



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

# **Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

Paula Boñar Álvarez

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2019





## **DECLARACIÓN DE LA AUTORA DE LA TESIS**

### **Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

Dña. Paula Boñar Álvarez

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
- 4) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

En Santiago de Compostela, 26 de Marzo de 2019

Fdo Paula Boñar Álvarez





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

### Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello

Dña. María Elena Padín Iruegas

D. Mario Pérez-Sayás García

D. Abel García García

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Paula Boñar Álvarez**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 26 de Marzo de 2019

Fdo. Dña. María Elena Padín Iruegas

Fdo. D. Mario Pérez-Sayás García

Fdo. D. Abel García García





## **DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES**

### **Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello**

Dña. Paula Boñar Álvarez,

Declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

En Santiago de Compostela, 26 de Marzo de 2019

Fdo Paula Boñar Álvarez



## Agradecimientos

Durante estos cinco años son muchas las personas que han hecho realidad este trabajo: a todos y cada uno de ellos, gracias.

Quiero agradecer su apoyo al Profesor Dr. Mario Pérez Sáyan, porque durante este largo y duro camino, no sólo ha sido mi director sino que además se ha forjado una bonita amistad. Gracias por creer en mí desde el principio, por tu esfuerzo y dedicación incondicional durante todo este tiempo, donde no importaba ni el día ni la hora, siempre estuviste ahí. Sin duda has sido una fuente de inspiración y un ejemplo a seguir. Mario, sin ti no hubiese sido posible esta tesis doctoral.

A la Profesora Dra. Elena Padín Iruegas, por sus horas en el laboratorio, sus ánimos y su constancia. Siempre los trayectos a Santiago valían la pena para trabajar al lado de una profesional como ella. Sin duda, ha sido uno de los pilares de este proyecto.

A la Profesora Dra. Pilar Gándara Vila Díaz, por sus sabios consejos y desinteresada ayuda.

Al Profesor Dr. Abel García García, por su confianza para llevar a cabo este proyecto.

Al Profesor Dr. José Manuel Gándara Rey, por iniciarme en el campo de la medicina oral, por compartir sus conocimientos y por permitirme formar parte de este Máster.

Al Profesor Dr. Andrés Blanco Carrión, por la inestimable aportación de pacientes de radioterapia.

A mis compañeros de Máster, por estar ahí siempre que los he necesitado.

Al Departamento de Biología Molecular, por acogerme durante horas en el laboratorio.

A mis padres, por todo el apoyo y cariño que me demuestran día a día.

A Natalia, mi hermana, que sabe que es un pilar fundamental en mi vida.

A Javi, mi marido, por su apoyo y cariño día tras día en este largo camino.

Y a Alicia, mi hija, que me ha dado fuerza en este último tramo para acabar esta tesis doctoral.



# Resumen

El cáncer oral es un patología que merece especial atención; actualmente constituye el 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello y el 3-4% de las neoplasias malignas. La detección precoz favorece la supervivencia a largo plazo, por lo que una exploración minuciosa del paciente es crucial para detectar cualquier cambio en la mucosa que podría generar un carcinoma a largo plazo.

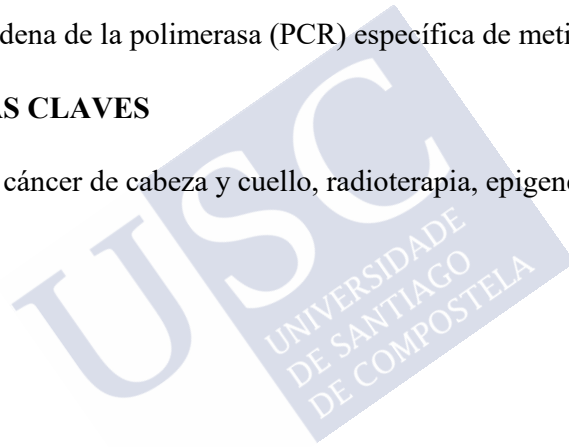
Actualmente los pacientes diagnosticados de este tipo de tumores de cabeza y cuello son tratados con cirugía, radioterapia y quimioterapia, y en muchas ocasiones es necesario recurrir a la combinación de los mismos. El tratamiento con radioterapia ocasiona numerosas secuelas, que dificultan, en gran medida, la vida del paciente, disminuyendo su calidad de vida, por lo que es necesario una atención del paciente irradiado antes, durante y después del tratamiento.

Los factores de riesgo por excelencia, para su desarrollo, son el tabaco y el alcohol, sabiendo que, si cesa la presencia de hábitos tóxicos, se disminuyen las probabilidades del desarrollo del carcinoma. Pero hoy en día, hay que buscar que sucede con los cambios celulares que se producen en las diferentes etapas del ciclo celular, que ocasionan procesos tumorales. El estudio de los diferentes genes implicados en las distintas fases del ciclo celular permitirá establecer patrones de metilación para identificar individuos en etapas iniciales y valorar el pronóstico y la posibilidad de recidivas.

El objetivo de este estudio será estudiar la prevalencia de los efectos secundarios de la radioterapia y analizar el patrón de metilación de determinados genes implicados en el ciclo celular en estos pacientes, antes y después de ser sometidos a radioterapia, para ver si existen variaciones provocadas por ésta, comparándolos con lo que ocurre en personas sanas, consideradas como controles. Para ello se realizará un seguimiento de los pacientes antes, durante y después del tratamiento, analizando el patrón de metilación de diferentes genes, para lo que se obtendrán muestras de ADN de enjuagues salivales y su análisis correspondiente mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica de metilación (MSP).

#### **PALABRAS CLAVES**

Metilación, cáncer de cabeza y cuello, radioterapia, epigenética, saliva



## Resumo

O cancro oral é unha patoloxía que merece especial atención; actualmente constitúe o 90% de todos os cancros de cabeza e pescozo e o 3-4% das neoplasias malignas. A detección precoz promove a supervivencia a longo prazo, de xeito que un exame detallado do paciente é crucial para detectar calquer cambio na mucosa que podería xerar un carcinoma a longo prazo.

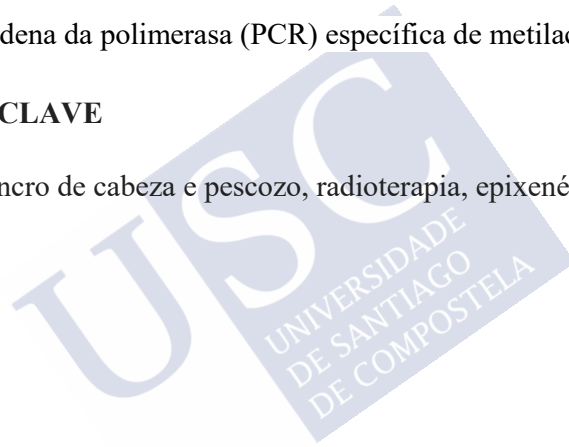
Actualmente os pacientes diagnosticados deste tipo de tumores de cabeza e pescozo son tratados con cirurxía, radioterapia e quimioterapia, e en moitas ocasións é necesario utilizar a combinación dos mesmos. O tratamento de radiación ocasiona numerosas secuelas, que fan difícil, en gran parte, a vida do paciente, reducindo a súa calidade de vida, polo que é necesario unha atención do paciente irradiado antes, durante e despois do tratamento.

Os factores de risco por excelencia, para o seu desenvolvemento, son tabaco e alcol, sabendo que, se cesa a presenza de hábitos tóxicos, diminúense as posibilidades de desenvolvemento do carcinoma. Pero hoxe en día, temos que buscar o que ocorre cos cambios celulares que se producen nas diferentes fases do ciclo celular, que causan procesos tumorais. O estudo de diferentes xenes implicados nas distintas fases do ciclo celular permitirá establecer patróns de metilación para identificar individuos en estadios iniciais e valorar o pronóstico e a posibilidade de recidivas.

O obxectivo deste estudo será estudar a prevalencia dos efectos secundarios da radioterapia, e analizar o patrón de metilación de determinados xenes implicados no ciclo celular nestes pacientes, antes e despois de ser sometidos a radioterapia, para ver se existen variacións provocadas por esta, comparándoos co que ocorre en persoas sas, consideradas como controis. Para iso realizaráse un seguimento dos pacientes antes, durante e despois do tratamento, analizando o patrón de metilación de diferentes xenes, para o que se obterán mostras de ADN de enxoaques salivales e a súa análise correspondente mediante técnicas de reacción en cadea da polimerasa (PCR) específica de metilación (MSP).

#### **PALABRAS CLAVE**

metilación, cancro de cabeza e pescozo, radioterapia, epixenética, saliva



# Abstract

Oral cancer is a pathology that deserves special attention; currently constitutes 90% of all head and neck cancers and 3-4% of malignant neoplasms. Early detection favors long-term survival, so a patient complete examination is crucial to detect any changes in the mucosa that could lead to long-term carcinoma.

Currently patients diagnosed with this type of head and neck tumors are treated with surgery, radiotherapy and chemotherapy, and in many cases it is necessary to resort to the combination of these. Treatment with radiotherapy causes numerous sequelae, which greatly complicate the life of the patient, decreasing their life quality, so it is necessary to care for the patient irradiated before, during and after treatment.

The risk factors par excellence, for its development, are tobacco and alcohol, knowing that, if the presence of toxic habits ceases, the probabilities of carcinoma development are diminished. But nowadays, we have to look for what happens with the cellular changes that take place in the cell cycle different stages, which cause tumoral processes. The study of the different genes involved in the different phases of the cell cycle will allow establishing methylation patterns to identify individuals in early stages and assess the prognosis and the possibility of recurrence.

The objective of this study is to study the prevalence of side effects of radiotherapy and analyze the methylation pattern of determined genes involved in the cell cycle in these patients, before and after being submitted

to radiotherapy, to check if there are any variations due to epigenetic changes, comparing them with what happens in healthy people, considered as controls. For this purpose, patients will be followed before, during and after treatment, analyzing different genes methylation pattern, using DNA samples of salivary rinses and their corresponding analysis by methylation-specific polymerase chain reaction (PCR) techniques (MSP).

## **KEYWORDS**

Methylation, head and neck cancer, radiotherapy, epigenetics, saliva



## Abreviaturas

RTP:	radioterapia
QTP:	quimioterapia
ORN:	osteorradionecrosis
COCE:	carcinoma oral de células escamosas
ICD:	clasificación internacional de enfermedades
OMS:	organización mundial de la salud
VPH:	virus del papiloma humano
NNN:	nitroso-nor-nicotina
NNK:	4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona
ADN:	ácido dexosirribobucleico
Rb:	retinoblastoma
UE:	unión europea
TNM:	clasificación de tumores malignos: T=tamaño; N= nódulos linfáticos; M= metástasis
Gy:	grey
Iridio 192:	Ir192
Yodo125:	I125
ATM:	articulación temporomandibular
EGFR:	receptor de factor de crecimiento epidérmico
C-Met:	factor de crecimiento hepático
STAT:	proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
NF-KB:	factor nuclear kappa
AP-1:	proteína activadora 1
VEGF:	factor de crecimiento vascular endothelial
IL-8:	interleuquina 8

MMP:	metaloproteinasas de la matriz
KDC:	proteínas quinasas dependientes de ciclinas
EFG:	factor de crecimiento epidérmico
MAPK:	proteína quinasas activadas por mitógenos
MEK:	quinasa de reconocimiento de treonina y tirosina
pRb:	proteína supresora de tumores del gen del retinoblastoma
kb:	kilobase
kDa:	kilodalton
GST:	genes supresores de tumores
CH <sub>3</sub> :	grupo metilo
MBD:	proteínas de unión a metil-CpG
ND:	sin datos
APC:	adenomatous polyposis coli
CDH1:	e-cadherin
MGMT:	ADN-06-metilguanina metil transferasa
MLH1:	mutL homolog 1
DAPK1:	death-associated protein kinase 1
RARB2:	regulador transcrpcional nuclear
ECM:	peptidasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular
TIMP-3:	inhibidor tisular de metlalooproteinasas
CCND2:	ciclina D2
TSG-I:	tasa de saliva global en reposo
TSG-II:	tasa de saliva global estimulada
ADA:	american dental association
μl:	microlitro
μg:	microgramo
ARN:	ácido ribonucleico

PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
MSP:	técnica de metilación específica de PCR
pre-RTP:	antes de la radioterapia
post-RTP:	después de la radioterapia
DS:	desviación estándar
M:	primer metilado
U:	primer no metilado
g:	gramos
ml:	mililitro
mg:	miligramos





# Índice

<b>1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>2 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1 Carcinoma oral de Células Escamosas (COCE).....</b>	<b>39</b>
2.1.1 Concepto .....	39
2.1.2 Etiología.....	40
2.1.3 Epidemiología.....	42
2.1.4 Clasificación .....	45
2.1.5 Clínica y localización.....	45
2.1.6 Tratamiento.....	47
2.1.6.1 Complicaciones agudas de la RTP.....	50
2.1.6.1.1 Mucositis.....	50
2.1.6.1.2 Riesgo de infecciones .....	51
2.1.6.1.3 Radiodermatitis.....	52
2.1.6.1.4 Alteraciones de las glándulas salivales.....	53
2.1.6.1.5 Alteraciones del gusto.....	54
2.1.6.2 Complicaciones tardías de la RTP .....	55
2.1.6.2.1 Necrosis de los tejidos blandos.....	55
2.1.6.2.2 Trismus .....	55
2.1.6.2.3 Osteorradionecrosis (ORN) .....	55
2.1.6.2.4 Caries post-irradiación.....	57
2.1.7 Pronóstico .....	59
<b>2.2 Bases Genéticas del cáncer.....</b>	<b>60</b>
2.2.1 Ciclo celular .....	60
2.2.2 Oncogénos.....	64
2.2.3 Principales genes supresores de tumores .....	65
2.2.4 Carcinogénesis .....	69
<b>2.3 Panel de metilación en el cáncer de cabeza y cuello .....</b>	<b>71</b>
2.3.1 Detección de la metilación.....	80
2.3.2 Correlación de la metilación con la progresión y la malignización.....	81

<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>85</b>
<b>3.1 Tipo de estudio .....</b>	<b>87</b>
<b>3.2 Obtención de las muestras del estudio casos-contrroles .....</b>	<b>88</b>
<b>3.3 Selección de los genes a estudiar en el estudio casos-contrroles.....</b>	<b>89</b>
<b>3.4 Variables Clínicas .....</b>	<b>89</b>
<b>3.5 Protocolo ANTES, DURANTE y DESPUÉS DE LA RTP.....</b>	<b>91</b>
3.5.1 Antes de la RTP .....	91
3.5.2 Durante la RTP .....	95
3.5.3 Después de la RTP .....	96
<b>3.6 Protocolo de análisis de las muestras .....</b>	<b>98</b>
3.6.1 Extracción del ADN de las muestras .....	98
3.6.2 Técnica de Transformación con bisulfito .....	99
3.6.3 Técnica de MSP .....	100
3.6.4 Análisis estadístico.....	103
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1 Descriptivo.....</b>	<b>107</b>
4.1.1 Edad y sexo.....	107
4.1.2 Sesiones de RTP .....	107
4.1.3 Estadíos TNM.....	107
4.1.3.1 Distribución de estadíos según sexo .....	107
4.1.3.2 Distribución de estadíos según localización .....	108
4.1.3.3 Distribución de estadíos según hábito tabáquico .....	108
4.1.3.4 Distribución de estadíos según el tratamiento con QTP .....	109
4.1.3.5 Distribución de estadíos según la recurrencia de la enfermedad ....	109
4.1.4 Localización del tumor .....	109
4.1.5 Consumo de alcohol.....	110
4.1.6 Consumo de tabaco .....	110
4.1.7 Situación oral del paciente pre-RTP .....	110
4.1.7.1 Tratamiento bucodental .....	110
4.1.7.2 Infección por cándida.....	111
4.1.7.3 Higiene oral.....	111
4.1.7.3.1 Asociación exodoncias pre-RTP e higiene oral previa.....	111
4.1.7.3.2 Asociación exodoncias pre-RTP y hábitos tóxicos .....	112

4.1.7.4	Cantidad de saliva en reposo y estimulada .....	112
4.1.8	Situación oral del paciente durante la RTP .....	112
4.1.8.1	Mucositis.....	113
4.1.8.2	Radiodermatitis.....	114
4.1.8.3	Infección por <i>Cándida</i> .....	114
4.1.8.3.1	Asociación cultivo pre-RTP-cultivo y final del tratamiento....	114
4.1.8.3.2	Asociación cultivo mitad de la RTP y cultivo final del tratamiento .....	115
4.1.8.3.3	Asociación cultivo pre-RTP y cultivo mitad del tratamiento ..	115
4.1.8.4	Cantidad de saliva en reposo y estimulada .....	115
4.1.8.4.1	Asociación de la media de saliva de TSG-I pre-RTP y la media de TSG-I durante la RTP .....	116
4.1.8.4.2	Asociación tasas salivales y cultivo final .....	116
4.1.8.4.3	Asociación entre tasas salivales y cultivo post-tratamiento a los 3, 6 y 12 meses .....	117
4.1.9	Situación oral del paciente post-RTP.....	120
4.1.9.1	Mucositis.....	120
4.1.9.2	Radiodermatitis.....	121
4.1.9.3	Infección por <i>Cándida</i> a los 3,6 y 12 meses post-RTP .....	121
4.1.9.4	Cantidad de saliva en reposo y estimula post-RTP.....	122
4.1.9.4.1	Asociación de la media de TSG-I pre-RTP y la media de TSG-I post-RTP .....	123
4.1.9.4.2	Asociación de la media de saliva post-RTP I y II al mes, a los 6 meses y a las 12 meses.....	123
4.1.9.4.3	Asociación de la media de saliva TSG-I post-RTP al mes, a los 6 meses y a los 12 meses.....	124
4.1.9.4.4	Asociación de la media de saliva TSG-II post-RTP al mes, a los 6 meses y a los 12 meses.....	125
4.1.9.4.5	Asociación del nivel salival con la RTP .....	125
4.1.9.4.6	Asociación tasas salival y cultivo post-RTP a los 3 meses.....	128
4.1.9.4.7	Asociación tasas salival y cultivo post-RTP a los 12 meses....	129
4.1.9.5	Extracciones post-RTP .....	131
4.1.9.6	ORN .....	131
4.1.9.6.1	Distribución de la ORN según QTP .....	132
4.1.9.6.2	Distribución de la ORN según Estadio .....	132
4.1.9.6.3	Distribución de la ORN según Hábitos Tóxicos.....	132
4.1.9.6.4	Distribución de la ORN según las extracciones pre y post- RTP .....	133
4.1.9.6.5	Distribución de la ORN según la cirugía pre-RTP .....	133

4.1.9.6.6	Distribución de la ORN según el cultivo en la mitad de tratamiento .....	133
4.1.9.6.7	Distribución de la ORN en el control a los 2 años .....	134
4.1.9.6.8	Distribución de la ORN según el estado bucodental a los 2 años y a los 3 años de seguimiento .....	134
4.1.9.6.9	Distribución de la ORN según sus causas de aparición y su momento de aparición y localización. ....	134
4.1.9.6.10	Asociación de la ORN y TSG-II post-RTP a los 3 meses .....	135
4.1.10	Asistencia a visitas de seguimiento.....	136
4.1.11	Recurrencia, Seguimiento y Supervivencia a los 3 años .....	136
4.1.11.1	Análisis del tiempo de supervivencia .....	136
4.1.11.1.1	Estadío .....	137
4.1.11.1.2	Fumadores (número de cigarrillos).....	139
4.1.11.1.3	Recurrencia de la enfermedad .....	139
4.1.11.1.4	Localización.....	140
<b>4.2</b>	<b>Calidad y cantidad de ADN .....</b>	<b>141</b>
<b>4.3</b>	<b>Metilación .....</b>	<b>142</b>
4.3.1	Metilación caso-control pre-RTP.....	143
4.3.1.1	MGMT pre-RTP .....	143
4.3.1.2	p16 pre-RTP.....	143
4.3.1.3	DAPK1 pre-RTP.....	143
4.3.1.4	CCND2 pre-RTP.....	144
4.3.1.5	TIMP-3 pre-RTP.....	144
4.3.2	Asociaciones metilación .....	145
4.3.2.1	Asociación pre/post-RTP metilación en los casos.....	145
4.3.2.2	Cambios metilación pre/post-RTP estudiados en el mismo caso ...	145
4.3.2.3	Asociación de Cambios metilación pre/post estudiados en el mismo caso (enjuague pre-RTP y post-RTP) y los Gy recibidos ...	146
4.3.3	Supervivencia y metilación.....	147
4.3.3.1	Metilación MGMT pre y post-RTP .....	147
4.3.3.2	Metilación DAPK1 pre y post-RTP.....	148
4.3.3.3	Metilación p16 pre y post-RTP.....	150
4.3.3.4	Metilación CCND2 pre y post-RTP.....	151
4.3.3.5	Metilación TIMP-3 pre y post-RTP.....	153
<b>4.4</b>	<b>Modelos de Regresión .....</b>	<b>154</b>

<b>5 DISCUSIÓN.....</b>	<b>157</b>
5.1 Consideraciones generales .....	159
5.2 Datos Clínicos.....	162
5.3 Situación oral del paciente antes de empezar el tratamiento.....	165
5.4 Situación oral del paciente durante el tratamiento .....	168
5.5 Situación oral del paciente después del tratamiento .....	173
5.6 Detección de la metilación en el cáncer de cabeza y cuello .....	180
<b>6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>191</b>
<b>7 BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>195</b>
<b>8 ANEXOS .....</b>	<b>243</b>
8.1 Anexo I Aprobación del comité de ética .....	245
8.2 Anexo II Protocolo pre , durante y post RTP .....	247
8.3 Anexo III Consentimiento informado de la parte retrospectiva en castellano .....	255
8.4 Anexo IV Consentimiento informado de la parte retrospectiva en galego.	262
8.5 Anexo V Consentimiento informado de los casos en castellano .....	269
8.6 Anexo VI Consentimiento informado de los casos en galego.....	277
8.7 Anexo VII Consentimiento informado de los controles en castellano .....	285
8.8 Anexo VIII Consentimiento informado de los controles en galego .....	293
8.9 Anexo IX Capítulo: Radiotherapy and Chemotherapy Treatments in Head and Neck cancer patients-Protocol for Management Before, during and after RTP.....	301
8.10 Anexo X Artículo I: Dental management prior to radiation therapy in patients with head and neck cancer .....	337
8.11 Anexo XI Artículo II: State of Methylation and epigenome studies in some types of head and neck cancer .....	343
8.12 Anexo XII. Permisos para reproducir imágenes .....	355
8.13 Anexo XIII. Material suplementario.....	358



## Índice de ilustraciones

<b>Ilustración 1</b>	Paciente con COCE en el suelo de la boca.....	40
<b>Ilustración 2</b>	Mucositis en Grado 3 en paciente tratado con RTP de cabeza y cuello .....	51
<b>Ilustración 3</b>	Paciente que presenta Radiodermitis tras el tratamiento con RTP de cabeza y cuello.....	53
<b>Ilustración 4</b>	Lengua con aspecto áspero y rugoso provocado por la hipofunción salival.....	54
<b>Ilustración 5</b>	Paciente que presenta ORN en cuarto cuadrante tras realizarle extracciones dentales después del tratamiento con RTP .....	57
<b>Ilustración 6</b>	Caries cervicales en paciente irradiado después del tratamiento con RTP .....	58
<b>Ilustración 7</b>	Fases del ciclo celular. Permitido por la revista MedUNAB (110).....	62
<b>Ilustración 8</b>	Regulación del ciclo celular mediado por Rb y E2F .....	67
<b>Ilustración 9</b>	Inactivación epigenética de un promotor del gen de reparación del ADN.....	69
<b>Ilustración 10</b>	Radiografía panorámica donde se puede ver la situación oral del paciente antes de someterse a tratamiento con RTP.....	131
<b>Ilustración 11</b>	Radiografía panorámica donde se puede ver la situación oral, concretamente los restos radiculares, que presenta el paciente post- RTP.....	131
<b>Ilustración 12</b>	Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de MGMT.....	143
<b>Ilustración 13</b>	Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de P16 ....	143
<b>Ilustración 14</b>	Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de DAPK1 .....	144
<b>Ilustración 15</b>	Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de CCND2.....	144
<b>Ilustración 16</b>	Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de TIMP-3 .....	145



## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b>	Efectos agudos y tardíos de la RTP .....	58
<b>Tabla 2</b>	Cronología de los efectos de la RTP: inmediatos, medio y a largo plazo.....	59
<b>Tabla 3</b>	Evolución de la RTP: efectos reversibles e irreversibles .....	59
<b>Tabla 4</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en p16 .....	72
<b>Tabla 5</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en MGMT .....	75
<b>Tabla 6</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en HLM1 .....	76
<b>Tabla 7</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en DAPK1 .....	77
<b>Tabla 8</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en RASSF-1.....	78
<b>Tabla 9</b>	Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en RARB2 .....	78
<b>Tabla 10</b>	Condiciones MSP.....	102
<b>Tabla 11</b>	Distribución del estadio 1 según la localización.....	108
<b>Tabla 12</b>	Distribución del estadio 2 según la localización.....	108
<b>Tabla 13</b>	Distribución del estadio 3 según la localización.....	108
<b>Tabla 14</b>	Distribución del estadio 4 según la localización.....	108
<b>Tabla 15</b>	Prevalencia de pacientes que presentan mucositis durante las 7 semanas de tratamiento con RTP.....	113
<b>Tabla 16</b>	Prevalencia de pacientes que presentan radiodermatitis durante las 7 semanas de tratamiento con RTP.....	114
<b>Tabla 17</b>	Medias de tasas salivales en reposo y estimulada durante las 7 semanas de tratamiento de RTP.....	116
<b>Tabla 18</b>	Prevalencia de pacientes que presentan mucositis post-tratamiento desde el 1 <sup>er</sup> mes hasta los 36 meses post-tratamiento .....	121

<b>Tabla 19</b> Prevalencia de pacientes que presentan mucositis post-tratamiento desde el 1 <sup>er</sup> mes hasta los 36 meses post-tratamiento .....	121
<b>Tabla 20</b> Prevalencia de pacientes que presenta infección por <i>Candida</i> durante el tratamiento con RTP: antes, durante, al final y 3, 6 y 12 meses post-tratamiento .....	122
<b>Tabla 21</b> Medias de tasas salivales en reposo y estimulada de los pacientes después del tratamiento con RTP, desde el 1 <sup>er</sup> mes hasta los 36 meses siguientes. ...	123
<b>Tabla 22</b> Asociación entre la cantidad media de saliva en reposo (TSG-I) y tras estimulación (TSG-II) al mes, a los 6 meses y 12 meses post-RTP .....	124
<b>Tabla 23</b> Asociación entre la cantidad media de saliva en reposo (TSG-I) al mes, a los 6 meses y a los 12 meses post-RTP.....	125
<b>Tabla 24</b> Asociación entre la cantidad media de saliva tras estimulación (TSG-II) al mes, a los 6 meses y a los 12 meses post-RTP.....	125
<b>Tabla 25</b> Asociación entre las tasas de salivación con la dosis de radiación recibida en los pacientes estudiados .....	125
<b>Tabla 26</b> Porcentajes de metilación en los distintos genes estudiados, en pacientes antes y después de recibir la RTP .....	142
<b>Tabla 27</b> Porcentajes de metilación en los genes estudiados en los 23 pacientes control .....	142
<b>Tabla 28</b> Asociación en el estado de metilación de los genes indicados antes y después de la RTP .....	145
<b>Tabla 29</b> Asociación en el estado de metilación de los genes indicados antes y después de la RTP y los Gy recibidos en el mismo paciente .....	146

## Índice de gráficos

<b>Gráfico 1</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a las seis semanas de tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final...117
<b>Gráfico 2</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II al mes de terminar la RTP en función de la positividad para el cultivo a los tres meses post-tratamiento.....118
<b>Gráfico 3</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a las dos semanas de tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los seis meses post-tratamiento .....118
<b>Gráfica 4</b>	Diagrama de cajas donde se aprecian los valores de TSG-I medios durante la RTP en relación a la positividad para cándida .....120
<b>Gráfico 5</b>	Medias salivales post-RTP al mes, a los 6 meses y 12 meses.....124
<b>Gráfico 6</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I al mes de terminar la RTP en función de la positividad para el cultivo final.....126
<b>Gráfico 7</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final .....127
<b>Gráfico 8</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final .....127
<b>Gráfico 9</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II al mes de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los 3 meses post-tratamiento .....128
<b>Gráfico 10</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los tres meses post-tratamiento.....129
<b>Gráfica 11</b>	Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II a los tres meses de terminar el tratamiento en función de la ORN .....135
<b>Gráfico 12</b>	Porcentaje de supervivencia de los 83 pacientes tras el seguimiento durante 3 años.....137
<b>Gráfico 13</b>	Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de su estadio tumoral .....138

<b>Gráfico 14</b>	Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de su estadio tumoral codificado.....	138
<b>Gráfico 15</b>	Curva de supervivencia de los pacientes en relación con la variable fumador .....	139
<b>Gráfico 16</b>	Análisis de la supervivencia de los pacientes en base a la recurrencia de la enfermedad .....	140
<b>Gráfico 17</b>	Curva de supervivencia de la población estudiada en función de la localización tumoral .....	141
<b>Gráfico 18</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen MGMT pre-RTP .....	147
<b>Gráfico 19</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen MGMT post-RTP.....	148
<b>Gráfico 20</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen DAPK1 pre-RTP.....	149
<b>Gráfico 21</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen DAPK1 post-RTP .....	149
<b>Gráfico 22</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen p16 pre-RTP.....	150
<b>Gráfico 23</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen p16 post-RTP.....	151
<b>Gráfico 24</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen CCND2 pre-RTP .....	152
<b>Gráfico 25</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen CCND2 post-RTP .....	152
<b>Gráfico 26</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen TIMP-3 pre-RTP .....	153
<b>Gráfico 27</b>	Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen TIMP-3 post-RTP .....	154

# 1 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





Las pautas actuales de tratamiento en el cáncer de cabeza y cuello implican el uso de radioterapia (RTP) y quimioterapia (QTP). La utilización de la RTP tiene una doble vertiente, por un lado una intención curativa, pero al mismo tiempo desencadena una serie de complicaciones que genera un gran impacto en la calidad de vida del paciente.

Se necesita avanzar en la investigación de paneles de genes que desarrollan el cáncer de cabeza y cuello, ya que en la actualidad son muchos los pacientes que padecen esta enfermedad.

Por otro lado, es necesario el control de estos pacientes durante todo el tratamiento e incluso hasta un año después del mismo, ya que es necesario que conozcan las precauciones que deben de tener y las complicaciones que puedan presentarse.

