. doi:10.1007/978-1-62703-736-5_2

(81) Chi D, Lin X, Meng Q, Tan J, Gong Q, Tong Z. Real-Time Induction of Macrophage Apoptosis, Pyroptosis, and Necroptosis by *Enterococcus faecalis* OG1RF and Two Root Canal Isolated Strains. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:720147. Published 2021 Aug 26. doi:10.3389/fcimb.2021.720147

(82) Zhou P, Manoil D, Belibasakis GN, Kotsakis GA. Veillonellae: Beyond Bridging Species in Oral Biofilm Ecology. *Front Oral Health*. 2021;2:774115. Published 2021 Oct 29. doi:10.3389/froh.2021.774115

(83) d'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon Candida albicans infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(3):fuaa060. doi:10.1093/femsre/fuaa060

(84) Irfan M, Delgado RZR, Frias-Lopez J. The Oral Microbiome and Cancer. *Front Immunol*. 2020;11:591088. Published 2020 Oct 23. doi:10.3389/fimmu.2020.591088

(85) Perera M, Al-Hebshi NN, Speicher DJ, Perera I, Johnson NW. Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to perio-pathogenic bacteria. *J Oral Microbiol*. 2016;8:32762. Published 2016 Sep 26. doi:10.3402/jom.v8.32762

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(86) Pandey H, Tang DWT, Wong SH, Lal D. Gut Microbiota in Colorectal Cancer: Biological Role and Therapeutic Opportunities. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3):866. Published 2023 Jan 30. doi:10.3390/cancers15030866

(87) Herremans KM, Riner AN, Cameron ME, et al. The oral microbiome, pancreatic cancer and human diversity in the age of precision medicine. *Microbiome*. 2022;10(1):93. Published 2022 Jun 15. doi:10.1186/s40168-022-01262-7

(88) Hosgood HD, Cai Q, Hua X, et al. Variation in oral microbiome is associated with future risk of lung cancer among never-smokers. *Thorax*. 2021;76(3):256-263. doi:10.1136/thoraxjnl-2020-215542

(89) Stasiewicz M, Karpiński TM. The oral microbiota and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 3):633-642. doi:10.1016/j.semcancer.2021.11.002

(90) Sepich-Poore GD, Zitvogel L, Straussman R, Hasty J, Wargo JA, Knight R. The microbiome and human cancer. *Science*. 2021;371(6536):eabc4552. doi:10.1126/science.abc4552

(91) Demmitt BA, Corley RP, Huibregtse BM, et al. Genetic influences on the human oral microbiome. *BMC Genomics*. 2017;18(1):659. Published 2017 Aug 24. doi:10.1186/s12864-017-4008-8

(92) Nearing JT, DeClercq V, Van Limbergen J, Langille MGI. Assessing the Variation within the Oral Microbiome of Healthy Adults. *mSphere*. 2020;5(5):e00451-20. Published 2020 Sep 30. doi:10.1128/mSphere.00451-20

(93) Ni J, Yan Q, Yu Y. How much metagenomic sequencing is enough to achieve a given goal?. *Sci Rep*. 2013;3:1968. doi:10.1038/srep01968

(94) Weiss S, Xu ZZ, Peddada S, et al. Normalization and microbial differential abundance strategies depend upon data characteristics. *Microbiome*. 2017;5(1):27. Published 2017 Mar 3. doi:10.1186/s40168-017-0237-y

(95) Brizuela M, Winters R (2023) Histology, Oral Mucosa. Treasure Island (FL): StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK572115/. Accessed 8 May 2023

(96) Bruggeling CE, Garza DR, Achouiti S, Mes W, Dutilh BE, Boleij A. Optimized bacterial DNA isolation method for microbiome analysis of human tissues. *Microbiologyopen*. 2021;10(3):e1191. doi:10.1002/mbo3.1191

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(97) Ramette A. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007;62(2):142-160. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x

(98) Shitozawa Y, Haro K, Ogawa M, Miyawaki A, Saito M, Fukuda K. Differences in the microbiota of oral rinse, lesion, and normal site samples from patients with mucosal abnormalities on the tongue. *Sci Rep*. 2022;12(1):16839. Published 2022 Oct 7. doi:10.1038/s41598-022-21031-8