La complicación más grave es la osteorradionecrosis (ORN) de los maxilares, principalmente asociadas a las extracciones previas y posteriores a la RTP, por lo que unas condiciones bucodentales óptimas en pacientes con cáncer de cabeza y cuello antes de iniciar la RTP aminorará las secuelas derivadas de dicho tratamiento.

Por ello, justificamos esta tesis doctoral en la cual se analizará la prevalencia de los efectos secundarios de la RTP. Además nos centraremos en el estudio de los factores de riesgo tumorales, así como las complicaciones derivadas de la terapia utilizada. Además de estas consideraciones clínicas, profundizaremos en el conocimiento epigenético del tumor, para ello abordaremos el estudio de varios genes implicados en el ciclo celular, estudiando su perfil de metilación y si este sufrirá modificaciones como consecuencia de la terapia aplicada.

### **Objetivo principal**

Estudiar la prevalencia de los efectos secundarios de la RTP y el patrón de metilación de determinados genes en pacientes sometidos a RTP con cáncer de cabeza y cuello.

### **Objetivos secundarios**

1. Cuantificar las necesidades de tratamiento bucodental previas y posteriores, así como durante el tratamiento con RTP en pacientes con cáncer de cabeza y cuello.
2. Estudiar el estado de salud bucodental de estos pacientes a largo plazo.
3. Evaluar las complicaciones de la RTP en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, concretamente mucostis, radiodermitis, hiposialia, candidiasis y ORN, en diferentes momentos del tratamiento.
4. Determinar la prevalencia de ORN y su relación con parámetros clínicos.
5. Estudiar el patrón de metilación de los genes (p16, MGMT, CCND2, DAPK1, TIMP-3) antes y después de ser sometidos a RTP, comparándolos con lo que ocurre en pacientes sanos, considerados como controles.
6. Establecer si existe relación entre parámetros clínico-patológicos y el estado de metilación.

## **2 INTRODUCCIÓN**





## 2.1 Carcinoma oral de Células Escamosas (COCE)

### 2.1.1 Concepto

Existen múltiples definiciones, en la bibliografía, de lo que se conoce como cáncer de cabeza y cuello. Independientemente de la definición que elijamos, todas ellas hacen referencia al grupo de tumores malignos localizados en los senos paranasales, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando, base de lengua), hipofaringe, laringe, cavidad oral (refiriéndose a ella como mucosa oral, encía, paladar duro, lengua y suelo de boca) y glándulas salivales (1).

El término de cáncer oral se emplea, habitualmente en la literatura y en la práctica clínica diaria, como sinónimo de COCE. Siguiendo la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa yugal, mucosa del reborde alveolar superior e inferior y paladar deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados separadamente (2).

El COCE (Ilustración 1) es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral, que se origina a partir del epitelio escamoso que recubre la cavidad oral, constituyendo el 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello y el 3-4% de las neoplasias malignas (3-6).

En cuanto a su crecimiento, comienza como un tumor localizado, para invadir en profundidad (en algunos casos) llegando con el tiempo a producir metástasis en los ganglios linfáticos cervicales próximos y a distancia.



Ilustración 1 Paciente con COCE en el suelo de la boca

### 2.1.2 Etiología

La etiología del cáncer es realmente desconocida, aunque se sabe que es una patología con origen multifactorial. Los factores de riesgo por excelencia son el tabaco y el alcohol que, aunque son factores de riesgo independientes, tienen un efecto sinérgico, (7-9). Otros factores etiológicos serían, el virus de Epstein Bar, el virus del papiloma humano (VPH), la radiación ultravioleta en el cáncer de labio, infecciones, dieta pobre en frutas y vegetales, inmunodepresiones, influencia de una mala higiene oral y la presencia de factores genéticos.

Los estudios epidemiológicos muestran que el riesgo de desarrollar cáncer oral es de cinco a nueve veces mayor para los fumadores que para los no fumadores, y este riesgo puede aumentar hasta 17 veces para los fumadores de 80 o más cigarrillos/diarios (8-13). Un dato alentador para los pacientes fumadores, es que el cese de este hábito, tras un periodo de 10 años, disminuye el riesgo de desarrollar un tumor, llegando a niveles cercanos a los de los no fumadores (14).

En este sentido, el tabaquismo es el responsable del 90% de los cánceres de la cavidad oral en hombres y del 60% en mujeres (15), probablemente porque era un hábito más extendido en el sexo masculino. Existen más de 30 carcinógenos en el humo inspirado del tabaco, dentro de los cuales, los más importantes son el benzopireno y las nitrosaminas específicas del tabaco, nitroso-nor-nicotina (NNN), nitrosopirrolidina, nitrosodimetilamina y 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK). En cuanto al mecanismo de acción de los carcinógenos, estos interfieren en la replicación del ADN produciendo, por tanto, un daño en la replicación de las células, incluyendo aquellas que intervienen en la respuesta inmune (16).

En cuanto a la aparición de segundos tumores primarios y la persistencia del tabaco, es del 30% si continúan fumando y del 18% si cesan el hábito tabáquico (17,18).

En algunas áreas geográficas existe otras formas de consumir tabaco sin combustión, ya sea en forma de “snuff” (tabaco fino molido) o de tabaco de mascar (quid de betel), ambas se han asociado al cáncer oral (19). Concretamente el consumo “quid de betel” se asocia a un incremento de riesgo de cáncer oral en la encía y en el suelo de la boca (17,20).

En lo que respecta al alcohol, es el segundo factor de riesgo por excelencia. El riesgo de cáncer en pacientes bebedores es seis veces mayor que en no bebedores, y el riesgo de muerte por cáncer de orofaringe es cuatro veces mayor en los bebedores (17,21). El alcohol actúa provocando una irritación en la mucosa oral, aumentando la permeabilidad de la misma, permitiendo, así, el paso de otros agentes carcinógenos como el tabaco. Es importante recalcar que el riesgo de desarrollar un tumor oral pasa de 1, en los consumidores de < 25 gramos (g) de alcohol/ día, a 125 en los que consumen > 100 g/día. Los “licores oscuros” como el whisky, el ron añejo

y el coñac, contienen mayor proporción de carcinógenos éter y acetaldehído que los licores ligeros (vodka, ginebra, ron claro); la proporción de cáncer hipofaríngeo y de laringe supraglótica es mayor en los consumidores de alcoholes oscuros; los consumidores de vino y cerveza tienen mayor proporción de cáncer de la cavidad oral (22,23).

La evidencia reciente sugiere que los VPH pueden estar asociados con algunos cánceres orales y orofaríngeos. El VPH 16 se ha detectado en hasta un 22% de los cánceres orales y el VPH-18 en el 14% de los casos (24). La activación oncogénica, en el VPH, se lleva a cabo a través de la interacción proteína-proteína; así la proteína E7, codificada por el VPH-16 y 18, interacciona con la proteína p105rb codificada por el gen humano del retinoblastoma (Rb), y la proteína p53, codificada por el gen del mismo nombre. Ambas proteínas poseen propiedades represoras de la proliferación celular y estas propiedades quedan anuladas después de la interacción del virus con dichas proteínas, por lo que se desencadena la proliferación celular incontrolada (25).

Finalmente, indicar que la exposición solar prolongada presenta un mayor riesgo de desarrollar un carcinoma en el labio, fundamentalmente en el labio inferior. Esta exposición solar prolongada conduce a una serie de cambios preneoplásicos (queilitis actínica) y, si esta se prolonga en el tiempo, se podría desarrollar un carcinoma labial (5,26).

### **2.1.3 Epidemiología**

La incidencia de cáncer de cabeza y cuello se ha incrementado significativamente en los últimos 20 años. Corresponde al 90% de todos los cánceres que aparecen en la cavidad oral. Es una enfermedad que afecta predominantemente a varones que a mujeres con una proporción 2:1 y 4:1

sin embargo, esa disparidad se está volviendo menos acentuada debido al aumento del consumo del tabaco y el alcohol de la mujer (27).

Frecuentemente se establece a partir de 40 años de edad, con un pico máximo en la década de los 60 años (28). En países como Estado Unidos, la mediana de edad, en el momento del diagnóstico, fue de 62 años (29). Tan sólo el 6% de los cánceres orales ocurren en menores de 45 años (30).

El cáncer oral es el sexto cáncer más común a nivel mundial; sin embargo este tipo de tumor se caracteriza por marcadas variaciones geográficas en su incidencia y tasas de prevalencia, así, en países subdesarrollados, como Asia central, es el tercer tipo de cáncer más común (31,32).

La ubicación geográfica es una variable importante para la aparición de cáncer oral, ya que las poblaciones de bajo nivel socioeconómico están en mayor riesgo de desarrollar cáncer oral debido a la falta de conciencia sobre los efectos nocivos de los factores de riesgo evitables de cáncer oral como son el tabaco y el alcohol (31,32).

Las áreas geográficas que presentan altas tasas de incidencia de cáncer oral (excluyendo el labio) se encuentran en el sur y el sudeste de Asia (por ejemplo, Sri Lanka, India, Pakistán y Taiwán), partes de Occidente (por ejemplo, Francia) y Europa del Este (por ejemplo, Hungría, Eslovaquia y Eslovenia), partes de América Latina y el Caribe (por ejemplo, Brasil, Uruguay y Puerto Rico) y en las regiones del Pacífico (31).

En países de alto riesgo como Sri Lanka, India, Pakistán y Bangladesh, el cáncer oral es el cáncer más común en los hombres y puede contribuir hasta el 25% de todos los casos nuevos de cáncer (31,32).

A pesar de los avances en cirugía, RTP y QTP, la tasa de supervivencia a cinco años, del cáncer oral, no ha mejorado significativamente durante las últimas décadas y sigue siendo del 50 a 55% (33,34).

En 2004, se registraron 67.000 casos nuevos en los países de la Unión Europea (UE). En general en la UE, el cáncer oral y el de faringe ocupan el séptimo lugar (35). Sin nos adentramos en la UE, las tasas de incidencia masculina más altas se encuentra en Francia y Hungría, y las más bajas en Grecia y Chipre (36).

Se estima que el riesgo de desarrollar cáncer oral en los países europeos es de 1,85% para los hombres y 0.37% para las mujeres (35). Las tasas más altas de mortalidad se localizan en Europa del este, sin embargo la incidencia es mayor en Europa occidental si la comparamos con Europa del norte o del sur (31).

En nuestro país, la incidencia es de 5,7-12,9 casos por 100.000 hombres/año y de 0,6-2,1 casos por 100.000 mujeres/ año, aunque estas cifras se están igualando con la adopción por parte de la mujer de hábitos nocivos similares a los de los hombres (37).

Indicar, además, que tanto en la población europea como en la estadounidense, la lengua es el lugar más frecuente de localización de cáncer intraoral, suponiendo entre un 40-50% del total de los tumores orales (31).

Un factor clave para poder disminuir la incidencia de este tipo de lesiones es realizar un diagnóstico precoz. Insistir en programas de concienciación de la población para que ante cualquier lesión sospechosa de malignidad acudan al especialista para así mejorar la supervivencia, porque actualmente el 50% de los pacientes llegan en estadios avanzados, con pronósticos malos, lo que implica unas elevadas tasas de mortalidad.

### 2.1.4 Clasificación

Pierre Denoix describió en 1944 la primera clasificación TNM para describir la extensión de los tumores (38), donde (T) hace referencia al tamaño del tumor principal, la extensión de la propagación a los ganglios o nódulos linfáticos regionales (N) y el desarrollo de metástasis a distancia (M). Hoy en día, se acepta la clasificación desarrollada por la “American Joint Commite on Cancer”, donde se incluye la clasificación TNM y el estadiaje clínico. El sistema TNM es muy útil para establecer un buen diagnóstico, plan de tratamiento y establecer un pronóstico de la enfermedad (39,40).

La presencia y el número de adenopatías regionales metastásicas son el factor pronóstico más importante en los pacientes con cánceres de cabeza y cuello (41).

### 2.1.5 Clínica y localización

La forma clínica de presentarse el COCE es por la presencia de una úlcera (lesión exofítica, ulcerativa y verrugosa) que en estadios iniciales es prácticamente indiferenciable; sin embargo en estadios avanzados la clínica es tan característica que siempre hay una clara sospecha de malignidad (lesión sobreelevada, dura, de suelo y márgenes irregulares).

Siempre que estemos ante una úlcera de tiempo de evolución que no cicatriza debemos de eliminar cualquier agente físico o químico que produzca la irritación, y si en 15 días no desaparece, biopsiar y proceder al consecuente estudio anatomopatológico (42-44).

El diagnóstico clínico debe de ser muy minucioso, explorando mucosas, suelo de boca, lengua, en definitiva, todas las localizaciones donde con frecuencia puede asentarse el COCE, además de explorar la cadena ganglionar para descartar la presencia de metástasis (45).

En cuanto a la sintomatología, el dolor puede aparecer tempranamente en algunos de estos tumores, concretamente éste suele asociarse a los tumores de suelo de boca o lengua; suele aparecer sólo cuando las lesiones han alcanzado un tamaño importante, y es el momento en que el paciente solicita consulta médica, por lo que los carcinomas tempranos a menudo pasan desapercibidos, porque son asintomáticos.

Otros síntomas que puede presentar el paciente serían disfagia, hemorragia, disfonía, movilidad y/o pérdida de dientes, anestesia, tumoración y trismus (45,46).

Debemos prestar mucha atención en aquellos pacientes que presentan lesiones pre-malignas como leucoplasia o/y eritroplasia, ya que pueden desarrollar a largo plazo un COCE.

El COCE puede aparecer en cualquier localización, pero hay ciertas áreas de la cavidad oral en las que es más prevalente. La localización más frecuente de la cavidad oral es la lengua, concretamente el borde lateral y el suelo de boca (47,48). También pueden aparecer en otras localizaciones como encía, mucosa yugal, paladar blando y duro, zona trigonoretromolar, orofaringe y labio (concretamente, la localización labial suele ocurrir o asociarse en áreas o localizaciones geográficas que tienen una mayor exposición solar).

### 2.1.6 Tratamiento

Los pacientes diagnosticados de este tipo tumoral, son tratados mediante cirugía, RTP, QTP o un tratamiento combinado; la selección de un tratamiento único o no, depende, principalmente de la localización del tumor, su extensión, el subtipo histológico, el estadio tumoral y las condiciones generales del paciente (49,50).

La cirugía y la RTP son utilizadas de manera aislada para tratar casos de enfermedad en estadios iniciales, no metastásicos, eliminándose el tumor con márgenes de seguridad (estadio I y II), pero en los estadios avanzados (III y IV) se tratan mediante cirugía combinada con RTP y QTP. Como indicábamos, en estadios iniciales, el tratamiento de elección es el quirúrgico, eliminándose el tumor con márgenes de seguridad y con o sin vaciamiento cervical según la localización, el tamaño y la sospecha de metástasis regional. El vaciamiento cervical se realiza según los diferentes niveles cervicales (I,II,III,IVyV) incluyendo, o no, el nervio espinal, la vena yugular interna y el músculo esternocleidomastoideo. La glándula submaxilar y la vena yugular externa se incluyen siempre en la cirugía. Una vez realizado el vaciamiento cervical, se analiza histopatológicamente, y en el caso de estar afectadas las estructuras extirpadas se valora el tratamiento postquirúrgico con RTP (51,52).

Los estadios avanzados pueden ser tratados con cirugía seguida de RTP, pero, con esta terapia, solamente se consigue una curación de un pequeño porcentaje de pacientes, menos del 30%. De hecho, esta combinación sólo cura una minoría de los pacientes, y menos del 30% sobreviven a los 5 años. El control del tumor y la supervivencia son insatisfactorios con estos tratamientos, porque sólo el 30% de los pacientes siguen vivos después de

3 años, mientras que entre el 60% y el 70% tendrán una recidiva locorregional y/o desarrollarán metástasis a distancia, lo que es, en última instancia, la causa principal de muerte en estos pacientes (53).

Pese a estos antecedentes tan poco alentadores, la QTP, junto con la RTP y la cirugía, se asocia con una mayor supervivencia general en los pacientes con cáncer bucal y orofaríngeo.

La QTP consiste en la administración de fármacos citotóxicos capaces de destruir e inhibir el crecimiento y la reproducción celular (incluidas las células malignas) (54). De todos ellos, los más empleados en los cánceres de cabeza y cuello son la bleomicina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluoruracilo, la vinblastina y la ciclofosamida (55).

La administración de QTP puede ser simple o combinada. El uso de fármacos aislados se mostró ineficaz en la inducción de respuestas completas o parciales significativas. Por ello, la tendencia actual es la poliquimioterapia, cuyos objetivos son afectar poblaciones celulares en diferentes fases del ciclo celular, utilizando la acción sinérgica de los fármacos, disminuyendo el desarrollo de resistencias a los mismos y promoviendo una mayor respuesta por dosis administrada (55). Entre las combinaciones más usadas destacan: a) cisplatino y 5-fluoracilo; b) cisplatino, 5- fluoracilo y taxol o c) cisplatino, bleomicina y metotrexato (56).

Los citostáticos ofrecen mejores resultados en los tumores con una importante fracción de crecimiento y/o diseminación a distancia temprana o frecuente como por ejemplo los linfomas (90% de fracción de crecimiento). Éste no es el caso del carcinoma de células escamosas, (25% de fracción de

crecimiento), por lo que la QTP suele emplearse siempre asociada a otra modalidad terapéutica (57).

La RTP puede aplicarse de forma intersticial (braquiterapia) o externa (teleterapia). La RTP externa es la forma clásica de administración, con la fuente de radiación alejada del organismo. Las fuentes de irradiación externa son el bajo voltaje (rayos X), supervoltaje (cobalto 60), megavoltaje (acelerador lineal) y el haz de electrones (fuente eléctrica), de los cuales los más empleados para la terapia de cabeza y cuello son el cobalto 60 y el acelerador lineal de partículas (58).

La RTP convencional consiste en un dosis de 10 Grey (Gy) semanales, 2 Gy diarios durante 5 días y 2 días de descanso, generalmente repartidos en un período de 5 a 7 semanas (50). La RTP fraccionada permite aplicar una dosis total de radiación elevada en el tumor, respetando el tejido normal adyacente y disminuyendo, por tanto, la toxicidad. También condiciona la respuesta en los tejidos sanos y tumorales mediante la reparación de las lesiones, ya que el tejido normal repara mejor el ADN dañado, sobre todo a dosis bajas, que el tejido tumoral. Además favorece la reoxigenación de las células tumorales, aumentando su radiosensibilidad y la repoblación del tejido entre las fracciones, especialmente durante los descansos semanales, cuando la zona no es irradiada, reduciendo de ese modo los efectos tempranos, como mucositis y radiodermatitis entre otros (59).

La dosis de radiación va a depender de la localización y el tipo de tumor y de si la RTP se emplea sola o asociada a otras terapias. Cuando la RTP es el tratamiento de elección se suelen dar dosis entre los 60-80Gy, mientras que cuando es postquirúrgica se administran dosis de 50-60Gy (3).

La braquiterapia, por otro lado, es un método que usa radiaciones ionizantes, situando el material radioactivo en las proximidades o en el interior del tumor. Existen diferentes modalidades de braquiterapia, de las cuales la más empleada para los tumores de cabeza y cuello es la RTP intersticial. El Iridio 192 (Ir192) y Yodo 125 (I125) son las fuentes radiactivas más comunes en esta modalidad (55).

Muchas son las secuelas que, generalmente, produce la RTP y que afectan, en gran medida, la calidad de vida del paciente. Las complicaciones que provocan a nivel de la esfera orofacial las podemos clasificar en agudas y tardías (60).

### **2.1.6.1 Complicaciones agudas de la RTP**

#### **2.1.6.1.1 Mucositis**

Consiste en la reacción inflamatoria de la mucosa orofaríngea que aparece como resultado de los efectos citotóxicos de la RTP. La mucositis es dosis-dependiente, por lo tanto, desaparece con el cese de la agresión (61).

Su primer signo es el eritema que aparece cuando se acumula una dosis de 10 Gy (primera semana) y persiste hasta unos 15 días después de la finalización de la RTP. El punto de máxima sintomatología se produce cuando se acumulan dosis de 60-70 Gy (62,63).

Clínicamente la mucosa está eritematosa, edematosa por lo que puede ulcerarse y sobreinfectarse por hongos (62,64). El dolor que acompaña a la mucositis puede ser tan intenso, que altere la calidad de vida del paciente

llegando a limitar funciones bucales básicas como hablar, deglutir saliva o alimentarse (64).

Esta mucositis (Ilustración 2) por radiación se puede clasificar en 4 grados según la intensidad de la afectación de la mucosa (5,65,66): Grado 1: ninguno; Grado 2: eritema; Grado 3: eritema, úlceras, pero capaz de ingerir sólidos; Grado 4: úlceras pero requieren dieta líquida, y Grado 5: imposible la alimentación por vía oral.



Ilustración 2 Mucositis en Grado 3 en paciente tratado con RTP de cabeza y cuello

#### **2.1.6.1.2 Riesgo de infecciones**

La RTP facilita el desarrollo de infecciones oportunistas, fundamentalmente por Cándidas, como consecuencia de la disminución de saliva, uso de prótesis dentales, higiene oral deficiente y la persistencia de hábitos como el consumo de alcohol y tabaco (67). Este tipo de infecciones suele desaparecer con antimicóticos de uso tópico, pero el paciente irradiado, con frecuencia, ha de recurrir a fármacos de uso sistémico más efectivos (68).

### 2.1.6.1.3 Radiodermatitis

Con este término, nos referimos a la toxicidad que sufren la piel y tejido celular subcutáneo, y se clasifica, en función de su severidad, en tres niveles.

El eritema transitorio se produce por la congestión de los capilares dérmicos en las primeras 24 horas; con una dosis de 3 Gy es suficiente para desencadenarlo. Una dosis de 25 Gy va a producir una aceleración del proceso descamativo de la piel que se manifiesta como una disminución importante de su espesor, tornándose oscura y atrófica y descamándose, lo que se denomina Radiodermatitis Seca.

La dosis de 50-70 Gy va a ocasionar un eritema tardío, seguido de una necrosis superficial y la formación de costras cutáneas. Si estas lesiones progresan, pueden aparecer vesículas (Ilustración 3) que sangran con facilidad, lo que se denomina Radiodermatitis Húmeda.

Estas lesiones curan al finalizar el tratamiento de RTP, dejando unas cicatrices en la piel que pueden ser blanquecinas, escleróticas, telangiectásicas, quedando destruidos los bulbos pilosos y, en ocasiones, aparecen pigmentaciones (5).



**Ilustración 3** Paciente que presenta Radiodermitis tras el tratamiento con RTP de cabeza y cuello

#### **2.1.6.1.4 Alteraciones de las glándulas salivales**

La mayoría de los pacientes con cánceres de cabeza y cuello sometidos a RTP sufren una xerostomía o hipofunción salival (Ilustración 4). Suele aparecer en las primeras semanas de la radiación. En dosis bajas (menos de 30 Gy) se cree que el daño puede ser reversible, aunque en dosis más altas (más de 60-70 Gy) se produce xerostomía irreversible y permanente, debido a una degeneración significativa de los acinos que se ve reflejada en la inflamación concomitante y la fibrosis del intersticio.

La hipofunción salival (flujo salival en reposo de menos de 0,2 ml por minuto o estimulado con un flujo de menos de 0,7 ml por minuto) es causada por el daño de la radiación ionizante directa en las células de las glándulas salivales (69). Es la secuela más persistente en los pacientes que reciben RTP de cabeza y cuello. Se caracteriza por cambios en la cantidad y calidad de la saliva (más viscosa y escasa), produciendo malestar oral y dolor, un mayor riesgo de caries dental, infección oral, dificultad para hablar, y disfagia, teniendo un efecto perjudicial en la calidad de vida del

paciente (70-72). La reducción del flujo salival también puede aumentar la susceptibilidad a la caries dental y comprometer la integridad de la mucosa (73).



Ilustración 4 Lengua con aspecto áspero y rugoso provocado por la hipofunción salival

#### 2.1.6.1.5 Alteraciones del gusto

La alteración de la sensación de sabor se produce como resultado de la radiación directa en las papilas gustativas y receptores gustativos, así como, a los cambios en la saliva (74-76). Contribuye a la pérdida del apetito por lo que los pacientes presentan una pérdida de peso.

Aparece a los 15 días de comenzar con el tratamiento a partir de los 4 Gy y llega a su máximo esplendor al finalizar la RTP; en la mayoría de los casos, el gusto retorna gradualmente a sus niveles normales, o casi normales, un año post-RTP (77), aunque algunos pacientes pueden conservar una reducción residual del sabor (hipogeusia), daño permanente en la sensación (disgeusia) e incluso pérdida del gusto (ageusia) (78,79).

### **2.1.6.2 Complicaciones tardías de la RTP**

#### **2.1.6.2.1 Necrosis de los tejidos blandos**

Se produce una necrosis de los tejidos blandos caracterizada por una úlcera localizada en el tejido irradiado sin presencia de malignidad residual. Normalmente es una condición dolorosa y los tejidos presentan una coloración pálida y ausencia de flexibilidad (80).

#### **2.1.6.2.2 Trismus**

Se caracteriza por una disminución de la apertura, debido a la contracción e incluso fibrosis de los músculos masticatorios y de la articulación temporomandibular (ATM). Aparece entre tres y seis meses post radiación (67) y puede conducir a problemas en la alimentación, la comunicación, la realización de higiene oral, la prótesis que usa, y en la realización de tratamientos dentales.

#### **2.1.6.2.3 Osteorradionecrosis (ORN)**

La ORN (Ilustración 5) puede llegar a ser la complicación más grave del RTP (81). Se define como una zona de exposición ósea en un campo previamente irradiado, de al menos 6 semanas de evolución y en ausencia de recidiva tumoral (82). La ORN se origina como consecuencia de una reducción de la vascularidad del periodonto, periostio y hueso que ocasiona un tejido hipovascular, hipocelular e hipóxico, donde la capacidad de reparación y regeneración ósea está severamente comprometida (83-85).

Puede ser asintomática o cursar con dolor, disestesia o anestesia en función de su relación con el nervio dentario. Los pacientes refieren halitosis, trismus, disgeusia, impactación de alimentos en la lesión y dificultad en la masticación, deglución y fonación (80). En la mayoría de

los casos la condición es crónica, progresa gradualmente y se vuelve más extensa y dolorosa (83,86).

Existen unos factores de riesgo que pueden desencadenar la ORN, los cuales están relacionados con el tumor, con el paciente o con el tratamiento con la RTP. En cuanto a los factores que depende del paciente nos centramos fundamentalmente en la realización de extracciones después de la RTP (post-RTP), de hecho, la ORN sin cirugía previa ha demostrado ser extremadamente rara, con una incidencia del 2,7% después de 5 años. Otros factores determinantes son la mala higiene oral, la irradiación previa del campo (87) y la presencia de periodontitis, además de malos hábitos como el tabaco y el alcohol. Los factores de riesgo dependiente del tratamiento con RTP se refiere a la dosis administrada, a su fraccionamiento, el tipo de RTP y la zona irradiada. Por último, los factores dependientes del tumor abarcan la localización anatómica, la proximidad o el grado de implicación de las estructuras óseas vecinas, y la etapa y el tamaño del tumor. Todos estos factores se deben de tener en cuenta porque aumentan el riesgo de ORN para así intentar prevenirla (88,89).

La mayoría de los casos de ORN se producen en la mandíbula, donde la vascularización es deficiente y la densidad ósea alta. Las manifestaciones clínicas de ORN pueden incluir dolor, fístulas orofaciales, hueso necrótico expuesto, fractura patológica y supuración (90-92).

Un tercio de los casos de ORN se producen espontáneamente, aunque la mayoría de los casos suceden por exodoncias de dientes durante la RTP o por un tiempo insuficiente de curación después de extracciones antes de la RTP (pre-RTP). Según Starcke et al., Murray et al., y Makkonen et al, cuando se realizan correctamente las exodoncias pre-RTP y se espera el

tiempo necesario, no se ve un aumento significativo del riesgo de ORN (93-95).

La incidencia de ORN es dos veces mayor en pacientes dentados, aunque la mala higiene bucal y el uso continuado de alcohol y tabaco también pueden conducir a su rápida aparición (96), en la literatura hemos encontrado una incidencia y prevalencia entorno al 5-10% (97,98). Una mayor incidencia de ORN se observa después de recibir dosis superior a los 65 Gy, dependiendo del fraccionamiento de radiación, tratamiento con QTP o cirugía en el campo irradiado (99).



**Ilustración 5** Paciente que presenta ORN en cuarto cuadrante tras realizarle extracciones dentales después del tratamiento con RTP

#### **2.1.6.2.4 Caries post-irradiación**

Son muy frecuentes las caries post-irradiación (Ilustración 6), que se inician a los tres meses de finalizar la RTP. Se produce un desmoronamiento y desprendimiento de los prismas del esmalte que afectan, fundamentalmente, a los bordes incisales, cúspides y región cervical de los dientes (5). Éste es el resultado de una alteración cuantitativa y cualitativa de la saliva, con una disminución de su capacidad tampón que favorece el desarrollo de una flora bacteriana acidógena y

cariogénica. Influye también el cambio a una dieta rica en hidratos de carbono de consistencia blanda, una higiene oral pobre y el deterioro de la motivación.

El cambio de la dieta en el paciente irradiado por una más blanda o líquida, con un alto contenido en carbohidratos, junto con una disminución de la saliva hace que se produzca un cambio en la microbiota por una más cariogénica. Esto, sumado a una higiene oral deficiente, ocasiona la desmineralización del esmalte y la destrucción de las coronas y del área cervical, donde el cemento y la dentina quedan expuestos al ambiente oral, provocando gran sensibilidad dental (100).



**Ilustración 6** Caries cervicales en paciente irradiado después del tratamiento con RTP

Las diferentes formas de clasificar los efectos producidos por la RTP, quedan reflejadas en las siguientes tablas 1,2,3.

Efectos	Agudos	Tardíos
	Mucositis	Necrosis de los tejidos blandos
	Radiodermatitis	Trismus
	Infecciones oportunistas	ORN
	Xerostomia	Caries post-irradiación
	Alteraciones en el sentido del gusto	

**Tabla 1** Efectos agudos y tardíos de la RTP

Cronología	Inmediatos	Medio plazo	Largo plazo
	Mucositis	Caries post-irradiación	ORN
	Alteraciones en el gusto	Infecciones Oportunistas	Desórdenes en los dientes
	Xerostomía	Necrosis de los tejidos blandos	
	Radiodermatitis	Trismus	

**Tabla 2** Cronología de los efectos de la RTP: inmediatos, medio y a largo plazo

Evolución	Reversible	Irreversible
	Mucositis	Xerostomía
	Radiodermatitis	Alteraciones en el sentido del gusto
	Xerostomía	Caries post-irradiación
	Alteraciones en el gusto	ORN
	Infecciones oportunistas	Desórdenes en los dientes
	Necrosis de los tejidos blandos	
	Trismus	

**Tabla 3** Evolución de la RTP: efectos reversibles e irreversibles

### 2.1.7 Pronóstico

La tasa global de supervivencia a 5 años en el COCE no se ha incrementado significativamente en los últimos años (33,34). La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% para pacientes con metástasis a distancia (101).

La recidiva en pacientes que han padecido un COCE es generalmente de un 75% durante el primer año, por ello las revisiones mensuales durante el primer año son esenciales para prevenir recurrencias. No es hasta el quinto año libre de cáncer cuando las revisiones pueden hacerse anualmente (56). La presencia de metástasis ganglionares es uno de los factores pronósticos más importantes para el paciente, reduciendo la supervivencia hasta el 50% (41).

La supervivencia global y libre de enfermedad se encuentra en torno al 56% y 58%, respectivamente (102). La lesión primaria es la causa de la mitad de las muertes asociadas al cáncer oral, mientras que un cuarto de las muertes se deben a una segunda lesión primaria y los restantes casos se atribuyen a otras enfermedades (103).

La tarea más importante es conseguir establecer un diagnóstico precoz en las primeras etapas de la enfermedad (104).

## **2.2 Bases Genéticas del cáncer**

### **2.2.1 Ciclo celular**

Para comprender porque se produce la carcinogénesis tenemos que empezar por un recorrido en los procesos más esenciales, como es el ciclo celular. El descontrol del ciclo celular es fundamental en la progresión del cáncer oral (105).

El proceso de carinogénesis es el mecanismo a través del cual se desarrolla una neoplasia (106), incluye diferentes fases en la que aparecen implicados múltiples genes. Hanahan y Wwinberg et al. describieron 6 características distintivas que se repiten en todos los tumores y que denominaron señales del cáncer “Hallmarks of cáncer” y que fueron modificados por Choi et al.(107,108):

- a) Adquisición de señales estimuladoras del crecimiento autosuficientes; entre estas las principales estudiadas son: Factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento hepatocítico (c-Met), oncogen Ras, Ciclina D1, proteínas

transductoras de señales y activadoras de la transcripción (STAT), factor nuclear kappa (NF-KB), proteína activadora 1 (AP-1).

- b) Anormalidades en las señales inhibidores del crecimiento: gen del retinoblastoma (Rb), p53, p21<sup>WAF1</sup>, p16<sup>INKa</sup>
- c) Evasión de la apoptosis.
- d) Inmortalización.
- e) Angiogénesis: factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), interleukina-8 (IL-8).
- f) Invasión y metástasis: E-cadherina, integrinas, metalproteinasas de la matriz (MMP).

El ciclo celular (Ilustración 7) es la base para la reproducción del organismo, consta de un conjunto de eventos que culmina con el crecimiento de la célula y su división (109). Su función no es solamente originar nuevas células sino asegurar que el proceso se realice de forma debida y con la regulación adecuada (110).

La progresión del ciclo celular en las células eucariotas se asocia con la expresión de un conjunto de genes específicos (111-113).

Se encuentra dividido en dos fases bien definidas, la interfase y la fase M. Durante la interfase ocurren todos los procesos celulares y bioquímicos necesarios para que la mitosis se pueda llevar a cabo de manera exitosa y se encuentra dividida en tres fases ordenadas y subsecuentes que se conocen como G1, S y G2 (114).

La Fase G1, que viene del término Gap 1 o intervalo, es la fase donde las células se encuentran metabólicamente activas, donde la célula sólo aumenta de tamaño sin llegar a dividirse, donde sintetiza ARN y proteínas, pero no hay replicación del ADN. Las células en G1 pueden detener su

progresión en el ciclo y entrar en un estado de reposo especial, llamado G<sub>0</sub> o fase de quiescencia, donde pueden permanecer durante días, semanas o años antes de volver a proliferar y en ocasiones nunca más dividirse (110,115,116).

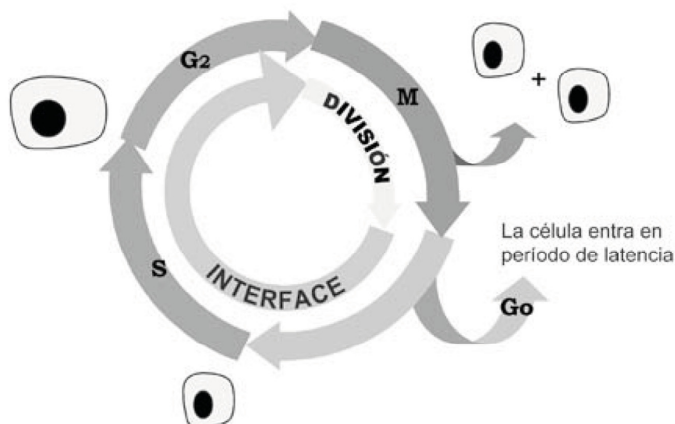


Ilustración 7 Fases del ciclo celular. Permitido por la revista MedUNAB (110)

En la Fase S o de síntesis tiene lugar la replicación del ADN. Antes de la mitosis se debe generar dos juegos de ADN idénticos para ser repartidos entre las dos células hijas (110).

Durante la Fase G<sub>2</sub> ocurre la preparación para la mitosis, se verifica que la duplicación del material genético haya concluido, que la repartición del material genético sea equitativa y que el ADN nuclear no esté dañado (110,117).

En la fase M o fase de mitosis se produce la división nuclear (mitosis) y la división del citoplasma (citogénesis), originando dos células hijas (110).

En cuanto a la duración del ciclo celular existe variabilidad según el tipo de célula y entre las especies (118).

El sistema de control del ciclo celular está regulado por dos familias de proteínas, las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (kdc), las cuales sufren fosforilación sobre sus aminoácidos y las ciclinas, las cuales se unen a las kdc y controlan sus reacciones de fosforilación. Su activación y su desensamblaje son los procesos centrales que dirigen el ciclo celular (110,119-123).

De manera externa o extrínseca algunos factores de crecimiento y otras moléculas de señalización desempeñan un papel fundamental en el control del crecimiento y la proliferación celular (124).

Dentro de las moléculas externas podemos encontrar, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (125), que estimula la división de los queratinocitos orales al unirse con sus receptores de crecimiento epidérmico (EGFR), localizados en la membrana celular de los queratinocitos de la capa basal. La unión entre ligando y receptor activa la proteína RAF y posteriormente da inicio a un proceso en cascada de activación de otras quinasas citoplasmáticas (MEK, MAPK) (126). Esta cascada de activación de quinasas, transmite la señal externa de crecimiento desde la membrana celular hacia el núcleo, donde los niveles de quinasas aumentan bruscamente. La proteína c-myc se une al ADN y estimula la transcripción de la ciclina D, que se une y activa las KdCs. Las KdCs activadas catalizan la fosforilación de la proteína supresora de tumores del gen del retinoblastoma (pRb). La pRb fosforilada (activa) libera los factores de transcripción (E2F) que son necesarios para la transcripción de proteínas de replicación del ADN. La replicación del ADN antecede a la división celular. Las ciclinas D y la mayoría de las proteínas de replicación del ADN se degradan necesitando ser transcritas nuevamente

en cada ciclo de división celular. La mayoría de estas proteínas que transmiten la señal de crecimiento a partir de la membrana hacia el núcleo, son codificadas por oncogenes. Las mutaciones en estos oncogenes pueden estimular la proliferación excesiva de los queratinocitos en el cáncer oral (127).

### 2.2.2 Oncogénes

Las células cancerosas derivan de una sola célula que ha acumulado mutaciones a lo largo del tiempo (128). Las células de los organismos multicelulares están en reposo en ausencia de estímulos y las mutaciones ocurren en genes que controlan la proliferación y/o el ciclo celular, por lo que ha llevado a que los investigadores busquen las causas del cáncer dentro de la célula y en especial, mutaciones en los llamados oncogénes y genes supresores de tumores (129).

Los protooncogénes son secuencias génicas que codifican las proteínas que controlan el crecimiento y la diferenciación celular (106). La mutación o la expresión anormal de estos protooncogénes conducen a la transformación maligna, por lo que se denominan oncogénes (130). Según la función de sus productos proteicos, los oncogénes se pueden dividir en: factores de crecimiento, receptores de membrana, mensajeros citoplasmáticos y factores de transcripción (131).

Sidransky, en 1995, clasificó a los oncogénes en 5 grupos (132):

- I. Factores de crecimiento y receptores de los mismos: *Hst-1*, *int-2*, *EGFR/erbB*, *C-ERBB-2/Her-2*, *sis*.
- II. Transductores de señales intracelulares: *Ras*, *Raf*, *STAT-3*.

- III. Factores de transcripción: *Myc, Fos, Jun, C-myc*.
- IV. Reguladores del ciclo celular: *Ciclina D1*.
- V. Inhibidores de la apoptosis: *Bcl-2, Bax*.

Varios oncogenes han sido implicados en la carcinogénesis oral. La expresión aberrante del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR / c-erb 1) y CCND1/ciclina D1 y miembros de la familia ras, c-myc, int-2, hst-1, PRAD-q, y BCL-1 contribuye al desarrollo del cáncer oral (133).

### 2.2.3 Principales genes supresores de tumores

Los oncogénos no son suficientes para causar cáncer oral. El evento crucial en la transformación de una célula premaligna a una célula maligna es la inactivación de reguladores negativos celulares-genes supresores tumorales, (GST), que provoca la incapacidad de respuesta a los mecanismos de control que regulan la división celular (134); se considera este proceso un evento importante que conduce al desarrollo de la malignidad. Los genes supresores de tumores a menudo son inactivados por mutaciones puntuales, deleciones y reordenamientos en ambas copias de genes (135-137).

#### **Gen Rb**

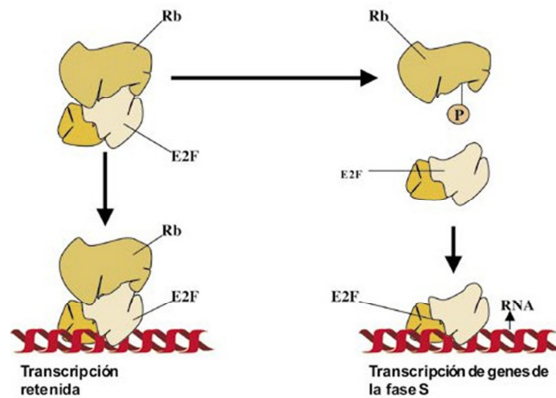
El gen del Rb o proteína Rb es abundante en el núcleo de las células de los mamíferos y se considera el primer gen supresor de tumores conocido (138). Reside en 200 kilobase (kb) de ADN, en el cromosoma 13 y concretamente en la banda 14 y está formado de 27 exones, su proteína está localizada en el núcleo celular y pesa de 10 a 110 kilodalton (kDa). Esta proteína se encuentra en las células en reposo, en fase G0 o G1,

formando un complejo con el factor de transcripción llamado E2F, (que actúa inactivándolo); éste regula la activación transcripcional de varios genes virales y celulares, el cual a su vez regula enzimas que sintetizan nucleótidos y polimerizan el DNA (139).

En G1 o G0, la proteína Rb es fosforilada por las kinasas kdc4 y 6-ciclina; permite la liberación de E2F, es así, que se libera la represión mantenida por el complejo E2F-Rb y los genes requeridos para la fase S y M se activan (Ilustración 8). La pRb fosforilada se asocia principalmente con las kdc 4,6, ciclina D1,2,3, aunque dentro del ciclo existen complejos Rb-kdc2 y ciclinas E (120,140-143).

La ciclina D1 es una proteína inestable fundamental para la progresión de G1 mediante la activación del complejo CDK 4/6 que lleva a la fosforilación de la proteína pRb. La fosforilación de la proteína pRb es esencial para la continuación del ciclo celular. Si pRb no está fosforilada se bloquea el ciclo celular. Se ha encontrado sobreexpresión de Ciclina D en carcinomas orales (26,144-145), asimismo, Koontongkaew et al. ha encontrado sobreexpresión de la proteína pRb en un 58,49% de los carcinomas estudiados (146).

Es importante tener en cuenta que la producción excesiva de D1 dispara la entrada temprana de la célula a la fase S, por lo tanto, en determinado momento D1 puede inactivar la función control de la proteína Rb y permitir a la célula el paso a S. La actividad de la ciclina D1 es inhibida por diversos genes supresores de tumores, entre ellos P16, P21, y P27 (127).



**Ilustración 8** Regulación del ciclo celular mediado por Rb y E2F. La fosforilación de la Rb por el complejo kcd4/ciclina D conlleva a la separación de Rb- E2F. Permitido por la revista MedUNAB (110)

### **P53**

El gen *p53* en humanos reside en 20 kb de DNA del 7p13.1, está compuesto de 11 exones que producen ARNm de 2.2-2,5 kb y se expresan en casi todos los tipos celulares. La proteína del gen *p53* está formada por 393 residuos de aminoácidos y es una fosfoproteína nuclear (130). La proteína *p53* es llamada el “guardián del genoma”, se localiza en el núcleo y es una proteína lábil e inestable; parece estar asociada con múltiples funciones biológicas, entre ellas el crecimiento de la célula, la progresión o detención del ciclo celular, senescencia y apoptosis (147-149).

Las mutaciones en *p53*, generan una síntesis anormal de proteínas. Una proteína *p53* mutada tiende a estabilizarse y acumularse en el núcleo, perdiendo toda capacidad supresora de crecimiento celular, por lo que, la consecuencia del incremento de *p53* es la detención del ciclo celular en G1, actuando mientras los mecanismo de reparación del ADN (138).

Si la reparación del ADN es satisfactoria, p53, activará a un gene denominado MDM2, cuyo producto se une e inhibe a la propia p53, levantando así el bloqueo celular (150); por el contrario, si los daños en el ADN son muy extensos y no puede ser reparado, p53 puede inducir el inicio de muerte celular fisiológica (apoptosis), activando los genes promotores de apoptosis, de ahí el nombre de guardián del genoma, dado que previene la inestabilidad genómica (106).

El bloqueo celular se consigue mediante la inducción de la proteína p21, inhibidora de las KdC. La p21 bloquea la transición G1-S y bloquea también la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular (26,144). P53 se une al ADN en sitios específicos como factor de transcripción. Así, incrementa la transcripción de CKI p21, el cual inhibe a los complejos ciclina A y D con sus respectivos KdCs, bloquea la actividad de KdCs evitando la hiperfosforilación de pRb y por tanto, la activación de genes de fase S (151,152).

Por otro lado, el gen p53 también bloquea la angiogénesis, favorecedora del desarrollo y diseminación tumoral (138).

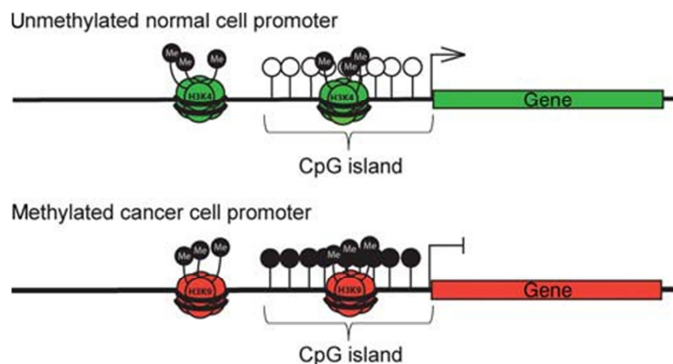
La pérdida de la función de p53 está bien documentada en cánceres orales, y se han informado mutaciones de p53 en más del 60% de los COCE (153). La acumulación del p53 mutado en el epitelio oral maligno ha sido demostrada por varios estudios inmunohistoquímicos (154,155). El p53 elevado en cánceres orales se correlaciona con el tabaquismo intenso pero no con la edad del paciente (156-158). Sin embargo, los pacientes más jóvenes muestran acumulación de p53 durante la progresión maligna (159). Por último, p53 se ha utilizado como un marcador de pronóstico para la terapia actual contra el cáncer de cabeza y cuello (160-163).

### **Gen p73**

El gen p73 en condiciones adecuadas, de igual manera que el gen p53, puede detener el ciclo celular y provocar la apoptosis (150).

#### **2.2.4 Carcinogénesis**

Ya indicamos previamente que la carcinogénesis es el mecanismo a través del cual se desarrolla una neoplasia maligna y que desconocemos muchos de los factores implicados en la misma (164,165); sin embargo, sabemos que el silenciamiento de genes supresores de tumores es fundamental para el desarrollo del cáncer. Este silenciamiento se produce, entre otros, por mecanismos epigenéticos, concretamente las modificaciones post-translacionales de las histonas, principalmente los cambios mediante fosforilación, cambios en la deacetilación y en estatus de ubiquitinización (166-170). El grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) se añade a los nucleótidos de citosina por medio de la enzima ADN-metiltransferasa, inhibiendo con ello la expresión del gen. Algunos de los genes que con frecuencia son metilados son encargados del crecimiento celular y la reparación del ADN (171). (Ilustración 9).



**Ilustración 9** Inactivación epigenética de un promotor del gen de reparación del ADN .Permitido por la revista Journal of Molecullar Cell Biology (172)

Según Larsen et al., existen aproximadamente 45.000 islas CpG, de unos 500 pares de bases, y no están distribuidas casualmente por todo el genoma, apareciendo con mayor frecuencia en la parte promotora de las regiones de genes específicos (173,174). La mayoría de las islas CpG están metiladas para prevenir la inestabilidad cromosómica; además un porcentaje muy alto de estas islas CpG permanecen sin modificaciones durante el desarrollo y en tejidos diferenciados (175).

El código de metilación del ADN debe leerse por celda; la información almacenada por metilación de las islas CpG es en parte interpretada por proteínas de unión a metil-CpG (MBD). Las MBD son importantes "traductores" entre la metilación del ADN y los genes modificadores de histonas que establecen un ambiente de cromatina transcripcionalmente inactivo. Esta familia de proteínas consta de cinco miembros bien caracterizados (MeCP2, MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4) (176). Las proteínas MBD se asocian con promotores isla CpG hipermetilados de genes supresores tumorales y su silenciamiento transcripcional (177,178).

El descubrimiento de que MeCP2 reprime la transcripción de ADN metilado mediante el reclutamiento de un complejo que contiene histona deacetilada estableció por primera vez una conexión mecánica entre la metilación del ADN y la represión transcripcional mediante la modificación de la cromatina (179).

La metilación de ADN puede ser utilizado como posible biomarcador para el diagnóstico precoz, así como para la clasificación, el pronóstico y el tratamiento del cáncer. El perfil de metilación de promotores de genes es diferente para cada tipo de tumor, permitiendo la identificación de patrones de metilación específica de tumores (180). Los genes más frecuentemente

metilados y silenciados en las células del cáncer residen en regiones cromosómicas que muestran pérdida de heterocigosidad (181).

Existen varios factores que podrían desencadenar la metilación del ADN como la radiación, el tabaco, stress, dieta, hormonas (como el estradiol), cadmio, arsénico, níquel, por lo que es importante minimizarlos, ya que juegan un papel importante en la desarrollo del cáncer (182-184).

### **2.3 Panel de metilación en el cáncer de cabeza y cuello**

Los genes que se encuentran metilados en el carcinoma de cabeza y cuello cubren una amplia gama de procesos celulares, incluido el control del ciclo celular (p16, p15), apoptosis (p14, DAPK1, p73 y RASSF1A), Wnt señalización (APC, WIF1, RUNX3), adhesión célula-célula (E-cadherina) y reparación del ADN (MGMT y hMLH1) (185-188).

La búsqueda de biomarcadores para evaluar y medir el estado de los procesos normales y patológicos en biología celular y su respuesta al tratamiento son de suma importancia, por tanto, el tratar de establecer un patrón de metilación para la identificación de individuos en las etapas iniciales del cáncer, así como para estratificar a los pacientes, de acuerdo con el pronóstico del tumor y la respuesta a los perfiles de la terapia, es de suma importancia (189).

#### ***p16/CDKN2A/INK4A***

p16 se localiza en el cromosoma 9p21, inhibe la detención del ciclo celular quinasa dependiente de ciclina 4 y 6, y es vital para el mantenimiento de la proteína del Rb en su estado no fosforilado activo. Las

alteraciones genéticas de p16 conducen a la pérdida de control del punto de restricción en la fase G1 del ciclo celular y favorecen la transformación celular (190). La incidencia de metilación oscila entre el 23% al 76% tal y como podemos observar en la tabla 4 (191-197). La metilación de p16 se asocia con un aumento del tamaño tumoral, estadios más avanzados (estadios III y IV), metástasis ganglionares, mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad y un mal pronóstico (198-200).

Gen	Año	Referencias	Nº de casos	% Metilación
p16	1995	Merlo et al.(201)	ND	ND
	1997	Naggar et al.(202)	ND	ND
	2000	Sánchez-Céspedes et al.(203)	95	27%
	2001	Nakahara et al.(194)	32	50%
		Hibi et al.(204)	31	23%
		Esteller et al.(180)	ND	ND
		Rosas et al.(205)	30	47%
	2002	Huang et al.(193)	48	42%
		Ogi et al.(195)	96	29%
		Hasegawa et al.(206)	80	32%
	2003	López et al.(207)	ND	44%
		Viswanathan et al.(191)	99	23%
		Ai L et al.(208)	100	27%
	2004	Kulkarni et al.(192)	60	67%
		Maruya et al.(196)	32	33%
	2005	Ishida et al.(199)	49	35%
		Tran et al.(209)	27	63%
Puri et al.(210)		62	36%	
2007	Righini et al.(211)	90	29%	
	Calmon et al.(212)	43	63%	
	Sengupta et al.(213)	99	23%	
2008	Shaw et al(214)	79	28%	
2009	Ohta et al.(215)	44	64%	
	De Shutter et al.(216)	46	5%	
	Taioli et al.(217)	80	11,5%	
	Supic et al.(187)	77	58%	
2014	Pierini et al.(218)	97	47,4%	

Tabla 4 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en p16

***P15/CDKN1A/INK4B***

El inhibidor de quinasa dependiente de ciclina se localiza en una región en el cromosoma 9p21 (219). Actúa inhibiendo el crecimiento celular mediante la prevención de la progresión del ciclo celular durante la fase G1; codifica un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, y forma un complejo con Cdk4 / Cdk6 (220). Su porcentaje de metilación varía entre 9% al 23% (191,195,211,213).

Takehima et al. encontró que los tejidos sanos y tumorales adyacentes no presentan típicamente señales de metilación para p15 (221), sin embargo, Yeh et al. en su estudio encontró que entre el 9 y 28% de los tejidos examinados con COCE presentaban metilación del gen p15 (222).

***P53***

El gen P53, se localizado en el cromosoma 17p13. Como se indicó previamente, al alterar la función de P53, se altera la capacidad de las células de responder al estrés o daño, lo que produce una inestabilidad en el genoma. Este gen desempeña un papel en la reparación del ADN, progresión del ciclo celular, la diferenciación celular, y la apoptosis, siendo su función principal ser guardián del genoma. Este gen es el que con más frecuencia se encuentra metilado, el rango de metilación va del 25% a 69% (223-226). Los cambios en p53 surgen, entre otros, de la combinación de exposición al tabaco y alcohol (227).

***Señalización de Wnt***

La vía de señalización Wnt es una compleja red de proteínas con un papel relevante tanto en la embriogénesis como en el desarrollo tumoral. Implicados en esta vía encontramos distintos tipos de genes como, E-

cadherina, APC,  $\beta$ -catenina, CDH3, familia SFRP, WIF1, y DKK3, que frecuentemente están silenciados epigenéticamente en el cáncer. Nos centraremos en el APC y la E-cadherina que son metilados con frecuencia en el COCE.

### ***APC (Adenomatous polyposis coli)***

El APC es un gen supresor tumoral que inhibe indirectamente la proliferación celular a través de la Wnt-1. Su silenciamiento epigenético ocurre en las fases tempranas de la carcinogénesis, lo que ocasiona un aumento del gen  $\beta$ -catenina y por tanto un aumento de la proliferación celular durante la carcinogénesis (228,229). Los trabajos de Gao et al. en líneas celulares en COCE indican un porcentaje de metilación de dicho gen del 25%. Sin embargo Uesugi et al. utilizando muestras tumorales indica que dicho porcentaje es del 15% (229,230).

### **E-cadherin/ CDH1**

El gen CDH1 se encuentra en el cromosoma 16q22.1 y codifica la proteína E-cadherina que está implicada en el mantenimiento del fenotipo epitelial y regula la invasión tumoral (231,232). La metilación y, por tanto, pérdida de su expresión, fue observada en los tumores primarios de la lengua (233,234). Estudios posteriores indican que su metilación se asocia con el comportamiento en cuanto a invasividad y por tanto, peor pronóstico tumoral; así al asociarse a grupos metilo, su expresión es menor o nula, lo que conduce a una mayor probabilidad de invasión tumoral y/o metástasis (174). Su frecuencia de metilación va desde el 17% al 85% (228,233,235,236).

## MGMT (ADN-06-metilguanina metil transferasa)

Una de las señas de identidad del cáncer es la regulación a la baja (downregulation) o silenciamiento de los genes implicados en las vías de reparación del ADN. Dentro de éstas, los más ampliamente estudiados son la Metiltransferasa-6-metilguanina ADN-O (MGMT), MutL homólogo 1 (MLH1).

Situado en el cromosoma 10q26, codifica MGMT, una enzima de reparación del ADN. Este gen repara el genoma cuando sufre daño por alquilación, ya que es capaz de eliminar los grupos alquilo que se encuentran en la posición O6 de la guanina (192,197). La frecuencia de metilación oscila entre el 12% y el 74% según los distintos autores que aparecen en la tabla 5, frente al 9% que se encuentra en la mucosa oral de individuos sanos (237). Su silenciamiento ocurre en etapas tempranas de la carcinogénesis (197) y está relacionado con un estado avanzado de la enfermedad, metástasis en los ganglios linfáticos, un mal pronóstico y baja supervivencia del paciente (197,238).

Gen	Año	Referencias	Nº de casos	% Metilación
MGMT	2000	Sánchez-Céspedes et al.(203)	95	33%
	2001	Rosas et al.(205)	30	23%
	2003	Viswanathan et al.(191)	99	41%
	2004	Zuo et al.(239)	94	18,1%
		Maruya et al.(196)	32	37%
		Kulkarni et al.(192)	60	52%
	2005	Ishida et al.(199)	49	12%
		Puri et al.(210)	62	30%
	2006	Kato et al.(197)	55	56%
		Worsham et al.(240)	ND	20%
	2007	Righini et al.(211)	90	29%
		Sengupto et al.(213)	99	41%
		Sawhney et al.(238)	107	52%
	2008	Lee et al.(241)	69	ND
2010	Kordi-Tamandani et al.(236)	76	74%	

Tabla 5 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en MGMT

## MLH1 (MutL homolog 1)

Localizado en la región del cromosoma [3p21.3], se piensa que la metilación de su región 5' del promotor puede silenciar la expresión de genes MLH1 y, por tanto, regula por disminución la expresión de la proteína. La metilación de MLH1 puede estar asociada con un mayor riesgo de desarrollo de tumores malignos orales (242). En un estudio de González-Ramirez et al. , se encontró metilado el promotor de hMLH1 en 38 (76%) pacientes con COCE, pero en ninguna de las muestras de control; además también sugiere que la metilación del promotor es un evento temprano del cáncer (243). El porcentaje de metilación va desde el 0% al 50% como se muestra en la tabla 6.

Gen	Año	Referencias	Nº de Casos	% Metilación
HLM1	2002	Ogi et al. (195)	96	0%
		Liu et al. (244)	13	92%
	2003	Viswanathan et al. (191)	99	8%
		Liu et al. (245)	8	88%
	2005	Puri et al. (210)	51	23%
	2011	González-Ramirez et al. (243)	38	76%
	2006	Demokan et al. (246)	116	47%
	2014	Pierini et al. (218)	97	46,4%

Tabla 6 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en HLM1

## La apoptosis (*DAPK1, RASSF1A*)

Evento común y frecuente en la carcinogénesis. La resistencia a la apoptosis de las células de cáncer tiene una gran importancia clínica ya que estas células son resistentes a la QTP y RTP. Por lo tanto, la identificación de los puestos de control de la apoptosis en el cáncer puede ofrecer nuevas modalidades terapéuticas para el tratamiento de cáncer. Los genes, que

están involucrados en la apoptosis son los siguientes: DAPK1, p73, y RASSF2.

***DAPK1 (Death-associated protein kinase 1):*** Se localiza en el cromosoma [9q34.1] y tiene un efecto proapoptótico (174,192,197).

Gen	Año	Referencias	Nº de casos	% Metilación
DAPK1	2000	Sánchez-Cespedes et al.(203)	92	18%
	2001	Rosas et al.(205)	30	33%
	2002	Hasegawa et al.(206)	80	24%
		Ogi et al.Ogi et al.(195)	96	7%
	2004	Maruya et al.(196)	32	25%
		Kulkarni et al.(192)	60	68%
		Wong et al.(247)	41	42%
	2006	Worsham et al.(240)	ND	76%
	2007	Calmon et al.(212)	43	81,3%
		Righini et al.(211)	69	27%
	2009	De shutter et al.(216)	46	11,4%
		Supic et al.(187)	77	36,8%
	2011	Radhakrishnan et al.(248)	ND	ND

Tabla 7 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en DAPK1

La frecuencia de metilación de DAPK1 oscila entre un 18% al 81 % como se muestra en la tabla 7. Es un mediador positivo de la muerte celular programada inducida por gamma-interferón, por lo que se ha utilizado como un marcador tumoral (187) mientras que la DAPK1 inactivada, podría conducir a la patogénesis y metástasis del tumor (249). La pérdida de expresión de DAPK1 inducida principalmente por la metilación de su promotor desempeña un papel crucial en la carcinogénesis del tumor (250).

Supic et al. encontró una relación entre la afectación de ganglios linfáticos y la etapa de enfermedad avanzada con la metilación de este gen (187).

## RASSF-1

Situado en 3p21.3, muestra un 7,5% de metilación en cáncer de cabeza y cuello (206). La metilación de este gen se relaciona con tumores agresivos y una supervivencia más corta (241). (Tabla 8).

Gen	Año	Referencias	Nº de casos	% Metilación
RASSF-1	2002	Hasegawa et al.(206)	80	7,5%
	2004	Maruya et al.(196)	32	16%
Wong et al.(247)		41	5%	
	2006	Worsham et al.(240)	ND	84%
	2008	Lee et al.(241)	69	35%
	2009	De Shutter et al.(216)	46	2,4%
		Huang et al.(251)	482	22,4%

Tabla 8 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en RASSF-1

## *Regulador transcripcional Nuclear (RARB2)*

El gen RARB2 (Tabla 9) es un gen supresor de tumores que pertenece a la familia RARB, que se localiza en el cromosoma [9q34]. Se encuentra metilado en el cáncer. El porcentaje de metilación de este gen es en torno al 67% (252). Está muy relacionado con el aumento de la edad en los pacientes, la agresividad de los tumores y el mal pronóstico (241).