(99) Liu F, Lu H, Dong B, et al. Systematic Evaluation of the Viable Microbiome in the Human Oral and Gut Samples with Spike-in Gram+/- Bacteria. *mSystems*. 2023;8(2):e0073822. doi:10.1128/msystems.00738-22

(100) Gopinath D, Menon RK, Wie CC, et al. Differences in the bacteriome of swab, saliva, and tissue biopsies in oral cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1):1181. Published 2021 Jan 13. doi:10.1038/s41598-020-80859-0

(101) D'Souza G, Clemens G, Troy T, et al. Evaluating the Utility and Prevalence of HPV Biomarkers in Oral Rinses and Serology for HPV-related Oropharyngeal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2019;12(10):689-700. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-19-0185

(102) Soffritti I, D'Accolti M, Fabbri C, et al. Oral Microbiome Dysbiosis Is Associated With Symptoms Severity and Local Immune/Inflammatory Response in COVID-19 Patients: A Cross-Sectional Study. *Front Microbiol*. 2021;12:687513. Published 2021 Jun 23. doi:10.3389/fmicb.2021.687513

(103) Wright ML, Podnar J, Longoria KD, Nguyen TC, Lim S, Garcia S, Wylie D (2023) Comparison of commercial DNA extraction kits for whole metagenome sequencing of human oral, vaginal, and rectal microbiome samples. *bioRxiv* 2023.02.01.526597. https://doi.org/10.1101/2023.02.01.526597

(104) Kesmodel US. Cross-sectional studies - what are they good for?. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018;97(4):388-393. doi:10.1111/aogs.13331

(105) Wang J, Feng J, Zhu Y, Li D, Wang J, Chi W. Diversity and Biogeography of Human Oral Saliva Microbial Communities Revealed by the Earth Microbiome Project. *Front Microbiol*. 2022;13:931065. Published 2022 Jun 13. doi:10.3389/fmicb.2022.931065

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(106) Thurber RV, Haynes M, Breitbart M, Wegley L, Rohwer F. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat Protoc*. 2009;4(4):470-483. doi:10.1038/nprot.2009.10

(107) Zhang JS, Chu CH, Yu OY. Oral Microbiome and Dental Caries Development. *Dent J (Basel)*. 2022;10(10):184. Published 2022 Sep 30. doi:10.3390/dj10100184

(108) Zafar H, Saier MH Jr. Gut *Bacteroides* species in health and disease. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1-20. doi:10.1080/19490976.2020.1848158

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8

Apéndices

8. APÉNDICES:

8.1 AUTORIZACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia do Servizo Galego de Saúde

galicia

DICTAMEN DEL Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

Paula M. López Vázquez, Secretaria del Comité de ética de la investigación con medicamentos de Galicia (CEIm-G)

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 22/12/20:

Título: Estudio sobre a mucosite oral asociada a tratamentos antineoplásicos sistémicos
Promotor*: Rafael López López*
Tipo de estudio: EPA OD
Version: Versión 2
Código del Promotor: RLL-INM-2020-01
Código de Registro: 2020/552

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del CEIm-G de Galicia

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
C.H. Universitario de Santiago	Rafael López López

NOTA: No procede la participación de personas incapaces/incapacitadas por lo que no aplica la firma por representante legal.

Documento asinado dixitalmente por:
Paula López Vázquez (23/12/2020 12:54)
https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-K4G4-BOAH-OFHO-TH0K-0WEM-6M6E-3160-8724-4417-98

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
ceic@sergas.es

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE

SERVIZO GALEGO de SAÚDE | Xerencia do Servizo Galego de Saúde

galicia

Y HACE CONSTAR QUE:

1. El comité cumple los requisitos legales vigentes aplicables a los Comités de ética de investigación.
2. El comité tanto en su composición como en sus PNTs cumple las Normas de Buena Práctica Clínica (CPMP/ICH/135/95).
3. La composición actual del comité es:

Susana María Romero Yuste (Presidenta). Médico Especialista en Reumatología.
Irene Zarra Ferro. (Vicepresidenta). Farmacéutica de Atención Especializada.
Paula Mª López Vázquez, (Secretaria). Médico Especialista en Farmacología Clínica.
Martina Lema Oreiro (Vicesecretaria). Farmacéutica de Atención Especializada
Rosendo Bugarín González. Médico Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria.
Juan Casariego Rosón. Médico Especialista en Cardiología.
Nuria Carballeda Feijóo. Miembro lego. Representante de los intereses de los pacientes.
Juana Mª Cruz del Río. Trabajadora Social.
Rafael Álvaro Millán Calenti. Asesor jurídico.
Juan Fernando Cueva Bañuelos. Médico Especialista en Oncología Médica.
José Álvaro Fernández Rial. Médico Especialista en Medicina Interna.
José Luis Fernández Trisac. Médico Especialista en Pediatría.
Mª José Ferreira Díaz. Diplomada Universitaria de Enfermería.
Agustín Pía Morandeira. Farmacéutico de Atención Primaria
Jorge Prado Casal. Licenciado en CC. Físicas. Experto en Protección de Datos.
Carmen Rodríguez-Tenreiro Sánchez. Licenciada en Farmacia.
Diego Santos García. Médico Especialista en Neurología.
Juan Vázquez Lago. Médico Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
Mª Asunción Verdejo González. Médico Especialista en Farmacología Clínica..

En Santiago de Compostela,

Documento asinado dixitalmente por:
Paula López Vázquez (23/12/2020 12:54)
https://sede.xunta.gal/cve?idcve=SAOC-K4G4-BOAH-OF4O-TH0K-0WEM-6M6E-3160-8724-4417-98

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Teléfono: 881546425
ceic@sergas.es

8.2. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO APROBADO POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Versión: 1.0, data 08/12/2020.
Deberán firmarse tres copias del Consentimiento Informado, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvieron las muestras, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: **ESTUDIO *SOBRE LA MUCOSITIS ORAL ASOCIADA A TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS SISTÉMICOS.***

Yo, _____

- *He leído la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me ha entregado, he podido conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Al rematar o estudo, os DATOS/MOSTRAS, acepto que sexan:

- ☐ Eliminados.
- ☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigacións.
- ☐ Conservados seudonimizados en la colección indicada previamente.
- ☐ Cedidos gratuitamente a un Biobanco (Requiere firma de consentimiento adicional).

RESTRICCIÓNS DE USO: Non autorizo a empregar a miñas mostras en investigacións que .....

Firmado.: El/la participante,

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

Firmado.:El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Versión: 1.0, data 08/12/2020.
Deberán firmarse tres copias del Consentimiento Informado, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvieron las muestras, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN *(para los casos en que el/la participante no puede leer/escribir)*

El/la testigo imparcial tendrá que identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: ESTUDIO SOBRE LA MUCOSITIS ORAL ASOCIADA A TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS SISTÉMICOS.

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- *Se le ha leído a _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le ha entregado, y ha podido hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Ha comprendido que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudo cuando quiera, sin tenerr que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.*

Al terminar el estudio, los DATOS/MUESTRAS, acepta que sean:

- ☐ Eliminados.
- ☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.
- ☐ Conservados seudonimizados en la colección indicada previamente.
- ☐ Cedidos gratuitamente a un Biobanco (requiere firma de consentimiento adicional).

RESTRICCIONES DE USO: No autorizo a emplear mis muestras en investigaciones que .....
.....

Firmado.: El/la testigo

Firmado.:El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

2

Versión: 1.0, data 08/12/2020.
Deberán firmarse tres copias del Consentimiento Informado, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvieron las muestras, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación.

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: ESTUDIO SOBRE LA MUCOSITIS ORAL ASOCIADA A TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS SISTÉMICOS.

Yo, _____ *, representante legal de -* _____ *:*

- *He leído la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me ha entregado, he podido conversar con:* _____ *y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudo cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen sus datos y mostras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

Al terminar el estudio, los DATOS/MUESTRAS, acepto que sean:

- ☐ Eliminados.
- ☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.
- ☐ Conservados seudonimizados en la colección indicada previamente.
- ☐ Cedidos gratuitamente a un Biobanco (requiere firma de consentimiento adicional).