Gen	Año	Referencias	Nº de casos	% Metilación
RARB2	2004	Youssef et al.(252)	53	66%
		Maruya et al.(196)	32	53%
	2006	Shaw et al.(228)	79	73%
		Worsham et al.(240)	ND	80%
	2008	Lee et al.(241)	69	46%
	2011	Radhakrishann et al.(248)	ND	ND

Tabla 9 Resumen de los trabajos publicados donde se muestran las alteraciones epigenéticas en RARB2

### ***TIMP-3***

El inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (TIMP-3) pertenece a una familia de genes que inhiben las metaloproteinasas de la matriz (MMP), un grupo de peptidasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (ECM). Ejerce su función en el frente de invasión tumoral, para eliminar la actividad de degradación que sobre la ECM ejercen las MMP asociada al tumor o en el propio estroma, donde las proteasas solubles liberan factores unidos a ECM que ayudan a las células cancerosas en la migración y la invasión.

Numerosos estudios han indicado que los TIMP-3 inhiben la invasión celular, la tumorigénesis, la metástasis y la angiogénesis (253). Por lo tanto, la metilación de TIMP-3 y, en consecuencia, su represión transcripcional, dificultaría su función como inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (MMP), contribuyendo así a la degradación de la matriz extracelular y favoreciendo la migración tumoral.

El estudio de Carvalho et al. , informó que una mayor expresión de MMP9 en los márgenes quirúrgicos histológicamente negativos de carcinoma de cabeza y cuello se asoció con el desarrollo de un segundo tumor primario. MMP9 codifica una gelatinasa que degrada el colágeno tipo IV, el principal constituyente de la membrana basal (254).

La diseminación lateral de clones de tumores malignos implica la aparición de múltiples factores necesarios para que la motilidad celular penetre en la matriz extracelular. Por lo tanto, la inhibición de TIMP-3 por metilación y, en consecuencia, la pérdida de la actividad reguladora de la degradación de la matriz extracelular de MMP puede contribuir al

desarrollo de un segundo tumor primario o de metástasis a distancia. Sun et al. (255) mostró la detección de metilación TIMP-3 en muestras de enjuagues salivales recogidas en diagnósticos asociados con la supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello sin recidivas locales. La detección de la metilación de TIMP-3 en el enjuague salival recolectado, no sólo en el momento del diagnóstico, sino también seis meses después del último tratamiento curativo es un factor pronóstico independiente para los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (256).

### **2.3.1 Detección de la metilación**

Varios trabajos han estudiado la presencia de metilación en los fluidos corporales. La capacidad de determinar estados de metilación en tumores primarios mediante saliva y suero podría ofrecer la posibilidad de crear paneles de genes de metilación para detectar el cáncer (203,205,257), utilizando métodos poco agresivos, incluso incruentos (caso de la saliva) para el paciente.

Clásicamente la fuente de la que partimos era tisular, sin embargo cada día está más en auge, nuevas fuentes como la obtención desde Suero /Plasma o biopsia líquida, que se caracteriza por ser un método prometedor, ya que es menos invasiva que la biopsia clásica y que parece ser eficaz para el seguimiento de los pacientes (258). Si bien hay estudios de metilación génica, utilizando fluidos como la orina para otros tipos tumorales, no hemos encontrado datos en pacientes con tumores de cabeza y cuello.

En el caso de los tumores de cabeza y cuello, la citología exfoliativa, como fuente de obtención celular, sigue siendo un método eficaz y sencillo, ya que es una técnica mínimamente invasiva, el uso del cepillo permite

recoger todas las células del epitelio (259). Longo et al. mostró, que recogiendo muestras de mucosa oral tras un cepillado de la mucosa intraoral, era capaz de detectar la metilación de genes, en concreto en un estudio de 96 pacientes con COCE encontraron los siguientes porcentajes de metilación CCNA1 (60,4%), DCC (54,2%), y TIMP-3 (35,4%) (259).

Múltiples estudios ha valorado y detectado la presencia de la metilación de los promotores génicos tras enjuagues salivales (205,211,256,260). Es una técnica prometedora para el seguimiento y la detección precoz de recidivas (211). El grupo de Rosas et al., demostró por primera vez la posibilidad de detectar metilación de genes utilizando la saliva del paciente. Este estudio evaluó la presencia de metilación en la región promotora de los genes implicados en la supresión tumoral, la metástasis tumoral y la reparación del ADN, como CDKN2A / p16, MGMT y DAPK1. Se evaluaron muestras pareadas de tumor y saliva de pacientes con cáncer de cabeza y cuello para verificar si los cambios encontrados en los tumores también podrían detectarse en la saliva, ya que este fluido corporal contiene células de la mucosa oral y la faringe (205), por otro lado, López et al. valoró la eficacia del estudio de la metilación de los genes en enjuagues orales, observando metilación de p16, p14 y MGMT en el 44%, 12% y 56% de las muestras orales, respectivamente (207).

### **2.3.2 Correlación de la metilación con la progresión y la malignización**

El estudio del estado de metilación en el carcinoma de cabeza y cuello tiene un gran potencial para la detección precoz, seguimiento y tratamiento. Existe una correlación entre la metilación y la gravedad de la enfermedad y metástasis (216,261,262).

La metilación del promotor DAPK1 se correlaciona con estadios avanzados y la presencia de metástasis (195,203). Sanchez-Cespedes et al., en su estudio, encontró que los genes MGMT y DAPK1 fueron los promotores que con más frecuencia se metilaban en los tumores de orofaringe, DAPK1 se relacionaba con estadios avanzados y metástasis ganglionares, concretamente 15 pacientes (93%) con metilación del gen tenían afectación de los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico, representando un papel importante en la diseminación tumoral.

Todavía no se ha podido identificar la relación entre la metilación de hMLH1 y estadios clínicos. Sin embargo, Tzao et al. describió la relación entre la metilación y la supresión de la expresión de hMLH1 en estadios clínicos tempranos en el cáncer de esófago, lo que sugiere que la pérdida de proteína hMLH1 por metilación ocurre en fases tempranas de la carcinogénesis (263). Así mismo Gonzalez Ramirez et al. en su estudio reafirma que la metilación del promotor de hMLH1 es un evento temprano que ocurre en el cáncer oral, y lo ratifica en un estudio de casos y controles, donde en 50 pacientes de población mexicana y 200 muestras de control de individuos sanos, encontraron que el promotor de hMLH1 estaba metilado en 38 (76%) pacientes con COCE; el estudio mostró una alta frecuencia de casos de metilación con expresión negativa para la proteína hMLH1 correspondiente a una clínica temprana de COCE (264).

En cuanto al silenciamiento epigenético de p16 y p15 juega un papel importante en el desarrollo temprano del cáncer de cabeza y cuello y se correlaciona con un peor pronóstico (265,266). En cuanto a p16 se puede utilizar como un biomarcador de baja supervivencia y metástasis (186, 267).

p16 puede usarse como biomarcador para predecir la transformación maligna, ya que la metilación de este gen se asocia con metástasis y una supervivencia general deficiente en pacientes con COCE (267). Aunque los tejidos normales sanos no muestran signos de metilación de p16, los tejidos normales de pacientes fumadores que no presentan COCE a menudo demuestran la metilación de este gen (268), sugiriendo que la metilación de p16 puede ser un evento muy temprano en el desarrollo de COCE (268). Por otro lado, en pacientes con leucoplasia, condición precancerosa, tras realizar el enjuague oral, se observó metilación de p16 en el 44% de los pacientes y la metilación aumentó con el estadio de la enfermedad (207).

La metilación del gen p16 se correlacionó con la progresión maligna (269). Además de predecir la transformación maligna, la metilación p16 se relacionó con la recurrencia local del COCE (186). Para identificar el riesgo individual de un paciente para la recurrencia de COCE, puede ser útil evaluar algo más que el estado de metilación p16 de su tejido tumoral. Un estudio evaluó la efectividad de las pruebas para la metilación del promotor p16 en los tejidos tumorales y en los márgenes quirúrgicos. Se observó metilación del promotor de p16 en el 87% de los tejidos del COCE de la lengua. Pero, lo que es más importante, los pacientes con márgenes quirúrgicos, histológicamente, libres de tumor y p16 metilado tenían un riesgo seis veces mayor de recidiva local, en comparación con los pacientes con márgenes negativos y libres de tumor histológico (270).

El silenciamiento del gen RASSF1A está asociado a tumores agresivos y una supervivencia baja (241).

La metilación de MGMT es muy elevada en casos de displasia de la mucosa, con lo que se presenta en las fases tempranas de la carcinogénesis

(238). Kordi-Tamandani et al., Taioli et al., y Shaw et al., demostraron que la metilación MGMT podría considerarse un marcador de baja supervivencia del cáncer de cabeza y cuello (214,217,236).

Sánchez-céspedes et al. y Ha pK et al. demostraron que las proteínas que controlan la apoptosis tales como DAPK1 y E-cadherina pueden aumentar la probabilidad de metástasis y tienen un papel importante en el pronóstico del cáncer (174,203). La metilación de E-cadherina tiene su principal acción en el pronóstico del cáncer (187,206,233). Curiosamente, para el cáncer de cabeza y cuello, se ha informado una correlación entre la metilación de DAPK1 y la presencia de ganglios linfáticos metastásicos (203).

El silenciamiento epigenético de los genes MGMT, p16 y DAPK1 implican alteraciones en el proceso de reparación del ADN, el ciclo celular y los procesos relacionados con la metástasis, respectivamente (174). Por otro lado un factor pronóstico favorable es la detección de la metilación de TIMP-3 en el enjuague salival recolectado, no sólo en el momento del diagnóstico, sino también seis meses después del último tratamiento curativo (256).

# 3 MATERIAL Y MÉTODOS





### 3.1 Tipo de estudio

Nuestro trabajo está compuesto de dos partes, la primera parte se trata de un estudio retrospectivo y la segunda parte de un estudio de casos y controles captados prospectivamente. La primera parte se trata de un estudio retrospectivo en 83 pacientes con diagnóstico de cáncer de cabeza y cuello, donde se valorará su manejo antes, durante y post-RTP. Posteriormente, en la segunda fase de nuestro trabajo se procedió a realizar un estudio de casos y controles en 78 pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello, que iban a recibir tratamiento de RTP y donde se estudiará el patrón de metilación.

En la parte retrospectiva, se estudiaron 83 pacientes, concretamente se revisaron las historias clínicas de los pacientes diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello que acudían al Máster de Medicina oral, Cirugía Oral e Implantología de la Universidad de Santiago de Compostela, entre Octubre de 2013 y Octubre de 2016; cuyos criterios de inclusión eran que estuviesen diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello y tratados con RTP, siendo mayores de 18 años y excluyendo a los pacientes que habían recibido previamente RTP de cabeza y cuello y los pacientes sometidos a irradiación corporal total.

En el estudio de casos y controles, todas las muestras, tanto casos como controles, fueron obtenidas de pacientes que acudían al Máster de Medicina oral, Cirugía Oral e Implantología de la Universidad de Santiago de Compostela, concretamente desde Octubre de 2013 hasta Septiembre de 2015.

El número de casos fue de 78 pacientes y los criterios de inclusión fueron pacientes diagnosticados de cáncer de cabeza y cuello; cuyo tratamiento fue RTP de cabeza y cuello, siendo mayores de 18 años, quedando excluidos aquellos que habían recibido previamente RTP de cabeza y cuello y los sometidos a irradiación corporal total.

El grupo control estaba formado por 23 pacientes que acudieron para su atención clínica al máster antes referido. En este caso los criterios de inclusión fueron pacientes sanos, mayores de edad y apareados por edad, descartándose aquellos que presenten enfermedad sistémica o patología de la cavidad oral.

Todos los pacientes, tanto en la fase retrospectiva como en el grupo de casos y controles atendidos en el Máster de Medicina oral, Cirugía Oral e Implantología firmaron el correspondiente consentimiento informado para participar en el estudio. Los consentimientos estaban disponibles en gallego y castellano. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Ref. 2014/304 (Anexo I) y sigue el código ético de Helsinki.

### **3.2 Obtención de las muestras del estudio casos-contrroles**

De todos los pacientes, tanto casos como controles, se hizo la recogida de células de la mucosa oral con la finalidad de obtener material genético. Para ello, se realizó un enjuague con solución de clorhexidina al 0.12 % sin alcohol (10 ml), una hora después del último cepillado, durante un periodo de 5 minutos. El material obtenido fue depositado inmediatamente en un tubo estéril de 15 ml, conservándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser analizado.

### **3.3 Selección de los genes a estudiar en el estudio casos- controles**

Para estudiar el patrón de metilación, tanto en casos como en controles, se elaboró un panel de genes. Los genes seleccionados fueron DAPK1, MGMT, TIMP-3, p16, y CCND2. Para la selección de genes que constituyen dicho panel, nos hemos basado, tomando como referencia fuentes bibliográficas, en aquellos que están implicados en diferentes fases del ciclo celular, con el propósito de no centrarnos sólo en un punto sino de abarcar diferentes momentos por los que pasa la célula y cómo estos se pueden ver afectados por la RTP.

### **3.4 Variables Clínicas**

Para la obtención de las variables se hizo, previo consentimiento informado, la revisión de las historias clínicas que figuran en el archivo del Máster de Medicina oral, Cirugía Oral e Implantología de la Universidad de Santiago de Compostela.

De cada una de las historias clínicas se recogieron las siguientes variables que se muestran a continuación. Hemos dividido las variables en función del momento de la RTP, es decir antes, durante y después.

#### **a) Variables antes de someterse a RTP**

Sexo (Hombre/Mujer), edad, tratamiento con QTP (si/no), estadio (T1/T2/T3/T4), T (T1/T2/T3/T4,Tx), N (N0/N1/N2/Nx), M (M0/M1/Mx), sesiones de RTP, tipo de tumor (COCE/otros), localización (lengua/supraglotis/paladar duro/epiglotis/laringe/labio/faringe/cavum/seno piriforme/

paladar blando y pilar amigdalino/orofaringe/parótida/ hipofaringe /amígdala/ suelo de la boca, faringolaringe/nasofaringe/mandíbula), TSG-I , TSG-II, cultivo (negativo/positivo), higiene (Grado0/Grado1/Grado2/Grado3), hábitos tóxicos (si/no), número de cigarrillos (no/exfumador/1-10/10-20/+40), consumo alcohol (no/exalcoholico/bajagraduación/altagraduación/alcohólicos), exodoncias (si/no), número de exodoncias, exodoncias mandibulares, exodoncias maxilares, exodoncias por caries, exodoncias por motivos periodontales, exodoncias por restos radiculares, exodoncias por otras causas, tratamiento conservador (si/no), tartrectomía (si/no), cirugía pre-RTP (si/no), acude a revisiones (si/no), fecha de diagnóstico, paciente (caso/control), metilación p16 pre-RTP (si/no), metilación MGMT pre-RTP (si/no), metilación DAPK1 pre-RTP (si/no), metilación de CCND2 pre-RTP (si/no), metilación TIMP-3 pre-RTP (si/no)

b) Variables durante el tratamiento con RTP

Acude a revisiones (si/no), TSG-I semanales durante 7 semanas, TSG-II semanales durante 7 semanas, mucositis semanales durante 7 semanas (nada/eritema/eritema, úlceras, dieta con sólidos/ eritema, edema, úlceras, dieta con líquidos/soporte parenteral) radiodermatitis semanales durante 7 semanas (nada/eritema/descamación seca/ descamación húmeda), cultivo a mitad del tratamiento (negativo/positivo) y cultivo al final del tratamiento (negativo/positivo), ORN (si/no) y causas ORN (espontánea/zona de extracciones pre-RTP/zona de extracciones post-RTP).

c) Variables después del tratamiento con RTP

TSG-I al mes, a los 3 meses, a los 9 meses y al año , a los dos y a los 3 años; TSG-II al mes, a los 3 meses, a los 9 meses y al año , a los dos y a los 3 años ; mucositis al mes, a los 3 meses, a los 9 meses y al año , a los dos y

a los 3 años; radiermitis al mes, a los 3 meses, a los 9 meses y al año , a los dos y a los 3 años; cultivo, a los 3 meses, a los 9 meses y al año; extracciones dentales (si/no); control bucodental a los 2 años y a los 3 años (estable/inestable/edentulo/necrosis/prótesis/implantes); momento de aparición de la ORN (durante RTP/después RTP), localización (maxilar/mandibular), tamaño (<1cm/1-2cm/>2cm), curación (estable, curada/muerto el paciente), estado vital 2018 (vivo/muerto) y recurrencia de enfermedad (si/no), metilación p16 post-RTP (si/no), metilación MGMT post-RTP (si/no), metilación DAPK1 post-RTP (si/no), metilación de CCND2 post-RTP (si/no), metilación TIMP-3 post-RTP (si/no)

### **3.5 Protocolo ANTES, DURANTE y DESPUÉS DE LA RTP**

Se estableció un protocolo en el que, semanalmente, se completaban los datos bucodentales y la evolución del paciente con el tratamiento que se describe a continuación.

#### **3.5.1 Antes de la RTP**

En la primera visita se realiza una historia clínica donde se recogen datos de filiación del paciente: edad, sexo, antecedentes médicos familiares, antecedentes médicos personales, problemas médicos actuales, medicación, alergias, y hábitos nocivos. Todos los pacientes acuden con un informe del oncólogo donde se recoge la historia médica oncológica del paciente: diagnóstico del tumor, estadio tumoral y tratamiento del tumor y una ortopantomografía para valoración del estado dental.

Se realiza una exploración bucodental para ver la situación oral del paciente y valorar las distintas necesidades terapéuticas y se cubre el protocolo de RTP (Anexo II). En cada visita son imprescindibles una serie radiográfica del paciente, extraoral (frente, perfil, cuello y sonrisa) e intraoral (máxima intercuspidadación, laterales, arcadas superior e inferior, mucosa yugales y lengua).

1. Exploración de las mucosas (mucosas yugales, labios, lengua, encías, fondo de vestíbulo, suelo de boca, paladar...) para descartar cualquier lesión que pueda existir.
2. Exploración dental y periodontal con ayuda de la sonda y el espejo y se establecen 4 grados de higiene oral según el índice de Silnesloe (271).
  - Grado 0: Ausencia de placa dental.
  - Grado 1: Placa no visible, pero que puede extraerse del tercio gingival del diente con ayuda de una sonda.
  - Grado 2: Acumulación moderada de placa en área gingival que es apreciada a simple vista.
  - Grado 3: Placa abundante en esta misma zona e incluso cubriendo el diente adyacente.
3. Toma de cultivo, la muestra será del dorso lingual y la lectura a las 24-48-72 horas. Con un bastoncillo se recoge la muestra del dorso lingual, se deposita en una placa de agar-sabourand que se cultivará.
4. Valoración del estado de la función salival para lo que se emplea un tira papel milimetrada (de 1 cm de ancho por 17 cm de largo, con 1 cm no milimetrado) introducida en una bolsa de polietileno, que se denomina

Test de saliva global (TSG); en reposo (TSG-I) y estimulada (TSG-II) (272). Para la realización del test se extrae de la bolsa la porción de tira no milimetrada. A continuación se dobla el extremo en un ángulo de 90 grados y se inserta en la cavidad bucal debajo de la lengua. Al cerrar los labios éstos quedan ligeramente en contacto con la bolsa de polietileno. La saliva producida que se va acumulando en la vallécula lingual durante los 5 minutos que dura la prueba, va empapando lentamente la tira. Transcurrido este tiempo, se retira de la boca y se leen inmediatamente los milímetros humedecidos. Posteriormente se realiza el test estimulado mediante el depósito de unas gotas de ácido cítrico al 4% en la cavidad oral y se realiza el mismo proceso que en reposo.

Una vez cubierto el odontograma, y con ayuda de la ortopantomografía se deciden las distintas necesidades terapéuticas del paciente:

1. Exodoncias (si es necesario realizarlas, todos los pacientes firman un consentimiento informado donde se les explican las posibles complicaciones).
2. Obturaciones/endodoncias.
3. Tratamiento para la candidiasis oral (Mycostatin®. Enjuagues 3 veces al día/3 minutos durante 4 semanas).
4. Tartrectomía, raspaje y alisado radicular.
5. Eliminar cualquier factor irritante (prótesis traumáticas, dientes cortantes).
6. Motivación en higiene oral, por lo que se recomienda un cepillado diario de 3 veces al día más un pasta dentífrica con alto contenido en flúor, además de fluorizaciones en pacientes dentados: confección de cubetas individuales para la aplicación diaria de gel de fluoruro de sodio al 1'24%, 5 minutos/día y enjuagues con clorhexidina.

En la indicación de exodoncias (273,274) influye, además del pronóstico del propio diente, la motivación del paciente y su habilidad para seguir las instrucciones de higiene oral, por ello, todos los dientes con un pronóstico cuestionable deben ser extraídos antes de la RTP:

1. Caries (no restaurables).
2. Enfermedad periodontal activa (dientes sintomáticos).
3. Enfermedad periodontal moderada y severa (bolsas  $\geq 5$  mm) especialmente con pérdida ósea avanzada, movilidad y afectación de furca.
4. Impactación parcial o erupción incompleta, sobre todo terceros molares, que no están totalmente cubiertos por el hueso alveolar, o que están en contacto con la cavidad oral.
5. Lesiones periapicales extensas (si no son crónicas o bien localizadas).
6. Restos radiculares que no estén completamente cubiertos por hueso alveolar o muestren radiolucidez.
7. Dientes próximos al tumor o en el tumor.
8. Falta de dientes antagonistas.
9. Higiene comprometida.

Al hacer las exodoncias se debe seguir un manejo de estos pacientes que reflejamos a continuación (274-276):

1. Profilaxis antibiótica en aquellos pacientes que sea necesaria según las recomendaciones de la American Dental Association (ADA).
2. Enjuague con colutorio antiséptico: digluconato de clorhexidina al 0,12%, 1 minuto.

3. Técnica anestésica: Anestesia con vasoconstrictor: Articaina al 4% con epinefrina 1:200000 (Ultracain®, Inibsa®). y Bloqueo troncular, anestesia infiltrativa y/o anestesia intraligamentosa.
4. Mínimo trauma.
5. Regularización del proceso alveolar.
6. Aproximación de bordes.
7. Sutura no reabsorbible con seda 4.0.
8. Se prescribió cobertura antibiótica, Amoxicilina 750 mg 1/8horas/7días.
9. Tratamiento postoperatorio: analgésico-antiinflamatorio (Ibuprofeno 600 mg) y colutorio antiséptico de digluconato de clorhexidina al 0'12%.
10. Mínimo número de sesiones, comenzando por las exodoncias mandibulares.

La mayoría de los autores coinciden en que el tiempo mínimo para demora el tratamiento con RTP es de 15-20 días (84,94,274,277). Aunque otros indican que si se trata de procedimientos quirúrgicos complejos se debe esperar de 4 a 6 semanas (5,276).

### **3.5.2 Durante la RTP**

Los pacientes que van a recibir RTP sufren principalmente tres complicaciones agudas que le provocan incapacidad funcional y poder desarrollar una vida normal, que son la mucositis, la radiodermitis y la xerosomía. Debemos de hacer un control semanal, es decir, debemos ver al paciente una vez a la semana durante las 8 semanas que suele durar el tratamiento. La principal sintomatología aparece tras la quinta dosis de

radiación. Por lo que en cada visita solemos hacer las siguientes mediciones (Anexo II):

1. Grado de mucositis.
2. Grado de radiodermatitis.
3. Grado de higiene oral.
4. Presencia de ORN.
5. Eliminar posibles roces si tiene alguna prótesis removible o completa.
6. Estado bucodental e insistir en instrucciones en higiene oral.
7. Cantidad de saliva mediante el TSG-I y el TSG-II.
8. Cultivo a la mitad del tratamiento y al finalizar.

Durante el tratamiento con RTP y hasta 18 meses después no se podrá realizar ninguna técnica quirúrgica en estos pacientes, y si se tiene que realizar tratamiento endodónticos, no sobrepasar el ápice dental (73). Se aconsejan movimientos mandibulares y ejercicios orales para la prevención del trismus y así mantener la máxima apertura. Debemos seguir insistiendo en las instrucciones de higiene oral, que comentábamos en el apartado de manejo pre-RTP, para prevenir la aparición de caries rampantes; como estos pacientes sienten bastante dolor en la cavidad oral podemos aconsejar un cepillo blando para que no le irrite demasiado a la hora de la técnica del cepillado, además de una dieta blanda que no irrite las mucosas y anticariogénica.

### **3.5.3 Después de la RTP**

La revisión de los pacientes tras el tratamiento con RTP, se hizo en 5 tiempos: 1,3,6,9,12 meses. A partir de entonces, se revisan anualmente.

En cada una de las revisiones se valora el estado oral del paciente para establecer las necesidades de tratamiento realizando nuevamente las siguientes exploraciones:

1. Odontograma con la situación actual después de recibir RTP, se valora el estado dental y periodontal.
2. Valoración de higiene oral: Índice de Silnessloe (271). Reforzarla y seguir efectuando las fluorizaciones.
3. Se valora el estado de la función salival cuantitativamente mediante TSG, tanto TSG-I, como TSG-II, siguiendo la técnica descrita por López- Jornet (Test de Schrimmer oral) (272).
4. Se realiza un cultivo dorso lingual para el aislamiento y la identificación de especies de *Candida*. Se valora la forma clínica de candidiasis (subclínica, eritematosa, pseudomembranosa).
5. Se valora la mucositis y la radiodermitis residual.
6. Se solicita una nueva OPG 12 meses después de haber finalizado la RTP.
7. Evitar prótesis completa o removible hasta 6 meses post-RTP, y es imprescindible un control semanal para evitar el roce de las mismas y añadir siempre un rebase blando.
8. Realizar ejercicios orales para mejorar el grado de apertura bucal
9. Para realizar las extracciones post-RTP, se siguieron los criterios de Sulaiman y Jansma et al. (274,275). Es necesario demorar toda cirugía 18 meses post-RTP para disminuir el riesgo y seguir las siguientes recomendaciones:
  - Enjuague con colutorio antiséptico: digluconato de clorhexidina al 0,12%, 1 minuto.

- Técnica anestésica: Anestesia sin vasoconstrictor: Mepivacaína al 2% (Scandinibsa®, Inibsa®) y Bloqueo troncular, anestesia infiltrativa, nunca anestesia intraligamentosa.
  - Mínimo trauma.
  - Alveolectomía, regularización del proceso alveolar con instrumental no rotatorio.
  - Cierre primario, con realización de colgajos mucoperiósticos.
  - Sutura no reabsorbible con seda 3.0
  - Siempre profilaxis antibiótica (Amoxicilina 750mg 1/8horas/10 días, en caso de alergia a la penicilina se recetó la asociación de espiramicina y metronidazol (Rhodogil®), 2 cada 8 horas durante 10días).
  - Tratamiento postoperatorio: analgésico-antiinflamatorio (Ibuprofeno 600mg) y colutorio antiséptico de digluconato de clorhexidina al 0'12%, además del antibiótico.
  - Espaciar las exodoncias en el tiempo.
10. Inspeccion minuciosa de la cavidad oral para diagnosticar precozmente las recidivas.
11. Valoración de la ORN.

### **3.6 Protocolo de análisis de las muestras**

#### **3.6.1 Extracción del ADN de las muestras**

El material obtenido de la toma de muestras se sometió a centrifugación a 4°, 1200 rpm en la propia clorhexidina, para luego hacer un lavado con H2O libre de nucleasas y así conseguir un pellet celular. Para la obtención del material nucleico se utilizó el kit Puregene Core A (Quiagen ®) según

el protocolo del fabricante. Brevemente, añadimos a la muestra una solución de lisis así como proteinasa K (20mg/ml) y se incubará a 56°C durante toda la noche, añadiendo, nuevamente, proteinasa K (50%) incubándolo una hora más. Se dejan enfriar las muestras a temperatura ambiente y se añade solución de precipitación de proteínas al contenido de la lisis celular. Seguidamente, se centrifuga a 16.000 g durante 5 minutos para que las proteínas formen un pellet, se recoge el sobrenadante y se coloca en un tubo limpio de 1.5 ml que contenga Isopropanol al 100%, donde se precipitará el material nucleico a -80°C y tras lavados con alcohol de 70 % se procede a la hidratación del ADN y se almacena a -20°C o -80°C hasta su utilización.

La cantidad de material nucleico obtenido fue medida a través del Nanodrop (Thermo Scientific®).

#### **3.6.2 Técnica de Transformación con bisulfito**

Se realiza la conversión de ADN por bisulfito (Epitect® Bisulfite Kit®) para convertir las citosinas no metiladas en uracilos (y timinas tras la reacción de PCR) sin modificar las citosinas metiladas (278,279). Para ello, en tubos 200 microlitros ( $\mu\text{l}$ ), se añade 1 microgramo ( $\mu\text{g}$ ) ADN con agua libre de ADN y ARN (20 $\mu\text{l}$ ), mix de bisulfito (85  $\mu\text{l}$ ) y tampón de protección de ADN (35 $\mu\text{l}$ ). Para llevar a cabo la conversión de ADN bisulfito se utiliza un termociclador, utilizándose las temperaturas y los tiempos que describimos a continuación: 5 minutos a 95°C para realizar la primera desnaturalización, seguidamente se incuba durante 25 minutos a 60°C, seguidamente se desnaturaliza 5 minutos a 95°C, y se realiza una nueva incubación durante 85 minutos a 60°C, otra desnaturalización

durante 5 minutos a 95°C, y una última incubación durante 175 min a 60°C.

Se centrifugan los tubos que contienen la reacción de bisulfito y, posteriormente, se transfieren a tubos de 1,5 ml. Se añaden 310µl de Buffer BL y 3,1µl de Carrier ARN, se mezcla en vórtex y se centrifuga durante 1 minuto a velocidad máxima. Se adicionan 250µl de etanol a 96%. Se mezcla en vórtex y se centrifuga durante 1 minuto a velocidad máxima.

Se transfiere la totalidad de la mezcla desde cada tubo a las columnas de spin EpiTect con tubo colector, se centrifugan las columnas a velocidad máxima durante 1 minuto y se elimina el filtrado. Se añaden 500µl de buffer BW, y se centrifugan a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descarta el filtrado. Se adicionan 500µl de buffer BD en cada columna, y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descarta el filtrado. Se adicionan 500µl de buffer BW en cada columna, se centrifuga a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descarta el filtrado. Se repite este paso. Se colocan las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml y se centrifuga a velocidad máxima durante 1 minuto. Se descarta el filtrado. Se incuban las columnas, con las tapas abiertas, en microtubos nuevos de 1,5ml, durante 5 min a 56°C. Se adicionan 20µl de Buffer EB en el centro de cada membrana, sin tocarla, y se centrifuga durante 1 minuto. El producto final de conversión fue almacenado durante un tiempo indefinido a - 20°C.

### **3.6.3 Técnica de MSP**

Posteriormente y para ver el estado de metilación de los genes estudiados, utilizamos la técnica de metilación específica de reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) (MSP), para lo cual se utilizaron los termocicladores (AB Applis Biosystems 2750 Thermanl cycler® y PTC 200 Peltier Thermal Cycler®).

Las secuencias de primers han sido obtenidas de las referencias bibliográficas: p16, CCND2, MGMT y DAPK1, sin embargo para el estudio de TIMP-3 hemos diseñados primers específicos de metilación utilizando el programa Primer 3 Plus online.

A continuación describimos la secuencia de MSP:

1. El primer paso consiste en hacer la MIX U (no metilada) y la MIX M (metilada):
  - Agua destilada (12,5  $\mu$ l )
  - Buffer (6  $\mu$ l )
  - DNTPs (2  $\mu$ l)
  - Primers (MF, MR,UR,UF)(1  $\mu$ l de cada)
  - TAQ Polymerasa (0.5 $\mu$ l )
2. Una vez listas las mix, echaremos 23  $\mu$ l de cada una en cada tubo nuevo rotulado.
3. Cargamos 2  $\mu$ l de cada muestra tratada con bisulfito en cada tubo que contiene los 23  $\mu$ l de mix.
4. Metemos las muestras en el termociclador con las condiciones adecuadas.
5. Los productos de amplificación serán separados en geles de agarosa al 2% p/v, a los que se añadió, en vez de Bromuro de Etidio, Realsafe nucleicacid staining solution (20.000x) 5mg/ml, visualizados bajo luz ultravioleta y fotografiados con cámara digital.

La secuencia de primers metilados (M)/primer no metilados (U) y las condiciones de MSP para cada uno de ellos están recogidos en la siguiente tabla 10.

GEN	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER	TEMPERATURA METILADO	TEMPERATURA NO METILADO
CCND2	M:GGCCGATTTTATCGTAGTCG U:AGAGTATGTGTTAGGGTTGATT	M:CTCCACGCTCGATCCTTCG U:ACATCCTCACCAACCCCTCCA	94°-5' } 94°-30' } } 35 ciclos 57°-45' } 72°-1' } 72°-7' } 4°&	94°-5' } 94°-30' } } 35 ciclos 55°-45' } 72°-1' } 72°-7' } 4°&
TIMP-3	M:CGTTTCGTTATTTTTGTTTTCGGTTTC U:TTTTGTTTTGTTATTTTTGTTTTGTTTT	M:CCGAAAACCCCGCTCG U:CCCCAAAACCCCACTCA	94°-5' } 94°30' } } 35 ciclos 59°-1' } 72°-1' } 72°-10' } 4°&	94°-5' } 94°-30' } } 35 ciclos 59°-1' } 72°-1' } 72°-10' } 4°&
P16	M:TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC U:TTATTAGAGGGTGGGGTGATTGT	M: GACCCGAACCGGACCGTAA U:CAACCCCAAAACCACAACCTAA	94°-5' } 94°-30' } } 35 ciclos 57°-45' } 72°-1' } 72°-7' } 4°&	94°-5' } 94°-30' } } 35 ciclos 55°-45' } 72°-1' } 72°-7' } 4°&
MGMT	M:GGTCGTTTGTACGTTCCG U:GTAGGTTGTTTGTATGTTTGT	M:GACCGATACAAACCGAACG U:AACCAATACAACCAACA	94°-15' } 94°-50' } } 35 ciclos 59°-50' } 72°-50' } 72°-10' } 4°&	94°-15' } 94°-50' } } 35 ciclos 59°-50' } 72°-50' } 72°-10' } 4°&
DAPK1	M:GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC U:GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT	M:CCCTCCCAACGCCGA U:CAAATCCCTCCCAACACCAA	94°-5' } 94°-1' } } 5 ciclos 58°-1' } 72°-1' } 94°-30' } } 15 ciclos 55°-30' } 72°-1' } 94°-1' } } 15 ciclos 58°-1' } 72°-1' } 72°-7' } 4°-&	94°-4' } 94°-30' } } 35 ciclos 63°-30' } 72°-32' } 94°-30' } } 5 ciclos 68°-30' } 72°-30' } 72°-10' } 4°-&

Tabla 10 Condiciones MSP

### 3.6.4 Análisis estadístico

Se realizará la recogida de las variables de estudio en una base diseñada al efecto, con comprobación repetida de la calidad de los datos. Para el análisis se emplea el paquete de software SPSS v.20 para Windows (SPSS Inc., Chicago, ILL, EEUU). Para la descripción de las variables cuantitativas se emplea media o mediana y desviación estándar (DS) o rango intercuartílico. Para variables categóricas, frecuencia y porcentaje. Se estudió la normalidad de las muestras mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Análisis univariante: para comparación de medias, T de Student o prueba U de Mann Whitney según condiciones de aplicación; para comparación de proporciones, prueba Ji cuadrado o prueba exacta de Fisher. Se realizó estudio de correlación entre variables cuantitativas con Test estadístico de Fisher o Spearman, según condiciones de aplicación. Para el análisis de supervivencia se realizaron curvas de Kaplan-Meier. Para el estudio multifactorial de metilación se realizó regresión logística, comparando las diferencias mediante el estadístico Hazard-Ratio. Se consideran valores estadísticamente significativos aquellos cuya  $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$  para el estudio de correlación.



# 4 RESULTADOS





## 4.1 Descriptivo

### 4.1.1 Edad y sexo

La edad media de los 83 casos fue de 60,10, con un rango de 40-82 años. De los 83 casos el 30,1% son mujeres (25) y el 69,9% son hombres (58).

### 4.1.2 Sesiones de RTP

Todos los pacientes recibieron RTP, con una media de sesiones de 33,27, con un rango de 30-37; el 80,7% lo combinaron con QTP y el 57,8% recibieron cirugía pre-RTP.

### 4.1.3 Estadíos TNM

El estadio tumoral más frecuente en el momento del diagnóstico fue el estadio IV con un 65,1%, seguido del estadio III con un 20,5% (17), el estadio II con un 9,6% (8) y por último el estadio I con un 4,8% (4).

#### 4.1.3.1 Distribución de estadíos según sexo

El número de mujeres con tumores en estadio I fue de 0 y el de hombres fue de 4 (100%). El número de mujeres con estadio II fue de 3 (37,5%) y el de hombres fue de 5 (62,5). El número de mujeres con tumores en estadio III fue de 2 (11,8%) y el de hombres fue de 15 (88,2%). El número de mujeres en estadio IV fue de 20 (37%) y el de hombres fue de 34 (63%). No existen diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres en nuestra serie ( $p=0,118$ ).

### 4.1.3.2 Distribución de estadios según localización

La distribución de tumores, en función de la localización, se encuentra recogida en las siguientes tablas 11,12,13,14, sin que exista una relación estadísticamente significativa ( $p=0,141$ ).

Si asociamos localización en cavidad oral y otras localizaciones (incluyendo, dentro de este grupo, las localizaciones pertenecientes a la zona de la orofaringe) hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre estadio y localización ( $p=0,029$ ).

Localización	Estadio T1
Supraglotis	1(25%)
Paladar blando	2(50%)
Suelo de boca	1(25%)

**Tabla 11** Distribución del estadio 1 según la localización

Localización	Estadio T2
Lengua	2(25%)
Supraglotis	1(12,5%)
Labio	1(12,5%)
Cavum	1(12,5%)
p.blando	1(12,5%)
Parótida	1(12,5%)
Faringo-Laringe	1(12,5%)

**Tabla 12** Distribución del estadio 2 según la localización

Localización	Estadio T3
Lengua	1(5,9%)
Supraglotis	2(11,8%)
Paladar duro	1(5,9%)
Epiglotis	1(5,9%)
Laringe	1(5,9%)
Labio	1(5,9%)
Faringe	1(5,9%)
Cavum	2(11,8%)
Seno pirif.	1(5,9%)
Orofaringe	3(17,6%)
Hipofaringe	1(5,9%)
Amigdal	2(11,8%)

**Tabla 13** Distribución del estadio 3 según la localización

Localización	Estadio T4
Lengua	6(11,1%)
Supraglotis	4(7,4%)
Laringe	8(14,8%)
Labio	1 (1,9%)
Faringe	1 (1,9%)
Cavum	4(7,4%)
Seno piriforme.	1 (1,9%)
Paladar bl.	2 (3,7%)
Orofaringe	12(22,2%)
Hipofaringe	2(3,7%)
Amigdal	8(14,8%)
Suelo de boca	1(1,9%)
Faringo Laringe	2(3,7%)
Nasofaringe	1(1,9%)
Mandibula	1(1,9%)

**Tabla 14** Distribución del estadio 4 según la localización

### 4.1.3.3 Distribución de estadios según hábito tabáquico

De los casos en estadios iniciales, es decir, estadio I y II, 10 (83,3%) de los pacientes eran fumadores y 2 no fumadores (16,7%). Por otro lado en estadios avanzados (III y IV) 58 (82,9%) son fumadores y 12 (17,1%) no

fumadores. A pesar de que los porcentajes nos indican que los tumores se presentan más en fumadores, no hemos encontrado relación estadísticamente significativa entre el hábito tabáquico y el estadio tumoral ( $p=0,968$ ).

#### **4.1.3.4 Distribución de estadios según el tratamiento con QTP**

El número de pacientes que recibieron QTP en estadio IV fue de 48 (88,9%) frente a 6 (11,1%) que no recibieron QTP, en el estadio III, fue de 70,6% (12) frente a un 29,4% (5) que no la recibieron. Y en estadios iniciales, para el estadio II, 6 (75%) pacientes que recibieron QTP, frente a 2 (25%) que no. Y para el estadio I, 1 (25%) que si frente a 3 (75%) que no. Existe una relación estadísticamente significativa entre ambas variables ( $p=0,009$ ).

#### **4.1.3.5 Distribución de estadios según la recurrencia de la enfermedad**

Todos los casos en estadio I, el 100% (4) tuvieron recurrencia de la enfermedad. En cuanto al estadio II, el 50% (4) presentaron recurrencia, en el estadio III, 5 (29,4%) y en el estadio IV 34 (63%) tuvieron recidiva. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,033$ ).

#### **4.1.4 Localización del tumor**

La localización tumoral más frecuente fue la orofaríngea en 15 casos (18,1%), seguida de la amígdala con 10 casos (12%) y, muy seguidamente, la lengua y la laringe con 9 casos cada una (10,8%). En menor frecuencia aparecen las siguientes localizaciones: 9,6% en la supraglotis, 8,4% en

cavum, 6% en pilar amigdalino y paladar blando, 3,6% en labio, hipofaringe y faringolaringe, 2,4% en faringe, seno piriforme y suelo de boca y en 1,2% paladar duro, epiglotis, parótida, narofarínge y mandíbula.

#### **4.1.5 Consumo de alcohol**

De los 83 casos, 4 (4,8%) eran alcohólicos en el momento del diagnóstico, 2 (2,4%) con consumo de alcohol de alta graduación, 31(37,3%) consumen alcohol de baja graduación, 15 (18,1%) son ex alcohólicos, y 31 (37,3%) no consumen alcohol.

#### **4.1.6 Consumo de tabaco**

De los 83 casos, 43 (51,8%) son ex fumadores, 3 (3,6%) fuman de 1-10 cigarrillos al día, 11 (13,3%) fuman entre 10-20 cigarrillos/día, 10 (12%) fuman más de 40 cigarrillos/día y 16 casos (19,3) no son fumadores.

#### **4.1.7 Situación oral del paciente pre-RTP**

##### **4.1.7.1 Tratamiento bucodental**

En cuanto a las necesidades de tratamiento bucodental, el 57,8% de los pacientes (48) necesitaron realizarse al menos una limpieza antes de empezar dicho tratamiento, frente a un 42,2% de pacientes (35) que no lo necesitaron.

Por otro lado, tan sólo 39,8% pacientes (33) necesitaron tratamiento conservador frente a 60,2% pacientes (50) que no lo demandaban, esto se debe al alto número de pacientes que necesitaron realizarse extracciones.

De los 83 pacientes, 72,3% (60) necesitaron realizar al menos una exodoncia. La media de exodoncias fue de 3,83 y con un rango de 0-21 frente a 23 pacientes (27,7%) que no requirió ninguna extracción pre-RTP

En cuanto a las causas de extracción, hemos de recalcar que un mismo diente, puede tener más de un problema, y en este casos nos fijamos para decidir sobre su conservación o no en el motivo más grave. Por todo ello, las causas fundamentales de extracción fueron las siguientes: 62,7% por enfermedad periodontal, 61,4% por caries, 81,9% por restos radiculares.

#### **4.1.7.2 Infección por cándida**

El estudio de la posible infección por cándida pre-RTP en dorso lingual, nos indica que 44 pacientes (53%) tuvieron resultado negativo frente a 39 pacientes (45,8%) que fueron positivos.

#### **4.1.7.3 Higiene oral**

En cuanto a la higiene oral previa al tratamiento, hemos visto que 31 pacientes (37,3%) presentaban un Grado 3, seguido de 44 (53%) que presentaban grado 2, frente 5 (6%) que tenían grado 1 y tan solo 3 pacientes (3,6%) Grado 0.

##### **4.1.7.3.1 Asociación exodoncias pre-RTP e higiene oral previa**

De los 60 pacientes que precisaron realizar extracciones previas al tratamiento, el 46,7% (28) presentaban grado 3 de higiene oral seguida del 51,7% (31) que presentaba Grado 2 frente a 1 (1,7%) que presentaba Grado 1. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

#### **4.1.7.3.2 Asociación exodoncias pre-RTP y hábitos tóxicos**

De los 60 pacientes que necesitaron realizar extracciones pre-RTP, el 83,3% (50) de ellos tenían hábitos tóxicos, ya sea tabaco, alcohol o ambos frente a un 16,7% (10) que no tenían hábitos tóxicos y si demandaron extracciones previas. En este caso no hemos encontrado, en nuestra serie, una asociación entre las variables estadísticamente significativas ( $p=0,591$ ).

#### **4.1.7.4 Cantidad de saliva en reposo y estimulada**

La media de producción de saliva en reposo fue de  $37,24 \pm 17,36$  mm con un rango de 10-99 y en estimulada de  $60,70 \pm 30,98$  mm con un rango de 25-160 de saliva.

#### **4.1.8 Situación oral del paciente durante la RTP**

Durante las 6-7 semanas que duró el tratamiento de la RTP, analizamos la prevalencia de complicaciones de dicho tratamiento, centrándonos fundamentalmente en mucositis, radiodermatitis, cantidad de saliva en reposo y estimulada, y la posible infección bacteriana.

Es importante reseñar que a medida que aumentan las sesiones de RTP, el nivel de implicación del paciente en la asistencia a controles disminuye, por lo que nos encontramos siempre con algún valor perdido en las variables, si menos cabe, de que el porcentaje mostrado, es siempre el válido.

#### 4.1.8.1 Mucositis

En la primera semana no hubo mucha prevalencia de complicaciones, tan sólo 1 paciente (2,2%) presentó Grado 2 de Mucositis frente a 10 pacientes (21,7%) que sólo tuvieron eritema (Grado 1) y 35 pacientes que no presentaron ninguna sintomatología (Grado 0).

A medida que aumentan las semanas, el nivel de úlceras aumentan, por lo que las dificultades de deglución se incrementan, llegando a tener que recurrir a dieta sólo con líquidos y, a veces, soporte parenteral, ya que se acumulan las dosis de radiación.

Nos encontramos que a mitad de tratamiento (tercera semana) disminuyen los pacientes con Grado 0 a 17 (37,8%) y aparecen más prevalencia de Grado 1, concretamente, 11 casos (24,4%) y con Grado 3, 7 casos (15,6%). Estos porcentajes de mucositis se reducen en la última semana de RTP, tan sólo en 1 paciente (4%) presenta Grado 4, 2 pacientes (8%) presentan Grado 3, 7 pacientes (28%) presentan Grado 2, 9 (36%) pacientes presentan Grado 1 y 6 pacientes (24%) Grado 0. (Tabla 15).

Semanas	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
1ª	76,1%	21,7%	2,2%		
2ª	45,7%	28,3%	17,4%	8,7%	
3ª	37,8%	24,2%	22,2%	15,6%	
4ª	25%	25%	34,1%	15,9%	
5ª	18,2%	18,2%	45,5%	18,2%	
6ª	23,1%	20,5%	43,6%	10,3%	2,6%
7ª	24%	36%	28%	8%	4%

**Tabla 15** Prevalencia de pacientes que presentan mucositis durante las 7 semanas de tratamiento con RTP

#### 4.1.8.2 Radiodermatitis

Durante el tratamiento de RTP vemos que, desde la primera semana hasta la última, aumenta la radiodermatitis; al principio del tratamiento tan sólo existe un eritema, como podemos ver en la tabla 16, pero a medida que aumentan las semanas ya aparece con más prevalencia la descamación seca y la descamación húmeda, resultante del acúmulo de dosis.

Semanas	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
1ª	74,5%	25,5%		
2ª	56,5%	32,6%	8,7%	1,2%
3ª	48,9%	28,9%	22,2%	
4ª	38,6%	31,8%	25%	4,5%
5ª	27,9%	30,2%	32,6%	9,3%
6ª	23,1%	41%	35,9%	
7ª	32%	40%	28%	

Tabla 16 Prevalencia de pacientes que presentan radiodermatitis durante las 7 semanas de tratamiento con RTP

#### 4.1.8.3 Infección por cándida

El estudio de la posible infección por cándida durante la RTP en dorso lingual, nos indica que 24 pacientes (55,8%) son positivos frente a 19 pacientes (44,2%) que resultan negativos y al final del tratamiento disminuye la positividad para cándida con sólo 19 pacientes afectados (45,2%) frente a 23 (54,8%) que son negativos, por lo que, comparando con los datos iniciales, vemos que solamente hay presencia de cándida durante el tratamiento con RTP.

##### 4.1.8.3.1 Asociación cultivo pre-RTP-cultivo y final del tratamiento

De los 42 pacientes estudiados vemos que tan sólo son negativos a la candidiasis al principio del tratamiento y positivos al final del tratamiento 8

de ellos (38,1%), frente a 13 que son negativos al principio y al final (61,9%). Por otro lado, presentan positividad para *Cándida* al principio del tratamiento para después volverse negativo 10 (47,6%) de ellos y no fue efectivo el tratamiento, ya que seguían siendo positivos en 11 (52,4%) de los casos. Estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,352$ ).

#### **4.1.8.3.2 Asociación cultivo mitad de la RTP y cultivo final del tratamiento**

De los 42 pacientes estudiados vemos que el 88,9% (16) se mantienen negativos en la mitad, y al final del tratamiento, frente a un 11,1% (2) que se hacen positivos al final del tratamiento. Por otro lado son positivos a la mitad y al final del tratamiento 70,8% (17) frente a 29,2% (7) que son positivos a la mitad pero negativos al final, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,0001$ ).

#### **4.1.8.3.3 Asociación cultivo pre-RTP y cultivo mitad del tratamiento**

De los 43 pacientes estudiados el 50% (11) son negativos para *Cándida* al principio y a la mitad del tratamiento frente a 50% (11) que son negativos y después se positivizan. Por otro lado de los 21 pacientes positivos, conseguimos que a la mitad del tratamiento el 38,1% (8) fuesen negativos. Siendo estas relaciones no estadísticamente significativas ( $p=0,432$ ).

#### **4.1.8.4 Cantidad de saliva en reposo y estimulada**

El estudio de la cantidad de saliva refleja que, a medida que aumentan las sesiones de RTP, disminuye la tasa de salivación en reposo y estimulada

debido a la acción directa de las radiaciones ionizantes en las glándulas salivales. Así, en nuestro estudio, tenemos una media de TSG-I de  $37,24 \pm 2,025$  mm (rango 10-99) y TSG-II de  $60,70 \pm 30,984$  mm (rango 25-160) previas a la RTP, mientras que, tras 7 semanas de tratamiento, la cantidad de saliva disminuye a  $21,20 \pm 10,12$  mm (rango 5,71-40,14) y la media de TSG-II a  $38,12 \pm 15,34$  mm (rango 24,71-70,57). (Tabla 17).

	1ª S	2ª S	3ª S	4ª S	5ª S	6ª S	7ª S
TSG-I	28,96	26,54	23,36	20,32	17,80	16,69	17,64
TSG-II	47,47	45,83	39,17	34,19	28,95	33,80	28,81

**Tabla 17** Medias de tasas salivales en reposo y estimulada durante las 7 semanas de tratamiento de RTP

#### 4.1.8.4.1 Asociación de la media de saliva de TSG-I pre-RTP y la media de TSG-I durante la RTP

Antes del tratamiento con RTP, tenemos una media de TSG-I de  $37,24 \pm 2,025$  mm (rango 10-99) y, al terminar las 7 semanas, tenemos una disminución de la saliva media en reposo a  $21,20 \pm 10,12$  mm (rango 5,71-40,14) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $CC=0,543$ ;  $P=0,007$ ).

#### 4.1.8.4.2 Asociación tasas salivales y cultivo final

Durante el tratamiento con RTP, sólo hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre la disminución de saliva y la aparición de candidiasis a partir de la sexta semana de tratamiento, es decir, en la sexta semana, la media de TSG-I para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido  $12,94 \text{ mm} \pm 7,094$  (rango 9,16-16,72) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de  $20 \text{ mm} \pm 8,587$  (rango

16,09-23,91), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,012$ ). (Gráfico 1).

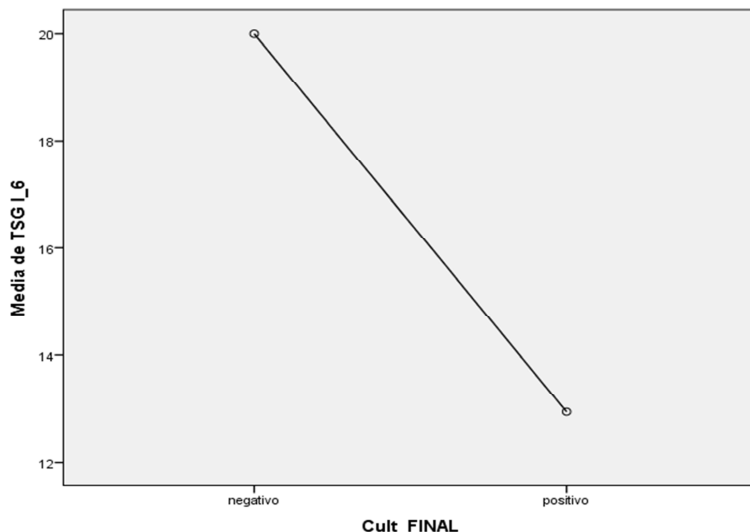
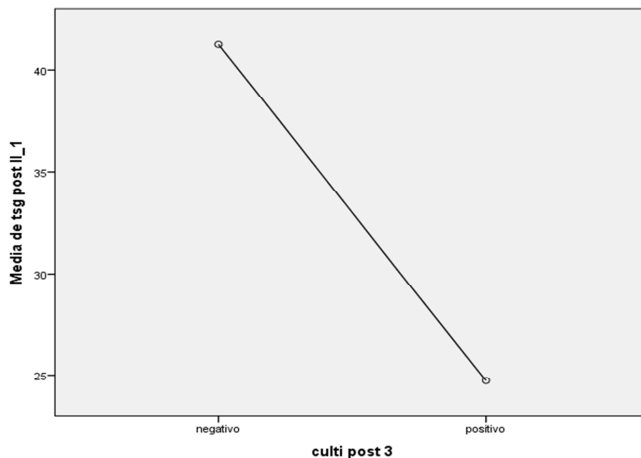


Gráfico 1 Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a las seis semanas de tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final

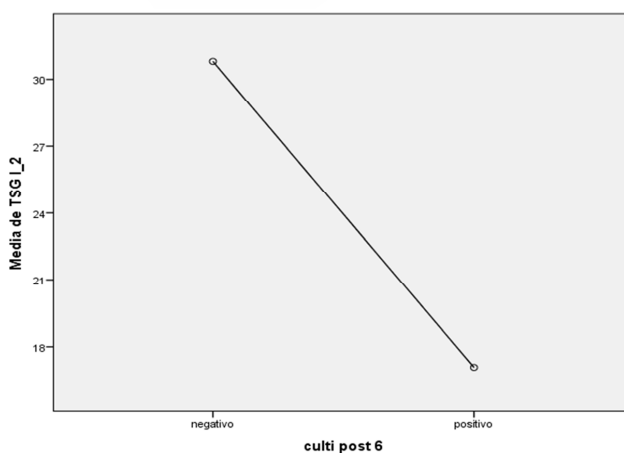
#### 4.1.8.4.3 Asociación entre tasas salivales y cultivo post-tratamiento a los 3, 6 y 12 meses

Siguiendo la misma línea indicada anteriormente, sólo hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa entre la disminución de saliva y la aparición de candidiasis post-tratamiento a los 3 meses. Así, la media de TSG-II en el primer mes post-RTP, para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido  $38,67 \text{ mm} \pm 13,895$  (rango 31,76-45,58), frente a los pacientes que son negativos que tienen tasas de saliva estimulada de  $54,35 \text{ mm} \pm 27,485$  (rango 42,46-66,23), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,033$ ). (Gráfico 2)



**Gráfico 2** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II al mes de terminar la RTP en función de la positividad para el cultivo a los tres meses post-tratamiento

La media de TSG-I en la segunda semana del tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 6 meses post-tratamiento ha sido  $17,08\text{mm} \pm 7,708$  (rango 12,42-21,73) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de  $30,08\text{mm} \pm 22,576$  (rango 21,48-40,12) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,041$ ). (Gráfico 3).



**Gráfico 3** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a las dos semanas de tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los seis meses post-tratamiento

La media de TSG-I en la séptima semana del tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 6 meses post-tratamiento ha sido  $12,43\text{mm} \pm 5,094$  (rango 7,72-17,14) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de  $21,20\text{mm} \pm 10,122$  (rango 15,59-26,81), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,044$ ).

La media de TSG-II en la séptima semana del tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 6 meses post-tratamiento ha sido  $20,25\text{mm} \pm 6,702$  (rango 9,59-30,91) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-II de  $34,50\text{mm} \pm 10,607$  (rango 26,91-42,09), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,030$ ).

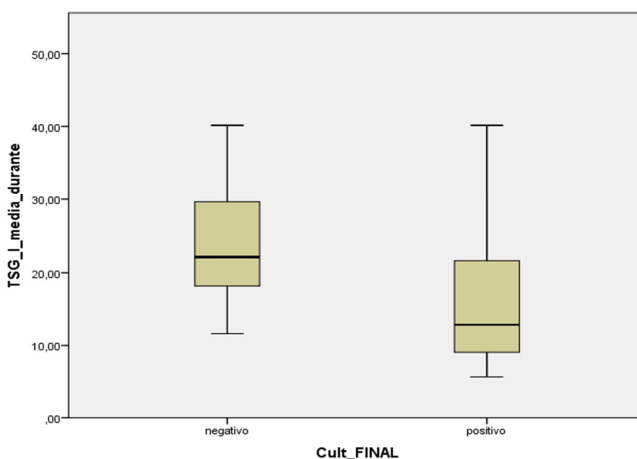
La media de TSG-I en el periodo de las 7 semanas durante el tratamiento, para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 6 meses post-tratamiento ha sido de  $13,85\text{mm} \pm 5,78$  (rango 7,78-19,92) mientras que para los pacientes que son negativos tienen TSG-I de  $25,26\text{mm} \pm 10,14$  (rango 19,40-31,12), siendo estas diferencias son estadísticamente significativas ( $p=0,020$ ).

La media TSG-II en la séptima semana del tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 12 meses post-tratamiento ha sido  $18,00\text{mm} \pm 6,083$  (rango 2,89-33,11) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-II de  $33,82\text{mm} \pm 10,313$  (rango 26,89-40,75), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,028$ ).

La media de TSG-I en el periodo de las 7 semanas durante el tratamiento, para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 12 meses post-tratamiento ha sido de  $12,60\text{mm} \pm 6,20$  (rango 2,73-22,47) mientras que para los pacientes que son negativos tienen TSG-I de

24,15mm±10,03 (rango 18,80-29,49), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,043$ ).

En la gráfica 4 podemos ver que la tasa salival media durante el tratamiento disminuye y se relaciona con la aparición de candidiasis.



Gráfica 4 Diagrama de cajas donde se aprecian los valores de TSG-I medios durante la RTP en relación a la positividad para candida

#### 4.1.9 Situación oral del paciente post-RTP

##### 4.1.9.1 Mucositis

Según los resultados que muestra la tabla 18, vemos como a medida que aumentan los meses post-RTP, disminuyen las complicaciones, tan sólo el 1,2% de los pacientes presentan eritema a los 2 años de tratamiento; bien es cierto que tenemos que recalcar que durante el seguimiento de estos pacientes hemos tenido bastantes bajas, bien por fallecimiento, bien por abandono de los controles y a los 3 años de tratamiento, tan sólo podemos seguir el control de 22 pacientes de 83.

Meses	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4
1 <sup>a</sup>	63,6%	29,5%	4,5%	2,3%	
3er	88,1%	9,5%	2,4%		
6 <sup>o</sup>	94,7%	2,6%	2,6%		
9 <sup>o</sup>	97,4%	2,6%			
12	97,4%	2,6%			
24	96,9%	3,1%			
36	100%				

**Tabla 18** Prevalencia de pacientes que presentan mucositis post-tratamiento desde el 1<sup>er</sup> mes hasta los 36 meses post-tratamiento

Se encontró una relación estadísticamente significativa entre la ausencia de mucositis a los 9 y 12 meses post-tratamiento y el cultivo negativo ( $p=0,033$ ).

#### 4.1.9.2 Radiodermatitis

Tras un año de tratamiento con RTP, vemos que no existe ningún paciente con radiodermatitis y este punto de corte se produce a los 6 meses post-RTP, como se refleja en la tabla 19.