RESTRICCIONES DE USO: No autorizo a emplear mis muestras en investigaciones que .....

Firmado.: El/la representante legal,

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

Firmado.:El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos:_____

Fecha:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.3. HOJA DE INFORMACIÓN A EL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A APROBADA POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Versión: 1.0, data 08/12/2020.
Deberán firmarse tres Consentimientos Informado, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvieron las muestras, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación.

HOJA DE INFORMACIÓN A EL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: *ESTUDIO SOBRE LA MUCOSITIS ORAL ASOCIADA A TRATAMIENTOS ANTINEOPLÁSICOS SISTÉMICOS.*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. *Rafael López López*
CENTRO: Servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela

Este documento tiene por objeto ofrecerle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética da Investigación Clínica de Galicia.

Si decide participar en el mismo debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea puede llevarse el documento, consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin obligación de dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a la relación con los profesionales sanitarios que le atienden ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

La mucositis oral es uno de los principales efectos secundarios en pacientes que reciben terapias anti-neoplásicas sistémicas. Actualmente no existe ningún tratamiento suficientemente eficaz, ni estrategias preventivas adecuadas en el abordaje de la mucositis oral, lo que nos lleva al uso de métodos dirigidos a paliar en cierta manera los síntomas.

La finalidad de este estudio consiste en evaluar los cambios que se pueden desarrollar en los pacientes que reciben tratamiento contra el cáncer y, por consiguiente, desencadenar una mucositis oral que afecte a su calidad de vida. En el estudio se establecerá una comparativa entre un grupo de pacientes que recibe tratamiento quimioterápico sistémico con otro que recibe inmunoterapia o terapias dirigidas, además los parámetros serán contrastados con los datos obtenidos de un grupo control integrado por individuos sanos y que, por lo tanto, no padecen cáncer ni reciben tratamiento para dicha patología. La finalidad de este estudio no es en ningún momento la evaluación de la efectividad del tratamiento, sino ver cómo cada uno de los tipos de tratamiento afecta a la microbiota oral y por consiguiente en el desarrollo de mucositis oral. Resulta relevante mencionar que la decisión sobre el tratamiento que el/la paciente va a recibir se realiza con anterioridad a su inclusión en este estudio y que nunca influirá la participación en el presente estudio sobre la decisión clínica de la mejor opción terapéutica.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Usted ha sido invitado a participar porque padece/está diagnosticado de neoplasia maligna y va a recibir tratamiento quimioterápico/ inmunoterapia o terapia dirigida, y además no padece ningún problema o patología que pueda suponer un riesgo extra como consecuencia de las intervenciones llevadas a cabo en el estudio. Por el contrario, si pertenece al grupo control, porque no padece el problema/enfermedad objeto de estudio y servirá para comparar los parámetros de los participantes enfermos con los parámetros de su grupo.

¿En que consiste mi participación?

La participación en este estudio requiere de la recogida de datos demográficos y clínicos, así como la obtención de distintas muestras biológicas de los individuos incluidos (biopsia oral, muestra de sangre y muestra de saliva) y fotografías. Estas muestras serán recogidas en un

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

primer momento antes, y lo más próximo a la administración de la primera dosis de tratamiento anti-neoplásico, una vez establecido el diagnóstico y realizada la prescripción. El tipo de tratamiento será un criterio esencial para la adjudicación del grupo de estudio en el que será incluido. La segunda etapa de recogida de muestras se realizará entre los días 10-12 tras la administración de la primera dosis de tratamiento, dado que son los días en los que se espera una mayor incidencia de inflamación da mucosa oral. En el caso de los controles (participantes sanos), la toma de muestras se hará en cualquier momento tras la firma del consentimiento informado.

Un médico cualificado extraerá las muestras de mucosa oral mediante biopsia y un enfermero cualificado extraerá las muestras de sangre y saliva mediante protocolos estrictamente establecidos. Las visitas tendrán una duración aproximada de 30 minutos para a extracción da biopsia oral, muestra de saliva y muestra de sangre. *En el* caso de los controles sanos solo precisarán de la realización de una única visita de 30 minutos en la que se realizarán estas mismas técnicas. En todos los grupos se realizará una visita de seguimiento aproximadamente a los 21 días de la primera visita para una evaluación física e recogida de información.