Meses	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
1 <sup>a</sup>	77,3%	20,5%	2,3%	
3er	97,6%	2,4%		
6 <sup>o</sup>	100%			
9 <sup>o</sup>	100%			
12	100%			
24	100%			
36	100%			

**Tabla 19** Prevalencia de pacientes que presentan mucositis post-tratamiento desde el 1<sup>er</sup> mes hasta los 36 meses post-tratamiento

#### 4.1.9.3 Infección por candida a los 3,6 y 12 meses post-RTP

El estudio de la posible infección por candida, post-RTP en dorso lingual, nos indica que al año de recibir el tratamiento con RTP, tan sólo

18,4% de los pacientes presentaban candidiasis frente al 81,6% que fueron negativos; estos resultados (Tabla 20) indican que al final de todo el tratamiento se restaura la flora bacteriana, y disminuye la candidiasis en los pacientes.

	POSITIVO	NEGATIVO
PRE-RTP	47%	53%
DURANTE RTP	55,8%	44,2%
FINAL RTP	45,2%	54,8%
3 MESES POST	42,9%	57,1%
6 MESES POST	34,2%	65,8%
12 MESES POST	18,4%	81,6%

**Tabla 20** Prevalencia de pacientes que presenta infección por *Candida* durante el tratamiento con RTP: antes, durante, al final y 3, 6 y 12 meses post-tratamiento

Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el cultivo positivo y el número de cigarrillos, viendo que a los 12 meses de terminar el tratamiento, cuanto menos fuman más positividad para *Candida* ( $p=0,05$ ).

#### 4.1.9.4 Cantidad de saliva en reposo y estimula post-RTP

Después de los 12 meses de RTP, vemos que, a medida que aumentan las semanas, el flujo de las glándulas salivales también aumenta y, por tanto, mejoran los niveles salivales tanto en reposo como en estimulación. Si nos fijamos en los resultados al mes de terminar la RTP, tenemos una media de TSG-I de 17,25mm y de TSG II de 33,30mm, pero a los 12 meses post-RTP, se consigue aumentar la media de TSG-I con 26,39mm y de TSG-II con 45,08mm.

Por otro lado la media total de TSG-I post-RTP es de 22,35mm±10,14 (rango 5,60-53,60) y la media total de TSG-II post-RTP es de 39,37mm±17,11 (rango 18,80-94,20).

Si nos fijamos en los resultados de la tabla 21, vemos que a los 2 y 3 años post-RTP los niveles salivales de TSG-I aumentan frente al año de terminar la RTP; no sucede lo mismo con TSG-II que disminuye debido a la atrofia de las glándulas salivales donde la saliva es espesa y viscosa.

	1	3	6	9	12	24	36
TSG-I	17,95	21,21	21,82	23,76	26,39	25,84	29,73
TSG-II	33,80	34,25	37,73	41,14	45,08	38,88	43,50

Tabla 21 Medias de tasas salivales en reposo y estimulada de los pacientes después del tratamiento con RTP, desde el 1<sup>er</sup> mes hasta los 36 meses siguientes.

#### 4.1.9.4.1 Asociación de la media de TSG-I pre-RTP y la media de TSG-I post-RTP

Antes de la RTP, tenemos una media de TSG-I de  $37,24\text{mm} \pm 2,025$  (rango 10-99) y al terminar la RTP, concretamente a las 36 meses, tenemos una disminución de la saliva media en reposo de TSG-I a  $22,35\text{mm} \pm 10,14$  (rango 5,60-53,60) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $CC=0,434$ ;  $P=0,006$ ).

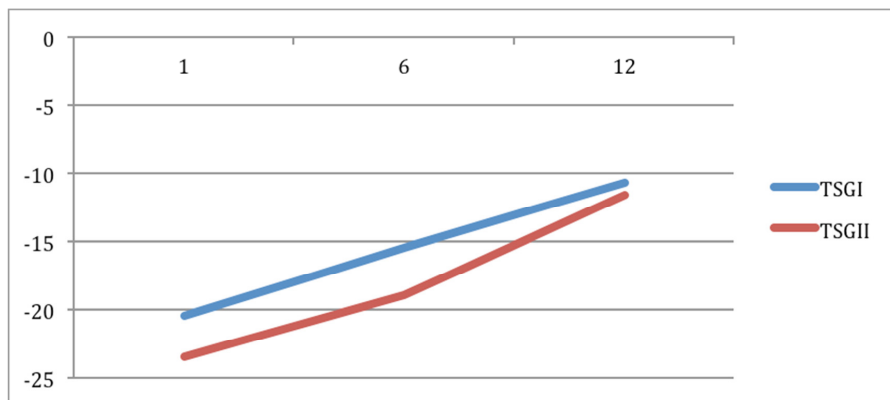
#### 4.1.9.4.2 Asociación de la media de saliva post-RTP I y II al mes, a los 6 meses y a las 12 meses

Existe una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de TSG-I y TSG-II al mes, a los 6 meses y a los 12 meses, siendo, respectivamente para cada una, los valores: ( $CC=0,522$ ;  $p<0,0001$ ); ( $CC=0,573$ ;  $p<0,0001$ ); ( $CC=0,48$   $p<0,0003$ ) es decir que a medida que aumenta el TSG-I va aumentando significativamente el TSG-II.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la media de TSG-I comparándola con la media de TSG-II al mes, a los 6 meses y a los 12 meses, pero sí que hemos observado que siempre la media TSG-II es mayor, como se puede ver en la tabla 22:

	Media	Desv. Estándar	95% intervalo de confianza inferior	95% intervalo de confianza superior	p
TSGI_POST_1-TSGII_POST_1	3	27,1586	-5,68574	11,68574	0,955
TSGI_POST_6-TSGII_POST_6	3,40541	22,52339	-4,10427	10,91508	0,555
TSGI_POST_12-TSGII_POST_12	0,86486	24,8542	-7,42194	9,15167	0,967

**Tabla 22** Asociación entre la cantidad media de saliva en reposo (TSG-I) y tras estimulación (TSG-II) al mes, a los 6 meses y 12 meses post-RTP



**Gráfico 5** Medias salivales post-RTP al mes, a los 6 meses y 12 meses

En la gráfica 5 podemos observar como los niveles tanto de TSG-I como de TSG-II van cambiando y acercándose al estado basal; habría que hacer un seguimiento a más largo plazo para ver si logramos recuperar dicho estado basal.

#### 4.1.9.4.3 Asociación de la media de saliva TSG-I post-RTP al mes, a los 6 meses y a los 12 meses

Existe una diferencia estadísticamente significativa de la saliva al mes, a los 6 meses y a los 12 meses, siendo está mayor, conforme aumentan los meses. (Tabla 23).

TSG-I	valor p
Mes 1 vs Mes 6	0,05
Mes 1 vs Mes 12	<0,001
Mes 6 vs Mes 12	0,015

**Tabla 23** Asociación entre la cantidad media de saliva en reposo (TSG-I) al mes, a los 6 meses y a los 12 meses post-RTP

#### 4.1.9.4.4 Asociación de la media de saliva TSG-II post-RTP al mes, a los 6 meses y a los 12 meses

No existe una diferencia estadísticamente significativa de la media de saliva TSG-II al mes y a los 6 meses, pero sí, al comparar esos niveles al mes y a los 12 meses y entre los 6 y los 12 meses como se puede ver en la tabla 24.

EN TSG-II	valor p
Mes1 vs Mes 6	0,166
Mes 1 vs Mes 12	0,005
Mes 6 vs Mes 12	0,004

**Tabla 24** Asociación entre la cantidad media de saliva tras estimulación (TSG-II) al mes, a los 6 meses y a los 12 meses post-RTP

#### 4.1.9.4.5 Asociación del nivel salival con la RTP

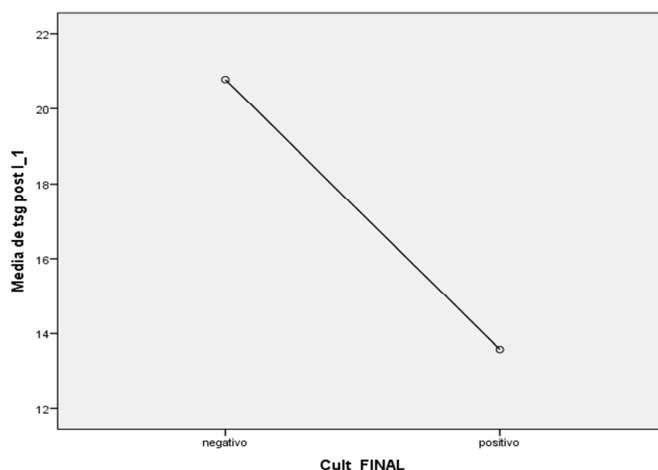
En nuestro trabajo no existe una asociación lineal entre la RTP y la tasa de salivación, aunque subamos la dosis de radiación la tasa de salivación no disminuye más. (Tabla 25).

		Sesion RTP	Valor p
TSGI_post_1	Coefficiente de correlación	-0,091	0,557
TSGII_post_1	Coefficiente de correlación	0,046	0,778
TSGI_post_6	Coefficiente de correlación	-0,13	0,437
TSGII_post_6	Coefficiente de correlación	-0,063	0,713
TSGI_post_12	Coefficiente de correlación	-0,198	0,233
TSGII_post_12	Coefficiente de correlación	-0,053	0,755

**Tabla 25** Asociación entre las tasas de salivación con la dosis de radiación recibida en los pacientes estudiados

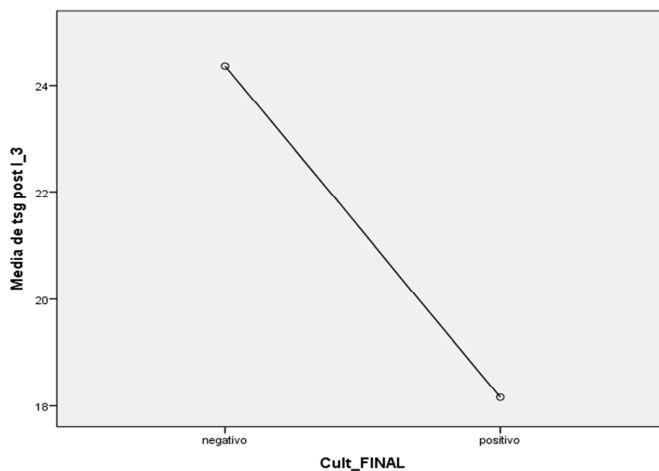
Después del tratamiento con RTP, existe una relación, estadísticamente significativa, entre la disminución de saliva y la aparición de candidiasis a partir del primer mes post-RTP.

La media de TSG-I en el primer mes post-RTP para los pacientes que han dado positivo en el cultivo para cándida ha sido  $13,58 \text{ mm} \pm 7,328$  (rango 10,05-17,11) frente a los pacientes que son negativos, que tienen TSG-I de  $20,78 \text{ mm} \pm 10,837$  (rango 16,10-23,91) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,018$ ). (Gráfico 6).



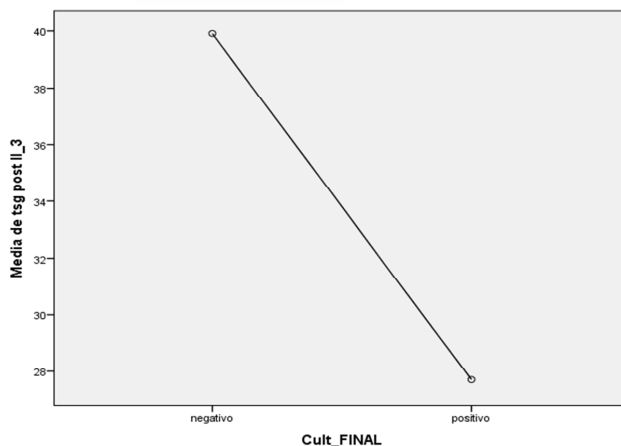
**Gráfico 6** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I al mes de terminar la RTP en función de la positividad para el cultivo final

Si continuamos a los tres meses de finalizar el tratamiento, seguimos obteniendo una relación estadísticamente significativa, para TSG-I en los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido de  $18,06 \text{ mm} \pm 10,035$  (rango 13,32-22,99) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de  $24,36 \text{ mm} \pm 9,389$  (rango 20,20-28,53) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,048$ ). (Gráfico 7).



**Gráfico 7** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final

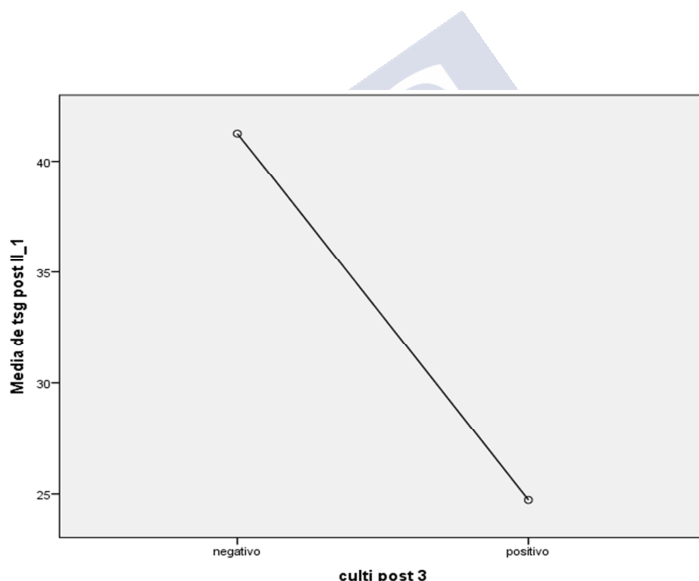
En cuanto a TSG-II a los tres meses post-tratamiento, los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido de  $27,71\text{mm} \pm 10,599$  (rango 22,26-33,16) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-II de  $39,91\text{mm} \pm 14,887$  (rango 33,31-46,51) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,007$ ). (Gráfico 8).



**Gráfico 8** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo final

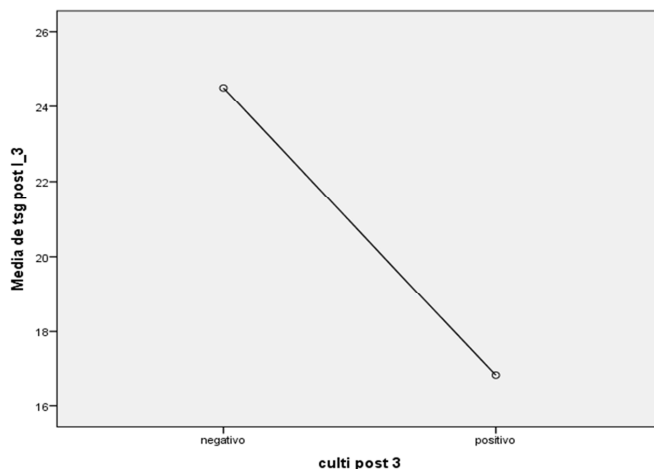
#### 4.1.9.4.6 Asociación tasas salival y cultivo post-RTP a los 3 meses

Después del tratamiento con RTP, existen una relación estadísticamente significativa entre la disminución de saliva y la aparición de candidiasis post-tratamiento a los 3 meses. La media de TSG-II en la primer mes post-tratamiento, para los pacientes que han dado positivo en el cultivo, ha sido  $24,73\text{mm} \pm 10,285$  (rango 19,04-30,43) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-II de  $41,26\text{mm} \pm 20,148$  (rango 32,55-49,97) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,006$ ). (Gráfico 9).



**Gráfico 9** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II al mes de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los 3 meses post-tratamiento

La media de TSG-I en el tercer mes post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido  $16,83\text{mm} \pm 8,053$  (rango 12,83-20,84) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de  $24,50\text{mm} \pm 10,380$  (rango 20,12-28,88), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,013$ ). (Gráfico 10).



**Gráfico 10** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-I a los tres meses de terminar el tratamiento con RTP en función de la positividad para el cultivo a los tres meses post-tratamiento

La media de TSG-I, en el periodo de 36 meses post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 3 meses post-tratamiento ha sido de  $19,43\text{mm} \pm 10,63$  (rango 13,77-25,10) mientras que para los pacientes que son negativos tienen TSG-I de  $24,48\text{mm} \pm 9,45$  (rango 20,29-28,67), siendo estas diferencias no estadísticamente significativas ( $p=0,132$ ).

#### 4.1.9.4.7 Asociación tasas salival y cultivo post-RTP a los 12 meses

Después del tratamiento con RTP, existen una relación estadísticamente significativa entre la disminución de saliva y la aparición de candidiasis post-tratamiento a los 12 meses.

La media de TSG-II en el primer mes post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido  $21,50\text{mm} \pm 11,167$  (rango 9,78-33,22) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-II de

38,71mm  $\pm$ 19,505 (rango 31,15-46,28), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,046$ ).

La media de TSG-I en el sexto mes post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido 13,43mm $\pm$ 3,952 (rango 9,77-17,08) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de 23,71mm $\pm$ 11,702 (rango 19,42-28,00), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,029$ ).

La media de TSG-I en el noveno mes post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido 14,29mm $\pm$ 7,274 (rango 7,56-21,01) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de 25,90mm $\pm$ 13,260 (rango 21,04-30,77), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,032$ ).

La media de TSG-I en el doceavo mes post-tratamiento para los pacientes que han dado positivo en el cultivo ha sido 16,00mm  $\pm$  6,633 (rango 9,78-22,13) frente a los pacientes que son negativos que tienen TSG-I de 28,74mm  $\pm$ 13,510 (rango 23,79-33,70) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,021$ ).

La media de TSG-I en el periodo de las 36 meses después del tratamiento, para los pacientes que han dado positivo en el cultivo a los 12 meses post-RTP ha sido de 14,25mm $\pm$ 3,35 (rango 11,14-17,36) mientras que para los pacientes que son negativos tienen TSGI de 24,18mm $\pm$ 10,39 (rango 16,97-26,70), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,017$ ).

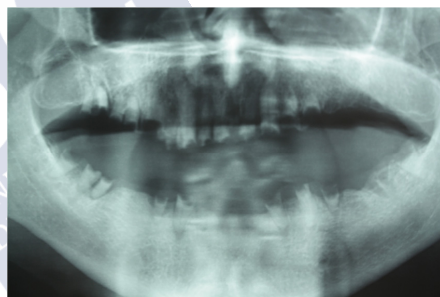
#### 4.1.9.5 Extracciones post-RTP

Estos pacientes presentan un deterioro completo de la corona del diente, derivado de las caries post-irradiación (Ilustración 10 y 11), que se inician a los tres meses de finalizar la RTP, fundamentalmente por la alteración cuantitativa y cualitativa de la saliva.

Se debe esperar al menos 18 meses para poder hacer extracciones en la cavidad oral; en nuestra muestra, de los 83 pacientes, hemos perdido a 48 tras 3 años post-tratamiento, por tanto de los 35 restantes, 17 (48,6%) no han necesitado ninguna extracción y 18 (51,4%) han necesitado al menos una extracción después de recibir el tratamiento.



**Ilustración 10** Radiografía panorámica donde se puede ver la situación oral del paciente antes de someterse a tratamiento con RTP



**Ilustración 11** Radiografía panorámica donde se puede ver la situación oral, concretamente los restos radiculares, que presenta el paciente post-RTP

#### 4.1.9.6 ORN

De 83 pacientes del estudio, tan solo hemos podido hacer el seguimiento a largo plazo en 37 pacientes, de los cuales, 15 (40,5%) han desarrollado una ORN frente a 22 (59,5%) que no tuvieron dicha complicación. En cuanto las causas, 6 (40%) han sido de manera espontánea, 4 (26,7%) por exodoncias post-RTP y 5 (33,3%) relacionadas con exodoncias pre-RTP.

En cuanto al momento de aparición, 12 (80%) aparecieron tras terminar el tratamiento y 3 (20%) durante la RTP. En cuanto a la localización, 12 (80%) fueron localizadas en la mandíbula y 3 (20%) en maxilar superior. De esos 15 pacientes que presentaron ORN, en 6 (33,3%) conseguimos cerrar la necrosis óseas, 3 (20%) están estable (no aumentan de tamaño pero tampoco se cierra la necrosis) y 7 (46,7%) han fallecido con la necrosis.

#### **4.1.9.6.1 Distribución de la ORN según QTP**

De los 15 pacientes que desarrollaron ORN, 14 (93,3%) de ellos estuvieron a tratamiento concomitante con QTP, frente a 1(6,7%) que desarrolló ORN pero no estuvo a tratamiento con QTP. No siendo una relación estadísticamente significativa ( $p=0,314$ ).

#### **4.1.9.6.2 Distribución de la ORN según Estadío**

De los 15 casos de ORN, 12 (80%) presentaban un estadío IV, 2 (13,3%) se encontraba en estadío III, y 1 (6,7%) en estadío I. Sin que exista una relación estadísticamente significativa entre ambas variables ( $p=0,212$ ).

#### **4.1.9.6.3 Distribución de la ORN según Hábitos Tóxicos**

En relación a la aparición de ORN, sólo fue desarrollada por 15 pacientes, de los cuales 13 (86,7%) presentaban hábitos tóxicos, consumo de alcohol y/o tabaco, mientras que sólo 2 (13,3%) no poseían hábitos tóxicos. Sin embargo no hemos encontrado estadísticamente significativa ( $p=0,474$ ).

#### **4.1.9.6.4 Distribución de la ORN según las extracciones pre y post-RTP**

De los 15 pacientes, 10 (66,7%) se le realizaron extracciones pre-RTP frente a 5 que desarrollaron ORN, y no se le hicieron extracciones pre-RTP. Sin relación estadísticamente significativa ( $p=0,476$ ), pero fundamentalmente se puede deber al poco tiempo de espera entre el que realizamos la extracciones y el comienzo de la RTP.

De los 15 pacientes, 7 (46,75%) se le realizaron extracciones post-RTP tras esperar 18 meses y, aun así, desarrollaron ORN frente a 8 (53,3%) que desarrollaron ORN y no se le relacionan con extracciones post-RTP. Sin relación estadísticamente significativa ( $p=0,625$ ).

#### **4.1.9.6.5 Distribución de la ORN según la cirugía pre-RTP**

El número de pacientes que desarrollaron una ORN y que tuvieron que ser operados antes de recibir la RTP es de 12 (80%). Solo hay 3 (20%) casos que no hicieron ORN y si fueron operados. No existe relación estadísticamente significativa entre ambas variables ( $p=0,427$ ).

#### **4.1.9.6.6 Distribución de la ORN según el cultivo en la mitad de tratamiento**

De los casos con ORN tan sólo tenían sobreinfección por *Candida* en la mitad del tratamiento 4 (33,3%) de los pacientes, frente a 8 (66,7%) que presentaban ORN y no tenían candidiasis ( $p=0,043$ ). Siendo esta relación estadísticamente significativa.

#### **4.1.9.6.7 Distribución de la ORN en el control a los 2 años**

A los dos años de terminar con el tratamiento, es decir, a los 24 meses, 14 (93,3%) de los 15 pacientes ya habían desarrollado la ORN, frente a 1 (6,7%) caso que la desarrolló a posteriori. Sin relación estadísticamente significativa. ( $p=0,193$ ).

#### **4.1.9.6.8 Distribución de la ORN según el estado bucodental a los 2 años y a los 3 años de seguimiento**

En lo que respecta a la distribución de la ORN según el estado bucodental, en nuestra muestra, hemos encontrado que de los 15 pacientes que tuvieron una necrosis ósea, tan sólo tenemos seguimiento bucodental de 12 de ellos, y podemos decir que sólo 3 (25%) continúan con necrosis pero controladas, 1 (8,3%) con una boca muy inestable, 2 (16,7%) con necrosis curada y bocas estables y 6 (50%) edéntulos y sin necrosis. Siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,050$ ).

A los 3 años post-tratamiento, vemos que, de los 15 pacientes iniciales, tan sólo sobreviven 10, y sólo 1 (10%) de ellos permanece con necrosis estabilizada; de los 9 restantes es importante señalar que todos están sin necrosis y con bocas estables, concretamente 7 (70%) mantienen su dentadura estable sin necrosis, 1 (10%) se encuentra edéntulo y 1 (10%) está rehabilitado con prótesis completas. Siendo esta relación estadísticamente significativa ( $p=0,014$ ).

#### **4.1.9.6.9 Distribución de la ORN según sus causas de aparición y su momento de aparición y localización.**

Las causas fundamentales de la aparición de ORN en nuestros 15 pacientes fueron en 6 (40%) espontáneas (dosis-dependiente) frente a 5

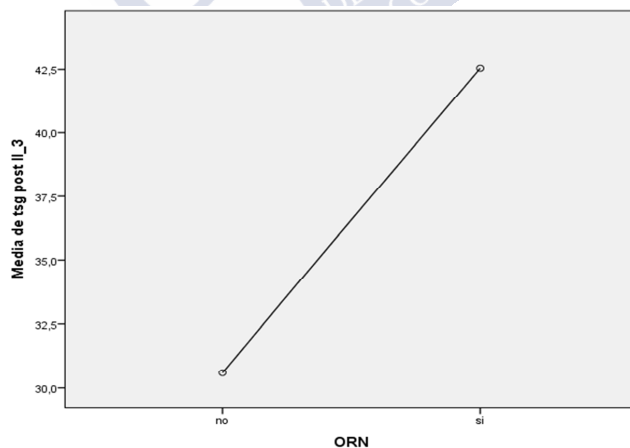
(33,3%) que fueron relacionadas con exodoncias pre-RTP y 4 (26,7%) que fueron por extracciones post-RTP.

En cuanto a qué momento es el más prevalente para desarrollar una ORN, vemos que de los 15 casos, 12 de ellos fueron post-RTP (80%) y tan sólo el 3 (20%) durante la RTP.

Si nos fijamos en la localización, 12 (80%) se encuentran en la mandíbula frente a 3 (20%) que se sitúan en el maxilar.

#### 4.1.9.6.10 Asociación de la ORN y TSG-II post-RTP a los 3 meses

La media de TSG-II a los 3 meses de terminar el tratamiento para los pacientes que han desarrollado una ORN ha sido de 42,55mm  $\pm$ 16,60 (rango 31,39-53,70) frente a los pacientes que no han desarrollado una ORN que tienen TSG-II de 30,60mm $\pm$ 13,60 (rango 24,23-36,97) siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,039$ ). (Gráfico 11).



**Gráfica 11** Gráfico de medias. Niveles medios de TSG-II a los tres meses de terminar el tratamiento en función de la ORN

#### **4.1.10 Asistencia a visitas de seguimiento**

Tras dos años de recibir el tratamiento con RTP tan sólo hemos podido valorar el seguimiento en 32 pacientes (38,6%) y los 51 restantes (61,4%) no acudieron a la consulta (bien por abandono o por fallecimiento).

A los 3 años de tratamiento, 23(27,7%) pacientes acuden a controles y 60 (72,3%) no acuden a controles.

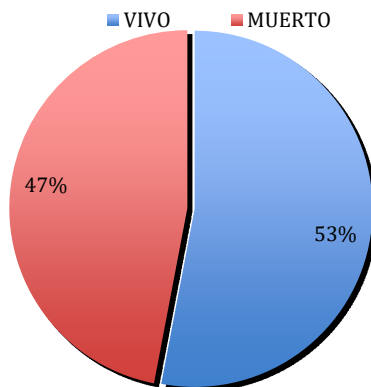
#### **4.1.11 Recurrencia, Seguimiento y Supervivencia a los 3 años**

En cuanto a la recurrencia de enfermedad, hemos visto que de los 83 pacientes a 3 años, el 54,2% ha tenido una recidiva del tumor primario frente a un 43,3% que no ha tenido ninguna recidiva; en cuanto a la supervivencia a los 3 años, un 53% no sobreviven a la enfermedad tras recibir tratamiento de RTP frente a un 47% que si lo hacen.

La media de seguimiento de nuestros pacientes fue de 41,48 meses con un rango de 20,30-53,73 meses.

##### **4.1.11.1 Análisis del tiempo de supervivencia**

A los 83 pacientes se les realizó un seguimiento de la enfermedad desde el momento del diagnóstico. Dicho seguimiento terminaba en el momento del fallecimiento o al cierre del estudio, si permanecía vivo. Se registró el tiempo de supervivencia para cada paciente. De los 83 pacientes, el 47 % falleció.(Gráfico 12).



**Gráfico 12** Porcentaje de supervivencia de los 83 pacientes tras el seguimiento durante 3 años

Los factores en los que se analizó la influencia de la supervivencia de los pacientes fueron los siguientes: estadio, fumadores (número de cigarrillos), recurrencia de la enfermedad y localización.

#### 4.1.11.1.1 Estadio

Los pacientes presentaron un tiempo medio de supervivencia medio de 19,89 meses, con un intervalo de confianza al 95% [15,85-23,93]. El tiempo medio de supervivencia es más elevado en estadios iniciales (T1) siendo de 26,187 meses (13,61-38,75), seguidamente sobreviven más los pacientes en estadios T4, siendo de 20,7 meses (15,77-25,63) y por último la menor supervivencia es para los estadios T2-T3 con una media de 16,201 meses (1,62-30,78) y de 15,286 meses (4,59-25,98) respectivamente; a pesar de las diferencias encontradas, el test del Logaritmo del Rango confirma que las curvas de supervivencia no son estadísticamente significativas ( $p=0,687$ ). (Gráfico 13).

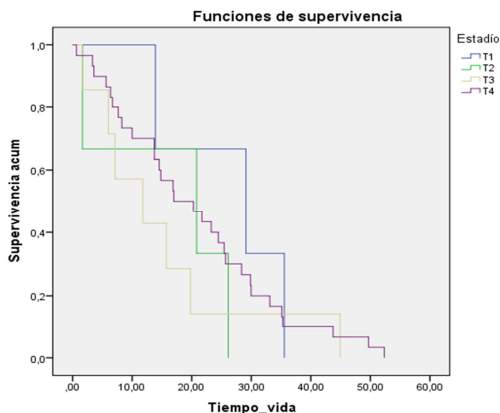


Gráfico 13 Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de su estadio tumoral

Si asociamos supervivencia y estadios, codificando en iniciales (seguimiento de 21,194 meses; 11,536-30,852) y avanzados (seguimiento 19,681; 15,212-24,151) vemos que la supervivencia a los 19,892 meses es igual ya sea estadio inicial (I-II) y avanzado (III-IV). La media de supervivencia de los pacientes no disminuyó significativamente a medida que el estadio clínico de la lesión avanzaba. ( $p=0,877$ ; Long Rank Test).

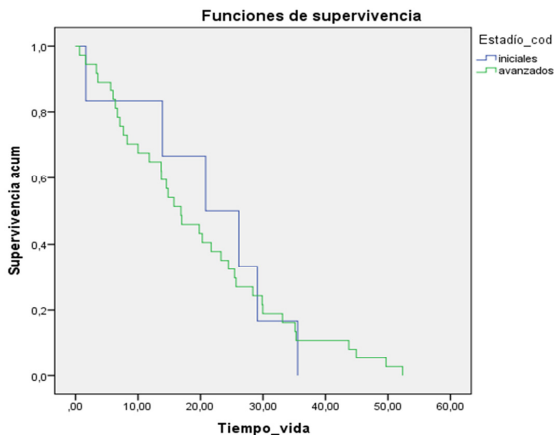


Gráfico 14 Análisis de la supervivencia de los pacientes en función de su estadio tumoral codificado

De lo que se deduce, que un paciente en estadio inicial, en promedio, no vive mucho más que otro en estadio IV (Gráfico 14).

#### 4.1.11.1.2 Fumadores (número de cigarrillos)

Los tiempos medios de supervivencia fueron de 26,93 meses (15,50-38,37), 16,53 meses (11,63-21,44), 40,25 meses (28,32-52,17), 19,92 meses (15,22-24,61), y 4,85 meses (1,85-7,84) para los no fumadores, exfumadores, fumadores de 1-10 cigarrillos, fumadores de 10-20 cigarrillos y para fumadores de más de 40 cigarrillos, respectivamente. La media de supervivencia disminuyó significativamente a medida que aumento el consumo de cigarrillos al día ( $p=0,001$ ; Long Rank Test).(Gráfico 15).

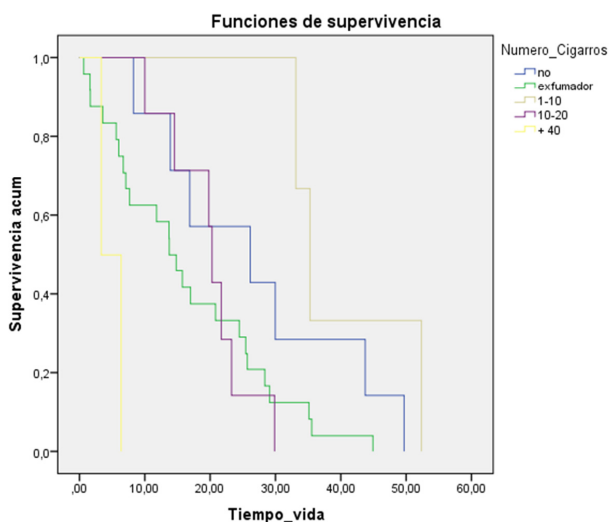


Gráfico 15 Curva de supervivencia de los pacientes en relación con la variable fumador

#### 4.1.11.1.3 Recurrencia de la enfermedad

Los pacientes que presentaron una recidiva del tumor primario presentaron un tiempo medio de supervivencia de 22,29 meses (17,72-

26,85) frente a los que no presentaron recurrencia que fueron de 11,19 meses (6-16,07); siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,002$ ; Long Rank Test).(Gráfico 16).

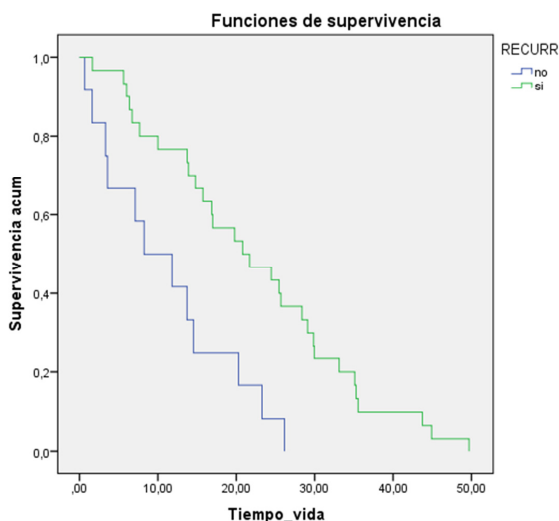


Gráfico 16 Análisis de la supervivencia de los pacientes en base a la recurrencia de la enfermedad

#### 4.1.11.1.4 Localización

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes según la localización del tumor primario ( $p=0,010$ ; Log Rank Test); agrupando las localizaciones en orales y otras (básicamente zona de orofaringe), hemos visto que las localizaciones orales tienen mayor supervivencia que las orofaríngeas, 21,844 meses (15,13-28,55) y 18,95 meses (15,85-23,93), respectivamente; por tanto parece existir una mayor agresividad de las localizaciones orofaríngeas aunque cuando hacemos el análisis estadístico las diferencias no son significativas ( $p=0,778$ ; Long Rank Test).(Gráfico 17).

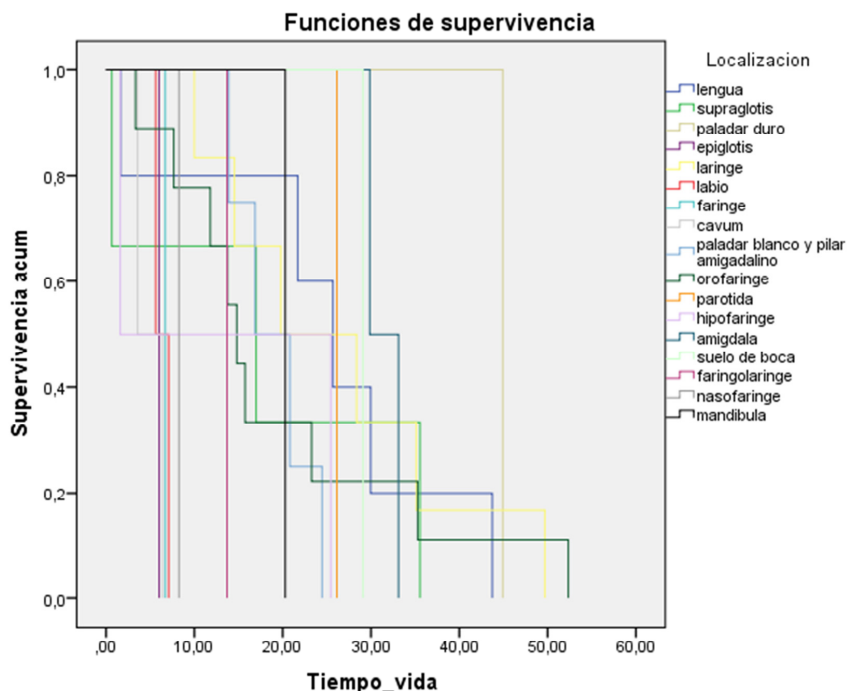


Gráfico 17 Curva de supervivencia de la población estudiada en función de la localización tumoral

## 4.2 Calidad y cantidad de ADN

Extrajimos el ADN total en 78 casos (43 ADN-PRE y 35 ADN-POST) y 23 controles. Los pacientes pre y post no son los mismos casos, dado el bajo grado de compromiso de los pacientes durante el seguimiento del tratamiento.

Los resultados pueden apreciarse en las tablas de casos y controles donde se especifica de cada muestra la concentración, la pureza de la muestra con los valores de absorbancia 260/280 y 260/230 (Anexo XIII).

### 4.3 Metilación

De los 83 pacientes, el 51,8% tienen extracción de ADN pre-RTP y 41% extracción de ADN post-RTP, como se puede ver en la siguiente tabla 26:

GENES	SI HAY METILACIÓN	NO HAY METILACIÓN
MGMT pre-RTP	3 (7%)	40 (93%)
MGMT post-RTP	1 (2,8%)	34 (97,2%)
DAPK1 pre-RTP	6 (14%)	37 (86%)
DAPK1 post-RTP	2 (6%)	33 (94%)
p16 pre-RTP	16 (37,2%)	27 (62,8%)
p16 post-RTP	9 (25,8%)	26 (74,1%)
CCND2 pre-RTP	4 (9,2%)	39 (90,8%)
CCND2 post-RTP	2 (6%)	33 (94%)
TIMP-3 pre-RTP	4 (9,3%)	39 (90,7%)
TIMP-3 post-RTP	10 (31,6%)	24 (68,4%)

Tabla 26 Porcentajes de metilación en los distintos genes estudiados, en pacientes antes y después de recibir la RTP

De los 23 pacientes controles analizamos el porcentaje de metilación de los diferentes genes estudiados como se muestra a continuación en la siguiente tabla 27.

GENES	SI HAY METILACIÓN	NO HAY METILACIÓN
MGMT	1 (4,3%)	22 (95,7%)
DAPK1	7 (30,4%)	16 (69,6%)
p16	0%	100%
CCND2	0%	100%
TIMP-3	0%	100%

Tabla 27 Porcentajes de metilación en los genes estudiados en los 23 pacientes control

### 4.3.1 Metilación caso-control pre-RTP

#### 4.3.1.1 MGMT pre-RTP

En nuestro estudio 4 pacientes tienen metilado el gen MGMT pre-RTP, 3 (75%) fueron casos, frente a 1 control (25%) por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,670$ ). (Ilustración 12).

#### 4.3.1.2 p16 pre-RTP

No existe ningún control que haya dado positivo para p16 frente a los 16(100%) casos que presentaban metilación antes del tratamiento, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,001$ ). (Ilustración 13).

#### 4.3.1.3 DAPK1 pre-RTP

En nuestro estudio 13 pacientes tienen metilado el gen DAPK1 pre-RTP, 6(46,2%) fueron casos, frente a 7 control (53,8%) por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,109$ ). (Ilustración 14).

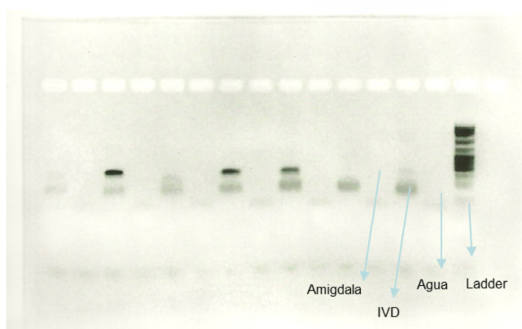


Ilustración 12 Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de MGMT

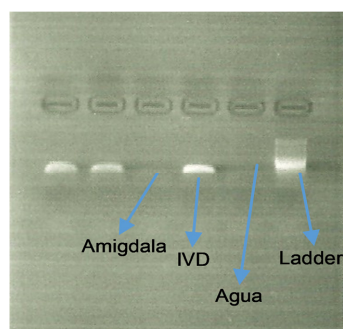


Ilustración 13 Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de P16

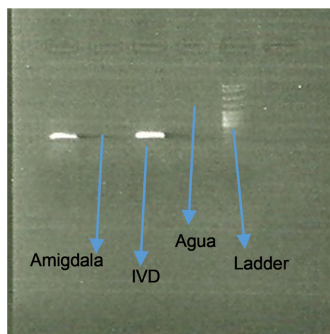


Ilustración 14 Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de DAPK1

#### 4.3.1.4 CCND2 pre-RTP

En nuestro estudio 4 pacientes, dentro del grupo casos, tienen metilado el gen CCD2 pre-RTP, frente a 0 controles, por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,131$ ). (Ilustración 15).

#### 4.3.1.5 TIMP-3 pre-RTP

En nuestro estudio 4 pacientes, dentro del grupo casos, tienen metilado el gen TIMP-3 pre-RTP, frente a 0 controles por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,131$ ). (Ilustración 16).

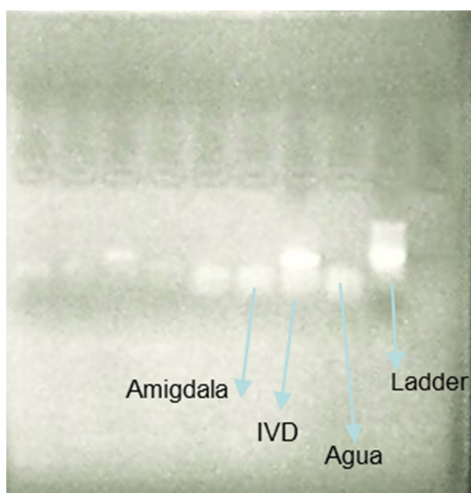


Ilustración 15 Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de CCND2

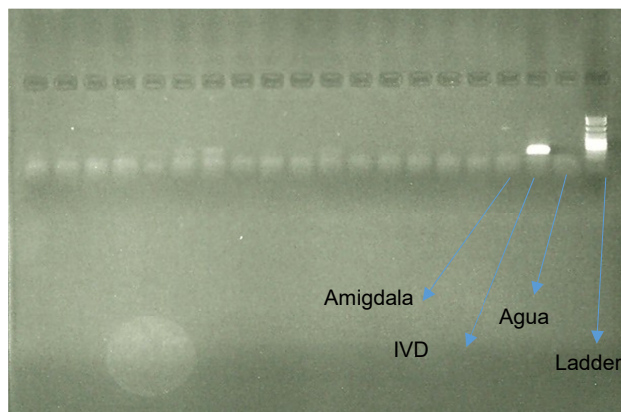


Ilustración 16 Gel de agarosa donde se observan metilados algunos casos de TIMP-3

### 4.3.2 Asociaciones metilación

#### 4.3.2.1 Asociación pre/post-RTP metilación en los casos

Analizamos la relación en la metilación de los diferentes genes, antes y post-RTP, y no hemos encontramos diferencias estadísticamente significativas en ningún gen. (Tabla 28).

Metilación Gen	Valor P
MGMT	0,35
DAPK1	0,26
P16	0,25
CCND2	0,50
TIMP-3	0,75

Tabla 28 Asociación en el estado de metilación de los genes indicados antes y después de la RTP

#### 4.3.2.2 Cambios metilación pre/post-RTP estudiados en el mismo caso

De las 78 muestras estudiadas, tan sólo hemos podido hacer el seguimiento pre-post en 11 pacientes. De los 5 genes que hemos estudiado,

no se encontraron cambios pre/postRTP, en cuanto a metilación, en MGMT ni en TIMP-3. Si que encontramos cambios en el gen p16 y CCND2, principalmente han pasado a una demetilación, es decir de metilado a no metilado.

Para p16, de 11 pacientes, 3 (2,8%) han sufrido una demetilación y para CCND2, 1 (0,9%) ha sido demetilación. Por otro lado el gen que más variabilidad ha tenido pre/post fue el DAPK1, algunos pacientes han sufrido una demetilación (2 pacientes (1,9%) y otros una metilación {2 pacientes (1,9%)} y sin embargo otros 7 han mantenido el mismo estado inicial (6,6%).

#### 4.3.2.3 Asociación de Cambios metilación pre/post estudiados en el mismo caso (enjuague pre-RTP y post-RTP) y los Gy recibidos

No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre la dosis de RTP en los diferentes subgrupos para los diferentes genes, comparando la variable Gy\_total en los diferentes subgrupos de cada gen (Demetilado, metilado, no cambios). En la siguiente tabla 29 se muestran los resultados estadísticos.

	Cambmeti_p16	N	Media	DS	valor p
Gy_total	Demetilado	3	64,6667	5,03322	0,279
	No Cambios	8	69	4,78091	
	Cambmeti_CCND2				
Gy_total	Demetilado	1	64		0,545
	No Cambios	10	68,2	5,11642	
	Cambmeti_DAPK1				
Gray_total	Demetilado	2	67	9,89949	0,155
	No Cambios	7	68,2857	4,68025	0,667
	Metilado	2	67	4,24264	0,657
	Total	11	67,8182	5,01634	

Tabla 29 Asociación en el estado de metilación de los genes indicados antes y después de la RTP y los Gy recibidos en el mismo paciente

### 4.3.3 Supervivencia y metilación

#### 4.3.3.1 Metilación MGMT pre y post-RTP

El tiempo medio de supervivencia es más elevado en los pacientes que presentan metilación previa del gen MGMT, 17 meses (17-17) frente a los pacientes que no presentan metilación, con una media de 11,46 meses (8,28-14,64), siendo estas diferencias no estadísticamente significativas ( $p=0,672$ ; Long Rank Test).(Gráfico 18).

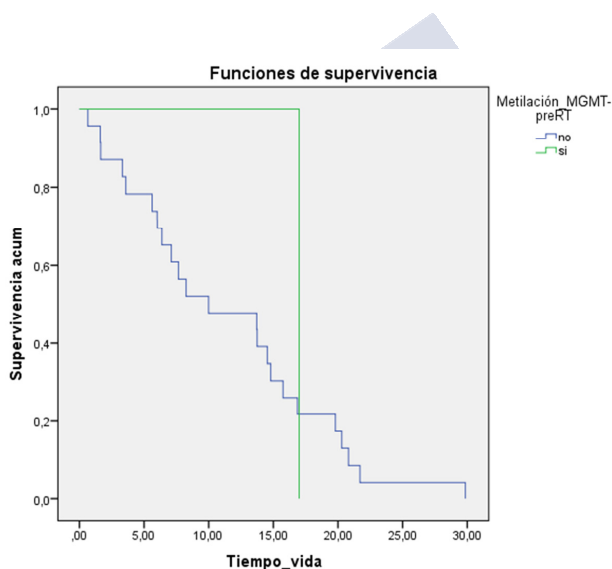


Gráfico 18 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen MGMT pre-RTP

Los pacientes que no presentan metilación del gen MGMT después del tratamiento viven una media de 23,28 meses (18,29-28,18), no hemos podido comparar con casos que diesen positivo post-RTP, porque no hemos encontrado ninguno en nuestra serie de casos. (Gráfico 19).

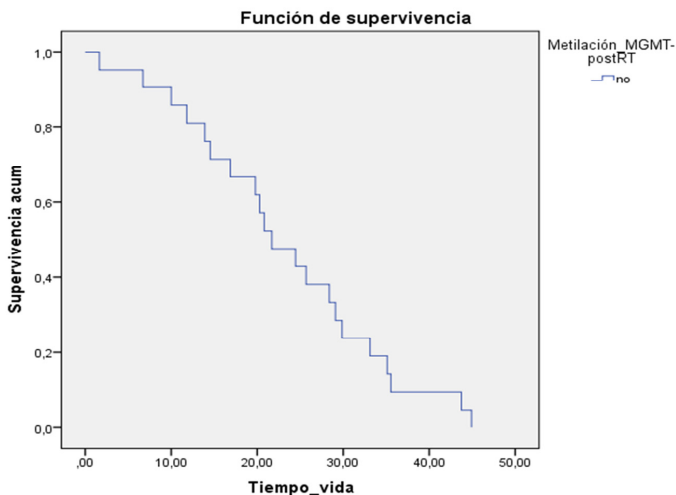


Gráfico 19 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen MGMT post-RTP

#### 4.3.3.2 Metilación DAPK1 pre y post-RTP

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con el gen DAPK1 metilado antes del tratamiento fue 17 meses (10,55-23,44) frente a los no metilados, que fue de 11,21 meses (7,95-14,47) siendo estas diferencias no estadísticamente significativas ( $p=0,646$ ; Long Rank Test) (Gráfico 20)

En cuanto al tiempo medio de supervivencia en pacientes con DAPK1 positivo después del tratamiento es menor que en los pacientes que no presentan metilación, 15,40(4,80-26) frente a 24,06(18,78-29,33), respectivamente; concretamente viven 9 meses menos si presentan metilación de dicho gen, siendo estas diferencias no estadísticamente significativas, ( $p=0,147$ ; Long Rank Test) (Gráfico 21)

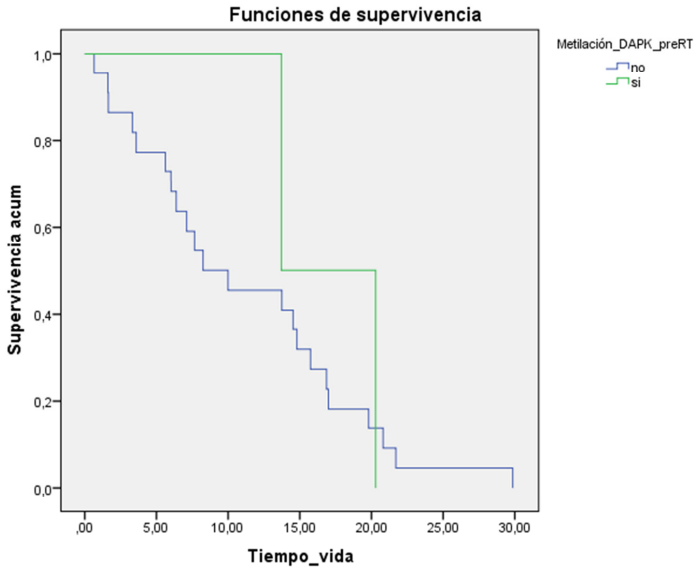


Gráfico 20 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen DAPK1 pre-RTP

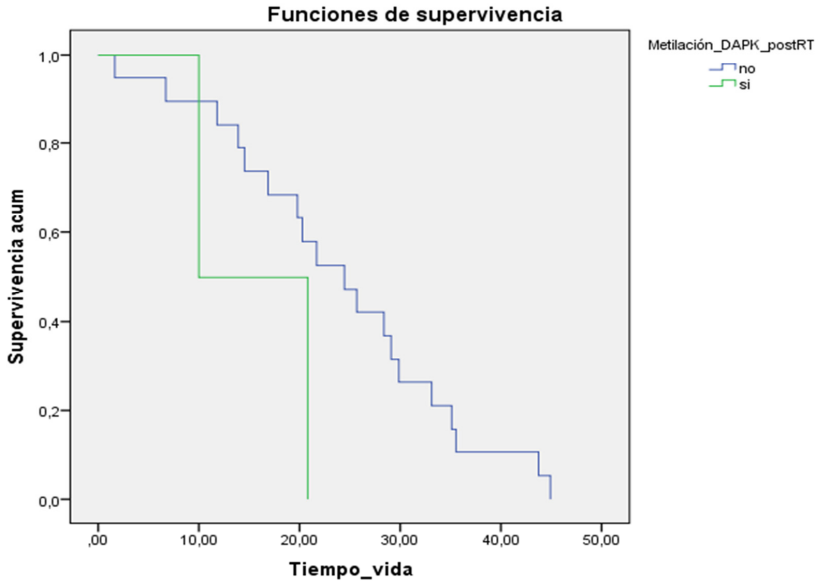


Gráfico 21 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen DAPK1 post-RTP

### 4.3.3.3 Metilación p16 pre y post-RTP

El tiempo medio de supervivencia en pacientes con metilación de p16 antes del tratamiento es de 10,85 meses (6,09-15,61) frente a los que no tienen metilación, que sobreviven una media de 12,11 meses (8,07-16,16), por tanto resulta beneficioso antes del tratamiento no presentar metilación de dicho gen, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,456$ ; Long Rank Test).(Gráfico 22).

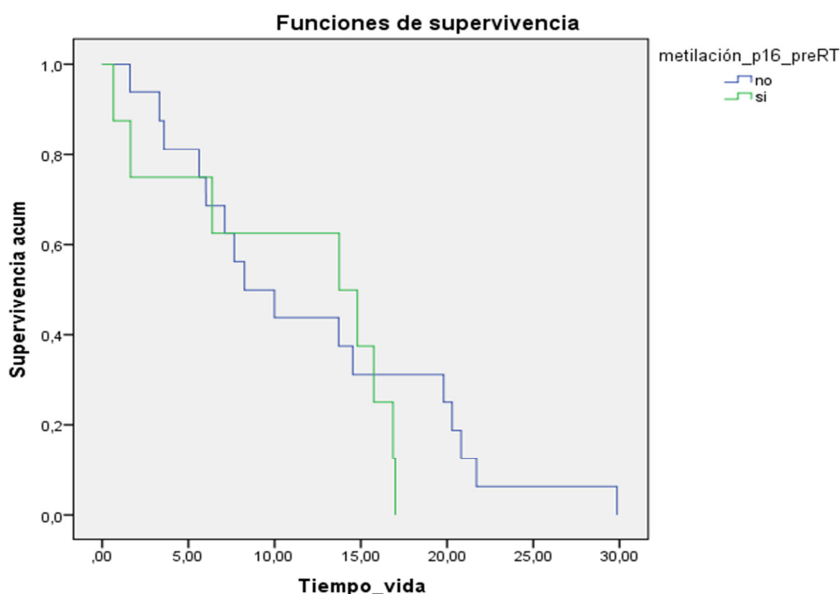


Gráfico 22 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen p16 pre-RTP

Por otro lado, valoramos también la curva de supervivencia de Kaplan-Meier en función de la metilación de p16 post-tratamiento, viendo que el tiempo medio de supervivencia para los pacientes en que presentan metilación de p16 después del tratamiento fue de 33,87 meses (26,38-41,37), y de 20,73 meses (15,50-25,96) para los pacientes que no presentan

metilación después del tratamiento. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,91$ ; Long Rank Test). (Gráfico 23).

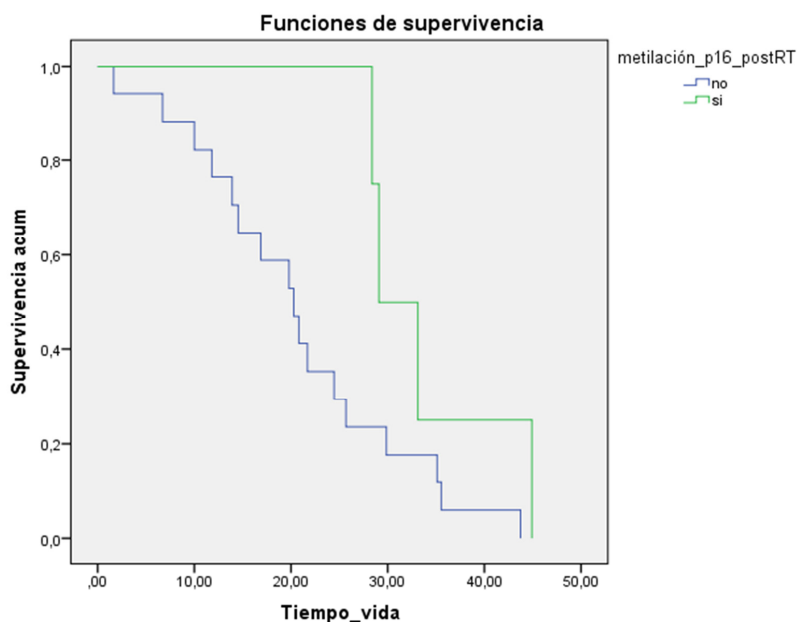


Gráfico 23 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen p16 post-RTP

#### 4.3.3.4 Metilación CCND2 pre y post-RTP

Los tiempos medios de supervivencia para los pacientes que no presentaban metilación pre de CCNAD2 fueron de 12,414 meses (9,13-15,69) frente a los que si presentaban metilación previa que fueron de 6,675 meses (0-14,71). La media de supervivencia de los pacientes disminuyó a medida que aumenta la metilación de CCND2 antes del tratamiento, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,162$ ; Long Rank Test) (Gráfico 24).

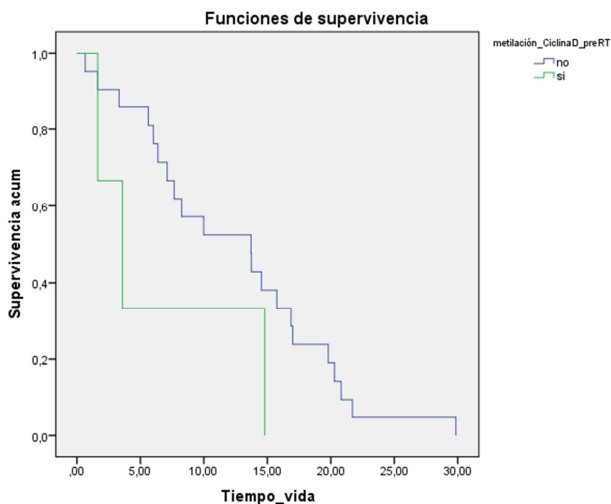


Gráfico 24 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen CCND2 pre-RTP

Por otro lado, los tiempos de supervivencia para los pacientes que no presentaban metilación de CCND2 después del tratamiento fueron de 23,23 meses (18,29-28,18). No encontramos casos de metilación de CCND2 después de recibir la RTP (Gráfico 25).

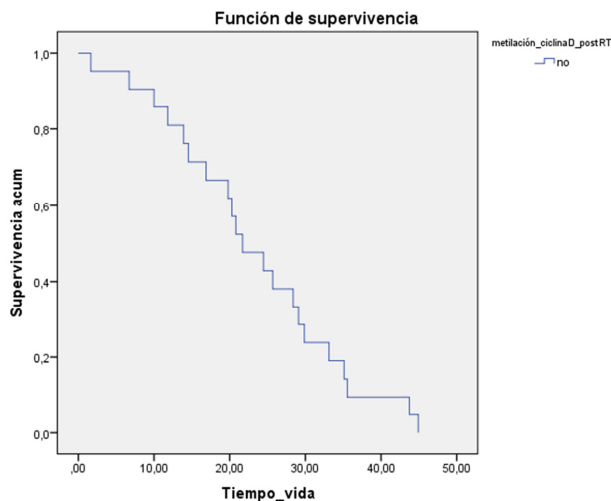
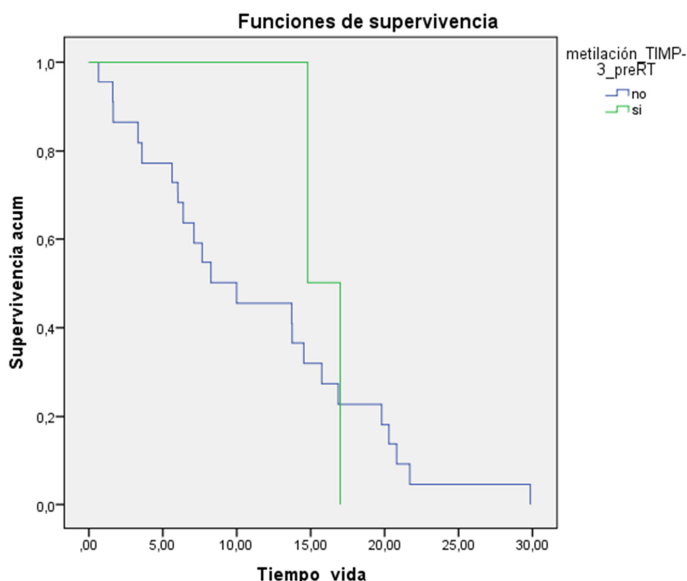


Gráfico 25 Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen CCND2 post-RTP

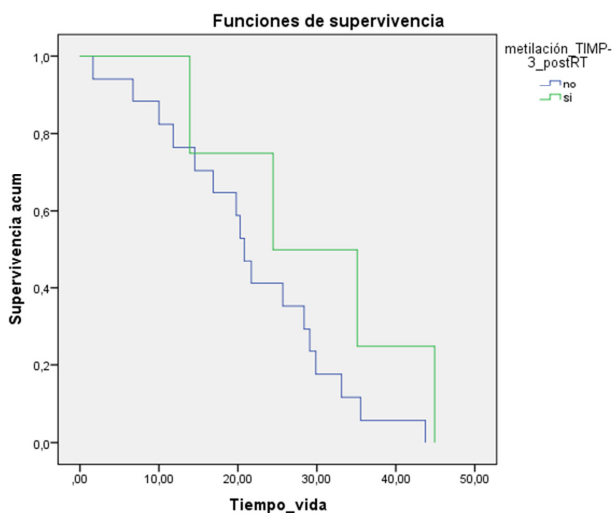
#### 4.3.3.5 Metilación TIMP-3 pre y post-RTP

Los pacientes con metilación previa de TIMP-3 en el momento del diagnóstico presentaron un tiempo de supervivencia de 15,89 meses (8,62-14,77) frente a los que no presentaron metilación que fueron de 11,31 meses (8-14,62), siendo estas diferencias no significativas ( $p=0,704$ ; Long Rank Test) (Gráfico 26).