Biopsia oral.

Consiste en la extracción quirúrgica de una pequeña porción de tejido mucoso bajo anestesia local. Dependiendo del caso, el defecto resultante será suturado o se dejará cicatrizar por segunda intención, quedando por tanto en ambos casos una pequeña cicatriz. Este procedimiento será llevado a cabo por personal facultativo cualificado en dos momentos diferentes, en un primer lugar se realizará una biopsia los días previos al inicio del tratamiento oncológico y una segunda biopsia se realizará entre los días 10 y 12 tras el inicio terapéutico. En el caso de los participantes del grupo control (sanos) solo se realizará una única biopsia en la primera visita.

Todas las dudas que tenga respecto a esta técnica, puede consultarlas al médico que le atiende.

Fotografías.

Firmando el consentimiento y participando en el estudio acepta además su conformidad con la toma de fotografías de su cavidad oral, tomando el borde labial, que no recogerán en ningún caso rasgos faciales que le puedan hacer reconocible/ identificable. Además, las fotografías irán codificadas del mismo modo que las demás muestras, de modo que únicamente el personal investigador será capaz de identificar a qué participante pertenece cada una de las imágenes. Estas fotografías se tomarán en todas las visitas.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

<u>Riesgos derivados de la obtención de la biopsia oral</u>
Siempre existe un riesgo asociado a la toma de muestras mediante biopsia, pero se realizará un seguimiento exhaustivo por si tuviese cualquier problema y le animamos a que comunique cualquier molestia al médico o personal de enfermaría del estudio. Puede haber riesgos o efectos secundarios, que se desconocen o que no se pueden predecir, aunque los más esperados son considerados riesgos mínimos, como un pequeño sangrado o infección localizada en la zona de extracción. Por lo tanto, es importante conocer los antecedentes personales y de posibles alergias a medicamentos del participante. La calidad final de la cicatriz depende, además de la correcta intervención y de los cuidados de la herida, de factores individuales e imprevisibles.

<u>Riesgos asociados a la obtención de muestra de sangre</u>
En el caso de la toma de muestra sanguínea, apenas se presentan riesgos, aun que se puede producir un mínimo hematoma en la zona de punción, por lo que será conveniente que tras la extracción se aplique presión sobre a zona puncionada.

<u>Riesgos asociados a la obtención de muestra de saliva.</u>
No se contemplan riesgos.

<u>Riesgos no físicos</u>
Se adoptarán las medidas necesarias para mantener protegida su información de acuerdo con la legislación vigente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
DE COMPOSTELA

Versión: 1.0, data 08/12/2020.
Deberán firmarse tres Consentimientos Informado, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvieron las muestras, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación.

Consideraciones importantes:

El análisis de las muestras será llevado a cabo a fines únicamente de investigación y nunca para efectuar ningún diagnóstico médico ni para ayudarle en la toma de decisiones. La información de estas pruebas no se anotará en su historia clínica ni se le comunicarán a usted, ni a su representante legal o familiares. Ahora bien si usted lo pidiera, o lo exigiese la ley, se le informará de los resultados generales de la investigación pero solamente una vez que sean publicados.

Las muestras orales serán sometidas a análisis histológicos y microbiológicos, tanto en las dependencias del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (Perteneciente al área de *Xerencia de Xestión Integrada de Santiago de Compostela* del *Servizo Galego de Saúde*), como del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela. Durante la realización del estudio, el cual se estima que terminará aproximadamente en el año 2023, las muestras serán conservadas en el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, en caso de que sea necesario repetir algún análisis relacionado con los objetivos de este ensayo. Durante este proceso, el responsable de las muestras será el personal Investigador vinculado a este proyecto.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que usted obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la mucositis oral en pacientes sometidos a terapias anti-neoplásicas. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio. También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al personal investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Serán publicados los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

Información referente a sus datos/muestras:

La obtención, tratamiento, conservación, comunicación y cesión de sus datos/muestras se hará conforme a lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016), la normativa española sobre protección de datos de carácter personal vigente, la Ley 14/2007 de investigación biomédica y el RD 1716/2011.

La institución en la que se desarrolla esta investigación es la responsable del tratamiento de sus datos, pudiendo contactar con el/la delegado/a de Protección de datos a través de los siguientes medios: dirección electrónica: delegado.proteccion.datos@sergas.es

Los datos/muestras, necesarios para llevar a cabo este estudio, serán recogidos e conservados de modo:

- ***Seudonimizados (Codificados)***, la seudonimización es el tratamiento de datos personales de manera tal que no se pueden atribuir a un/a interesado/a sin que se utilice información adicional. En este estudio solo el equipo investigador conecerá el código que permitirá saber su identidad.

La normativa que rige el tratamiento de datos personales, le otorga derecho a acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

supresión de sus datos. También puede solicitar una copia de los mismos o que ésta sea remitida a un tercero (derecho de portabilidad).

Para ejercer estos derechos puede usted dirigirse al Delegado/a de Protección de Datos del centro a través de los medios de contacto antes indicados o al investigador/a principal de este estudio en la correo electrónico: rafael.lopez.lopez@sergas.es

Solo el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos en el estudio. Se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, a lo exigido por la normativa española y europea.

Al terminar el estudio, y conforme a la normativa, sus muestras biológicas y sus datos podrán ser:

*-**Destruidos***

*-**Anonimizados**, es decir, que se rompe todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra/datos, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.*

*-**Seudonimizados (Codificados)**, conservados en la colección para la línea de investigación: Estudio sobre la mucositis oral asociada a tratamientos antineoplásicos sistémicos, nº C.0006313 dada de alta en la Red Nacional de Biobancos, de la que es titular Rafael López López. En este caso las muestras/datos podrán ser utilizadas para otros estudios en la misma línea de investigación previo informe favorable de un Comité de Ética de Investigación.*

Ud. tendrá a su disposición, si así lo solicita el/la investigador/a toda la información sobre los estudios de investigación en los que se utilice la muestra/datos. Un Comité de Ética decidirá en que casos será imprescindible que se le envíe información de manera individualizada.

Sus datos y muestras quedarán bajo la custodia del responsable de la colección, e solo tendrán acceso a datos que le identifiquen el responsable y su equipo. Las muestras solo podrán ser cedidas a otros grupos de investigación con su consentimiento.

Ud. puede restringir el uso de sus datos y muestras dirigiéndose al responsable de la colección

*-**Cedidas gratuitamente a un Biobanco, para lo cual se le facilitará un documento específico para autorizar dita cesión.***

Usted podrá solicitar la destrucción o anonimización de su muestra en cualquier momento, dirigiéndose al investigador principal. Tiene que saber que esto no será aplicable a los datos resultantes de los análisis que ya hayan sido hechos.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación está promovida por el servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela con fondos aportados por el Grupo de Oncología Médica Traslacional del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar. Es posible que de los resultados del estudio se deriven productos comerciales o patentes; en este caso, Ud. no participará de los beneficios económicos originados.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con Manuel Eros Rodríguez Fuentes en el teléfono 981951582, 981951582 y/o correo electrónico manuel.eros.rodriguez.fuentes@sergas.es.

Muchas gracias por su colaboración.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El daño agudo de la mucosa oral es un efecto secundario común en pacientes oncológicos que reciben tratamientos antineoplásicos sistémicos y los mecanismos fisiopatológicos que la desencadenan todavía se desconocen. Con el objetivo de investigar este evento adverso en pacientes con cáncer no irradiados se llevaron a cabo dos revisiones sistemáticas sobre su prevalencia y acerca de los cambios en el microbioma oral de estos pacientes. Además, se llevó a cabo un estudio piloto para determinar el tipo de muestra oral óptima para un análisis metagenómico. Se determinó una prevalencia del daño agudo en la mucosa oral del 38,2%, se identificaron alteraciones en el microbioma oral de los pacientes sometidos a antineoplásicos sistémicos y el enjuague oral resultó ser la muestra oral con una mayor diversidad alfa bacteriana.