Si estudiamos la curva de supervivencia después del tratamiento vemos que sobreviven más meses los pacientes que presentaron metilación de dicho gen, concretamente 29,604 meses (18,29-28,18) frente a los 21,74 meses que sobreviven los pacientes que no presentan metilación de dicho gen después del tratamiento (16,51-26,96), pero estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,704$ ; Long Rank Test) (Gráfico 27).



**Gráfico 26** Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen TIMP-3 pre-RTP



**Gráfico 27** Curva de supervivencia poblacional en relación al estado de metilación del gen TIMP-3 post-RTP

#### 4.4 Modelos de Regresión

En el primer modelo de regresión no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-I post al mes de la RTP ( $p=0,461$ ), pero si en cuanto lo asociamos con el sexo y con las adenopatías. El modelo sería:  $TSG-I = -35,14 - 13,817 \times \text{Sexo}$  (IC95%  $-26,97 / -0,657$ ;  $p < 0,04$ ). Por cada incremento del valor de sexo se produce una reducción de la tasa TSG-I que varía desde  $-26,977$  a  $-0,657$ . Por otro lado con las adenopatías el modelo sería:  $TSG-I = -35,14 - 10,77 \times \text{Adenopatías}$  (IC95%  $-18,09 / -3,45$ ;  $p < 0,0005$ ). Por cada incremento en el valor de las adenopatías se produce una reducción de la tasa de TSG-I al mes post-tratamiento que varía desde  $-18,09$  a  $-3,45$ .

En el segundo modelo de regresión no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-II post al mes de la RTP ( $p=0,318$ ), ni tampoco cuando lo asociamos con el sexo ( $p=0,094$ )

pero si en cuanto lo asociamos la presencia de metástasis. El modelo sería:  $TSG-II = -89,80 - 16,68 \times \text{Metástasis}$  (IC95%  $-30,92 / -2,45$ ;  $p < 0,023$ ). Por cada incremento del valor de metástasis se produce una reducción de la tasa TSG- II al mes post-tratamiento que varía desde  $-30,92$  a  $-2,45$ .

En el tercer modelo de regresión no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-I post a los 6 meses de la RTP ( $p = 0,623$ ) pero si en cuanto lo asociamos la presencia de adenopatías. El modelo sería:  $TSG-I = -29,62 - 9,172 \times \text{Adenopatías}$  (IC95%  $-16,67 / -1,673$ ;  $p < 0,018$ ). Por cada incremento en el valor de las adenopatías se produce una reducción de la tasa de TSG-I a los 6 meses pos-tratamiento que varía desde  $-29,62$  a  $-9,172$ .

En el cuarto modelo de regresión no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-II post a los 6 meses de la RTP ( $p = 0,427$ ), ni tampoco cuando lo asociamos con las metástasis ( $p = 0$ ) ni con la localización ( $p = 0,107$ ).

En el quinto modelo de regresión no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-I post a los 12 meses de la RTP ( $p = 0,413$ ) ni tampoco cuando lo asociamos con el tamaño ( $p = 0,451$ ) ni con la presencia de hábitos tóxicos ( $p = 0,069$ ) pero si cuando lo asociamos con las adenopatías ( $p = 0,014$ ). El modelo sería:  $TSG-I = -24,84 - 8,21 \times \text{Adenopatías}$  (IC95%  $-14,66 / 1,77$ ;  $p < 0,014$ ). Por cada incremento en el valor de las adenopatías se produce una reducción de la tasa de TSG-I a los 6 meses post-tratamiento que varía desde  $-14,66$  a  $-1,77$ .

En el sexto y último modelo de regresión realizado, no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre los Gy totales y TSG-II post a los 12 meses de la RTP ( $p = 0,189$ ), ni tampoco cuando lo asociamos con la presencia de hábitos tóxicos ( $p = 0,316$ ) ni con la localización ( $p = 0,984$ ).



# 5 DISCUSIÓN





## 5.1 Consideraciones generales

El término cáncer oral se emplea como sinónimo de carcinoma oral de células escamosas (COCE) que constituye el 90% de todos los cánceres de cabeza y cuello y el 3-4% de las neoplasias malignas (3,4).

El COCE constituye un grave problema sanitario a nivel mundial, por lo que la profesión odontológica tiene un papel clave en su lucha, interviniendo fundamentalmente en la prevención, abarcando los tres niveles, ya sea primaria (reducir la incidencia, centrándose fundamentalmente en los factores de riesgo; secundaria (realizando un diagnóstico precoz) y terciaria (revisiones periódicas para reducir la aparición de un nuevo cáncer o una recidiva, y ayudar al paciente para minimizar los efectos secundarios del tratamiento oncológico en la cavidad oral, (280) ya que al final del tratamiento del COCE, el paciente puede haber perdido las habilidades básicas para comer, beber, hablar y tragar, así como distorsión facial, por lo que es de vital importancia el diagnóstico en estadios iniciales (281). Los efectos adversos que ocasiona el tratamiento con RTP, en muchas ocasiones, les obliga a interrumpir el tratamiento y en su defecto a abandonar las vistas de seguimiento desde un 2,4% hasta un 80% (282,283).

El diagnóstico del COCE es anatomopatológico, pero a día de hoy es importante tener presente el análisis molecular, donde se podrían detectar precozmente cambios malignos en la mucosa oral o predecir las metástasis y/o la posibilidad de recidiva tumoral, así como la agresividad de dicho tumor y poder ofrecer un tratamiento más efectivo a cada estirpe tumoral; por lo que el objetivo final, será predecir el pronóstico del tumor, escoger el

tratamiento de elección y poder detectar carcinomas de cabeza y cuello en estadios primarios pero para llegar a ello, tendremos que conocer de una forma clara los mecanismos patogénicos que participan en la carcinogénesis (284-287) es así que estudiaremos su comportamiento desde un punto de vista genético.

El tratamiento para tratar este tipo de patología, sigue siendo la cirugía y su combinación, o no, con RTP y QTP; dicho tratamiento sigue provocando numerosas secuelas y disminuyen la calidad de vida del paciente (como ya se indicó dificultades para comer, hablar, pérdida de la estructura facial).

Los efectos inducidos por la RTP afectan a la mucosa oral, a las glándulas salivales, al hueso, a los dientes y la musculatura de la cara y el cuello. Estas complicaciones requieren atención especial para su prevención y tratamiento. La evaluación previa a la RTP y un seguimiento de estos pacientes durante todo el tratamiento, además de un asesoramiento de los pacientes antes y durante y post-RTP para ayudarlos a tomar conciencia de todas las complicaciones orales y su prevención (288).

Actualmente los estadios avanzados pueden ser tratados con cirugía seguida de RTP, pero esta combinación sólo cura una minoría de los pacientes, y menos del 30% viven a los 5 años. El control del tumor y la supervivencia son insatisfactorios con estos tratamientos, porque sólo el 30% de los pacientes siguen vivos después de 3 años, mientras que del 60% al 70% tendrán una recidiva locorregional y/o desarrollarán metástasis a distancia, lo que es, en última instancia, la causa principal de muerte en estos pacientes (53).

En esta tesis, como se indicó en los objetivos, pretendemos estudiar la prevalencia de los efectos secundarios de la RTP en pacientes

diagnósticos de cáncer de cabeza y cuello, analizando, al mismo tiempo, en alguno de ellos, el estado de metilación de diversos genes (p16, DAPK1, MGMT, CCND2, TIMP-3) implicados en diferentes fases del ciclo celular, siendo nuestra meta el estudiar las necesidades de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello; ver cómo influye la metilación de dichos genes, antes y después del tratamiento, determinándolo en muestras salivales como técnica no invasiva para obtener el material genético.

La realización de este estudio nos ha permitido comprender las necesidades bucodentales que presentan los pacientes oncológicos durante el tratamiento con RTP de cabeza y cuello, y ver las complicaciones que se presentan, a largo plazo, con dicho tratamiento. La literatura nos dice que es necesario hacer una valoración dental de los pacientes antes de empezar el tratamiento con RTP, fundamentalmente realizar las exodoncias necesarias para evitar realizarlas post-RTP, para minimizar el riesgo de ORN (95,273,276,277,289).

En relación al tipo de tejido analizado, hemos utilizado muestras salivales de pacientes previas a la irradiación y tras un mes después de la irradiación, para verificar la posibilidad de utilizar esta técnica de manera rutinaria en el análisis de metilación de diversos genes.

Varios estudios han evaluado la presencia de metilación utilizando como, fuente de material nucleico, los fluidos corporales, tales como suero y saliva. Clásicamente, el ADN genómico de alta calidad se extrae de leucocitos en el suero. Sin embargo, debido a la invasividad y el coste de obtención, transporte, y procesamiento de muestras de sangre, el fluido oral es una alternativa importante y fiable para la investigación genética (203,205,258,290,291).

La saliva baña toda la cavidad oral y por tanto, es probable que sea más representativa de la totalidad del campo expuesto, que el examen de biopsia invasiva de tejido local; sin embargo hoy en día siguen planteándose dudas sobre la sensibilidad en relación con la contaminación por bacterias y las células inmunes. Es por tanto un método no invasivo y cómodo para el paciente, altamente sensible para controlar lesiones orales pre-malignas y malignas (292-294). Rosas et al., demostró por primera vez la posibilidad de detectar metilación de genes utilizando muestras de saliva, evaluando la presencia de metilación en la región promotora de los genes implicados en la supresión, metástasis tumoral y reparación de ADN, tales como CDKN2A / P16, MGMT Y DAPK1 (205).

En cuanto a la técnica utilizada para procesar dicho material genético y saber si existe metilación de los diferentes genes, hemos utilizado la MSP (PCR específica de metilación), de acuerdo con la mayoría de autores, y es la técnica más frecuentemente utilizada (191,216,239,295).

## **5.2 Datos Clínicos.**

El grupo de pacientes analizados en esta tesis doctoral, muestra una edad media (60,10 con un rango de 40-82 años) similar a las descritas por otros estudios (275,296,297); es una patología que afecta a partir de los 40 años, con un pico máximo en la década de los 60 años (28,33). Es raro la aparición de COCE en pacientes jóvenes, aunque esta incidencia parece estar aumentando (298), sin embargo no hemos encontrado, en nuestra serie estos casos.

En cuanto al sexo, existe una mayor proporción de hombres que de mujeres, concretamente un 69,9% de los pacientes eran hombres,

coincidiendo con la mayoría de los estudios (33,275,296,299,300), aunque el porcentaje de mujeres afectadas va en aumento debido al mayor consumo de tabaco y alcohol por parte de las mismas (301,302).

En relación a los factores de riesgo nos encontramos que el 51,8% de nuestros pacientes son ex-fumadores, porcentaje superior al descrito en la literatura; el 28,9% son fumadores habituales, dato similar al descrito por otros autores (296,297,303).

El segundo factor de riesgo por excelencia es el consumo de alcohol, el 18,1% de nuestros pacientes son ex-alcohólicos; el 4,8% son alcohólicos, el 2,4% beben alcohol de alta graduación, el 37,3% beben alcohol de baja graduación y el 37,3% no consumen alcohol. Estos porcentajes son muy similares a lo descrito en la literatura (303). Nuestros resultados reflejan que la presencia de factores de riesgo, concretamente el tabaco y alcohol, predisponen al desarrollo de la enfermedad, asimismo, se ha descrito que el consumo de tabaco y alcohol, además de un factor de riesgo reconocido, también se asocia a un pronóstico desfavorable en pacientes con COCE (304). Sin embargo, otros autores no encontraron asociación entre el consumo de tabaco y alcohol y el pronóstico en pacientes con COCE (305).

La localización más frecuente en nuestra serie de casos fue la Orofaringe en 15 casos (18,1%), seguida de la amígdala con 10 casos (12%) y muy seguidamente la lengua y la laringe con 9 casos cada una (10,8%), (siendo el porcentaje restante en localizaciones menos frecuentes) por lo que encontramos una variación respecto a lo descrito en la literatura, ya que la localización que con más frecuencia aparece es la lengua (5,48,95,306-308). Esto puede ser debido a que la mayoría de nuestros pacientes son

remitidos del servicio de otorrinolaringología del Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

El estadio tumoral más frecuente en el momento del diagnóstico fue el estadio IV con un 65,1%, seguido del estadio III con un 20,5%, el estadio II con un 9,6% y por último el estadio I con un 4,8%, estos resultados concuerda con otros estudios publicados, por lo que es necesario diagnosticar este tipo de tumor en estadio precoces, además de concienciar a la población que acuda a las revisiones odontológicas anuales (3,4,284,287,309-311). En cuanto a la asociación de los estadios con el sexo, la localización, habito tabáquico, tratamiento con QTP y recurrencia de la enfermedad, tan sólo hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas con la QTP y la recurrencia de la enfermedad, es decir, que los pacientes que reciben más tratamiento con QTP, presentan estadios más avanzados y los pacientes que tienen más recidivas son pacientes con estadios avanzados, lo cual es lógico sin pensamos en dicha asociación.

La cirugía y la RTP son los métodos más empleados en el tratamiento del COCE, aunque la QTP también se emplea en algunos casos, sola o en combinación con la RTP. En nuestra serie de casos todos los pacientes recibieron RTP, con una media de sesiones de 33,27, con un rango de 30-37; el 80,7% lo combinaron con QTP y el 57,8% recibieron cirugía pre-RTP (49,50).

No hemos encontrado ninguna otra asociación con ninguna de las otras variables clínicas estudiadas.

### **5.3 Situación oral del paciente antes de empezar el tratamiento**

Todos los pacientes que vayan a ser sometidos a tratamiento con RTP de cabeza y cuello deben presentar unas condiciones orales óptimas para así reducir el número de complicaciones durante el proceso de la RTP (312,313).

En nuestro caso, un 57,8% necesitaron realizarse una higiene dental antes de empezar dicho tratamiento frente a 42,2% que no lo necesitaron, estos resultados parecen ser contradictorios, pero realmente casi todos los pacientes vienen con una higiene oral pésima y un estado bucodental deteriorado por lo que la mayoría de los dientes necesitan alguna extracción dental.

Las necesidades de tratamiento son elevadas, el 72,3% de nuestros pacientes requirieron al menos una exodoncia con una media de 0,72 dientes. Tenemos un porcentaje elevado respecto a otros autores como Eptsein et al. (303) con un 68%, Sulaiman et al. con un 41.18% (275), Jham et al. (309) con un 50.2% aunque existen otros autores como Bonan et al. (297) que presentan porcentajes superiores a nuestros resultados (82%), es decir el rango oscila desde 68% al 82%, estando nuestros resultados dentro del mismo.

Las causas fundamentales de extracción fueron en el 62,7% enfermedad periodontal seguido de restos radiculares con el 81,9%, el 61,5% por caries; en cuanto a la enfermedad periodontal nuestro resultado coincide con los recogidos por otros autores. Respecto al porcentaje hallado en restos radiculares y en caries, son muy superiores a los encontrados en la literatura (275,309) ello puede ser debido a que en los rangos de edad en

que nos movemos, la costumbre de acudir a la consulta de odontología en nuestra zona sea escasa.

Los pacientes con COCE presentan hábitos de higiene oral inadecuados y se ve reflejado en las publicaciones de diversos autores (289,314,315). Diversos trabajos como los de Velly et al. (316), Zheng et al. (317) o Maier et al (318) reflejan una relación estadísticamente significativa entre una higiene oral deficiente y la presencia de cáncer; se cree que de este modo los agentes carcinogénicos tienen una acción más persistente en la mucosa tras no existir una correcta higiene dental (316).

En nuestro grupo de pacientes valoramos la higiene oral siguiendo el índice de Silnesloe (271), encontramos que el 37,3% presentaban placa abundante en esta misma zona del diente e incluso cubriendo el diente adyacente (Grado 3) y un 53% una acumulación moderada de placa en área gingival que es apreciada a simple vista (Grado 2) frente al 6% que presentaba placa no visible pero, que puede extraerse del tercio gingival del diente con ayuda de una sonda (Grado 1) y el 3,6% que presentaba ausencia de placa dental (Grado 0). Por todo ellos podemos concluir que existe una relación entre la aparición de cáncer oral y higiene oral deficiente, tal y como lo avalan otras series (289,314-316). Además hemos encontrado una relación estadísticamente significativa ( $p=0,000$ ) al relacionar la cantidad de dientes a extraer y la higiene oral (aspecto, por otro lado, lógico), por lo que sabemos que cuanto peor es la higiene oral mayor es la media de exodoncias; y así aquellos pacientes que muestren higiene oral deficiente son candidatos a extracciones previas al tratamiento con RTP (276,277,289).

Es necesario esperar un mínimo de 2 semanas entre la extracción y el inicio de la RTP para disminuir la aparición de ORN (84,94,274,277) aunque otros autores dicen que si se trata de procedimientos quirúrgicos complejos se debe esperar de 4 a 6 semanas (5,276). Nosotros creemos, en base a los resultados de nuestro estudio, que se debería esperar de 4-6 semanas, ya sea una exodoncia simple o un procedimiento complejo, ya que disminuimos las probabilidades de que se provoque una complicación durante el tratamiento con RTP.

Tan sólo el 39,8% de los pacientes necesitaron al menos un tratamiento conservador, ya que la mayoría de nuestros pacientes tienen una higiene oral deficiente y cualquier diente con pronóstico cuestionable, es decir, que sea un posible fracaso a medio-largo plazo y que provocaría un aumento de las complicaciones, se extrae. Este resultado es superior respecto a estudios previos, que presentan porcentajes más bajos (296,309). Sin embargo en el trabajo de Locckart et al. (314), el 49% requerían al menos de obturaciones dental, similar a la obtenida por nosotros y en el estudio de Martinez et al. el 41,23% necesitaba al menos una obturación (315).

No hemos podido comparar la producción de saliva en reposo y estimulada antes del inicio de la RTP con otros autores ya que ninguno evalúa la cantidad de saliva previa al tratamiento con RTP. Creemos que es necesario cuantificarla ya que si existe una xerostomía previa debemos tratarla para evitar complicaciones durante la RTP.

El porcentaje de sobreinfección por hongos antes de iniciar el tratamiento con RTP fue de un 45,8%. Este resultado es superior al de Jham et al. (309), con un 15%, probablemente esto se deba a que la mayoría de las series consultadas sólo hacen cultivo durante y post-RTP;

por otro lado encontramos en el trabajo de Arash Azizi et al., un 50% de los casos con sobreinfección antes del tratamiento con RTP, siendo muy similares a los encontrados en nuestro estudio (319). Es necesario eliminar la sobreinfección candidiásica antes de comenzar el tratamiento con la RTP, ya que a medida que aumenten las sesiones de RTP, el flujo salival se ve reducido y son más susceptibles a infecciones orales y bacterianas. Existe una correlación inversa entre la tasa de flujo salival y los recuentos de *Cándida* en la saliva (320,321).

#### **5.4 Situación oral del paciente durante el tratamiento**

Los pacientes que van a recibir RTP sufren principalmente tres complicaciones agudas que le provocan incapacidad funcional y poder desarrollar una vida normal, que son la mucositis, la radiodermatitis y la xerostomía (322). Debemos de hacer un control semanal, es decir, debemos ver al paciente una vez a la semana durante las 8 semanas que suele durar el tratamiento. La principal sintomatología aparece tras la quinta dosis de radiación y pueden durar hasta un mes post-tratamiento (323).

Una de las primeras complicaciones de la RTP es el desarrollo de mucositis, los tejidos blandos tras una semana o dos de irradiación muestra cierto grado de eritema. A medida que la radiación continúa, la mucosa puede exhibir un grado variable de descamación y ulceración franca, lo que produce dolor y disfagia, lo que hace que los pacientes consuman una dieta blanda que conduce a una pérdida de peso y malnutrición significativas (324). El desarrollo de la mucositis depende de la dosis de radiación, la localización del tumor y el grado de higiene oral. La mucositis puede ocurrir en cualquier lugar donde haya mucosa oral incluyendo la cavidad

oral, el esófago, la laringe y la faringe, clínicamente, la mucositis oral se produce debido al adelgazamiento epitelial y la vasodilatación. Esto puede provocar úlceras o llagas en la boca, desprendimiento del epitelio y formación de costras en los labios. La mucositis oral causa dolor y aumenta el riesgo de desarrollar una infección sistémica por infección bacteriana, fúngica o viral en la boca (288).

En nuestro estudio hemos podido observar que la mayor prevalencia de mucositis la encontramos en la quinta y sexta semana de tratamiento, concretamente en el grado 2, con 45,5% y un 43,6% respectivamente, por lo que se manifiesta que la mucositis es dosis dependiente. Hemos encontrado pocos casos con grados severos de mucositis, tan sólo un 2,6% presentaba Grado 4 en la sexta semana y un 4% en la séptima semana con un Grado 4 de mucositis. Nos ha sido difícil comparar nuestros resultados con otros trabajos, ya que la mayoría de artículos, analizan la mucositis de forma global a lo largo de todo el tratamiento, donde se muestra la prevalencia alta de la misma a lo largo del tratamiento, oscilando desde el 26% al 99%; pero no analizan el desarrollo de dicha manifestación semanalmente para ver su evolución en cada semana tal y como reflejamos en nuestro trabajo, siendo en nuestro caso una prevalencia de 87,57% (282,325-329). Por otro lado, encontramos porcentajes muy elevados que van del 90 al 100% (330) y Stephen Sonis et al. recoge un porcentaje en torno al 97% (331). Autores como D.E. Peterson et al., Stephen T. Sonis et al. hablan de un mayor número de casos de mucositis presentes entre la 2ª y 4ª semana de la RTP, sin embargo en nuestro estudio hemos visto que los mayores casos de mucositis los hemos encontrado a partir de la 4ª semana, a medida que se acumula la dosis de irradiación.

La xerostomía es responsable de los problemas más frecuentes y duraderos del tratamiento del cáncer, ya que la función de las glándulas salivales raramente se recupera (332). A medida que aumentan las semanas de tratamiento hemos encontrado una reducción de las tasas salivales de nuestros pacientes, tanto en la saliva en reposo como en la estimulada, esto se debe a la degeneración progresiva del epitelio acinar, acompañada de una fibrosis intersticial a medida que avanza el tratamiento. Los resultados más bajos de tasas salivales los hemos encontrado en las últimas semanas de tratamiento, donde los valores medios fueron, en la 6ª semana, TSG-I 16,69mm y TSG-II 33,80mm, y en la 7ª semana, TSG-I 17,64mm y TSG-II 28,81mm. Muchos artículos de la literatura muestran también una reducción significativa del flujo salival a medida que va avanzando el tratamiento de RTP, sin embargo, es difícil compararlos entre sí y con nuestro estudio puesto que se han utilizado diversos métodos para la recolección de saliva (333-335).

Los pacientes de nuestro estudio recibieron una dosis de irradiación que osciló entre los 64,00 Gy y los 74,00 Gy. Con estas dosis de radiación recibida todos los pacientes del estudio presentaron una disminución de la secreción salival con la consiguiente sintomatología acompañante. No existe uniformidad entre autores para saber cuál es la dosis a partir de la cual aparece la xerostomía. Para Rubin y Cassaret et al. (336) la disminución de la secreción salival se establece con dosis de radiación de 70 Gy; para Mira et al. (337) y Mossman et al. (338) la sintomatología aparece con dosis entre los 60-65 Gy y finalmente para Eneroth et al. (339) la xerostomía se establece con dosis de 40 Gy. Rubin y Cassaret et al. (336) observaron que a partir de la tercera semana de tratamiento la xerostomía es continua y está totalmente establecida. Una vez finalizado la RTP, la

secreción salival raramente vuelve a los valores iniciales (340), incluso después de haber pasado más de 5 años de haber finalizado el tratamiento (341).

Existe una relación estadísticamente significativa ( $p=0,008$ ) en la reducción de la tasa salival media, viendo que la saliva sufre una disminución de la media progresivamente desde el inicio hasta el final del tratamiento, concretamente hasta la 7ª semana; además hemos visto una relación estadísticamente significativa entre las tasas salivales y la positividad para *Cándida*, a partir de la sexta semana de tratamiento, por lo que queda reflejado la clara relación que existe entre la disminución de la saliva y la prevalencia de candidiasis, debido a que la composición de la saliva también cambia, encontrándose un aumento de la viscosidad, reducción de la capacidad tampón, alteración de la concentración de electrolitos y cambio de los sistemas antibacterianos inmunes y no inmunes por lo que se traduce en un aumento en la susceptibilidad a la candidiasis (342). Nuestros resultados son comparables con el estudio de Arash Azizi et al. que encontró diferencias estadísticamente significativas en los recuentos de *Cándida* antes y después de 4 semanas de RTP, por lo que el aumento de las infecciones por *Cándida* en pacientes sometidos a RTP de cabeza y cuello es el resultado de una disminución en las tasas de flujo salival; concretamente la dosis de  $\geq 50$  Gy darán como resultado un daño permanente de la glándula salival y síntomas de sequedad oral, la disfunción es grave y permanente (319,343).

La xerostomía y los irritantes locales crónicos pueden alterar las membranas de las mucosas orales, predisponiéndolas a la colonización e invasión por especies de *Candida* (344) que se considera tradicionalmente como saprofito de la cavidad oral, (5) pero los cambios en la flora

bacteriana, a menudo acompañan estas situaciones, y brindan la oportunidad para que las especies de *Cándida* se multipliquen (344). En pacientes irradiados, la infección clínica más frecuente de la orofaringe es la candidiasis (345,346). Hemos basado el diagnóstico de sobreinfección fúngica en la presencia de signos clínicos, su confirmación posterior mediante cultivo y la observación de que la candidiasis se resolvía al administrar durante 4 semanas el tratamiento antifúngico, como respaldan otros estudios (5,347). En nuestro trabajo hemos observado que durante la RTP el porcentaje de candidiasis aumenta, principalmente en la mitad del tratamiento, con un porcentaje de 55,8%. Al comparar nuestros resultados con otros autores, hemos encontrado prevalencias muy dispares, desde un 17-29% (80) y un 27% (348) pasando por un 34,7% (349) y un 37,4% (288,328) hasta prevalencias muy superiores a las nuestras, en tornos al 80% (296,350-352), e, incluso, un estudio de Arash Azizi et al .indicó una prevalencia del 100% (319).

Quizás la complicación menos estudiada en cuanto a prevalencia sea la Radiodermatitis. Existen actualmente pocos trabajos donde se evalúe la prevalencia de dicha afectación durante el tratamiento con RTP en el cáncer de cabeza y cuello. En nuestro trabajo hemos estudiado esta patología, que suele ocurrir dentro de las 2-3 semanas posteriores al comienzo de la RTP y, por lo general, se observa a niveles de dosis en la piel de 20-40 Gy (353). Durante la RTP este porcentaje se ha visto aumentado en las distintas semanas del tratamiento, alcanzando su pico máximo en la 6ª semana con un porcentaje del 41% en Grado 1 y 35,9% en Grado 2, sin embargo en la 5ª semana encontramos menos porcentaje de Grado 1 y Grado 2, siendo respectivamente de 30,2% y de 32,6% pero encontramos un alto porcentaje de Grado 3, con un 9,3%. En cuanto a la

prevalencia total, hemos de decir que fue de 80,86% y encontramos que en otros estudios presentan una prevalencia del 80-90% de radiodermatitis durante el tratamiento con RTP (353), y hasta de un 95% (354) mientras que nuestros niveles de radiodermatitis en grado 3 (9,3%) han sido muy similares según los descritos en la literatura con un 10-15% (355,356). Es importante destacar que la severidad de la radiodermatitis depende de la energía del haz, dosis por fracción, duración del tratamiento, aplicación de impulso, sitio de tratamiento y otros factores específicos del paciente como tipo de piel o los factores de riesgo como la diabetes (357).

### **5.5 Situación oral del paciente después del tratamiento**

Después de la finalización de la RTP, las complicaciones agudas generalmente comienzan a resolverse. Los pacientes deberían continuar siguiendo un régimen de autocuidado de salud oral para mantener los dientes y las encías saludables y para facilitar la reparación de cualquier daño oral residual. Las sesiones de consejería dietética adicionales pueden ser apropiadas para pacientes que deben hacer adaptaciones dietéticas a largo plazo para acomodar cambios permanentes a su cavidad oral producidos por cirugía y radiación; además debemos de estar en alerta ante cualquier signo o síntoma de recurrencia de la enfermedad (358). Por todo ello, se debe hacer un seguimiento post-tratamiento, para intentar paliar dichas dolencias.

El bienestar del paciente irradiado viene condicionado por una complicación aguda del tratamiento con RTP, fundamentalmente la Xerostomía; ya que predispone a los pacientes a una microflora oral alterada con mayor cantidad de bacterias virulentas y actividad fúngica

(359). Por otro lado, si lo sumamos a la presencia de mucositis y la dificultad para la masticación y deglución, y al tratamiento con RTP y QTP, se produce una situación de fatiga que hace que estos pacientes no acudan regularmente a los controles y que abandonen sus hábitos de higiene bucodental (360).

Aunque la mucositis sea una complicación aguda en la RTP, en nuestro estudio hemos visto que se reduce al 100% a los 36 meses post-radiación, siendo desde el 6º mes post-RTP una prevalencia baja del 2,6%, es decir, un eritema. Nuestros resultados concuerdan con lo publicado, a partir de la 4ª semana post-tratamiento, el 90-95% de los pacientes muestran una resolución completa de la mucositis y el dolor de garganta está ausente o es mínimo (64,361-362).

En cuanto a la Radiodermatitis, vemos que a partir del sexto mes post-tratamiento, el 100% de los pacientes presentan una curación total, sin embargo, no hemos podido comparar nuestros resultados con otros trabajos ya que en ninguno estudia la prevalencia de la radiodermatitis en cáncer de cabeza y cuello hasta 36 meses después del tratamiento con RTP.

Al remitir la mucositis, la mucosa no está tan expuesta a agentes externos por lo que los niveles de candidiasis deberían ser menores, y nuestros resultados así lo reflejan, tras 12 meses sin tratamiento sólo el 18,4% de los pacientes presentaban candidiasis frente al 81,6% que dio resultado negativo. En base a los resultados del presente estudio creemos que la disminución de las infecciones por Cándida, en pacientes sometidos a RTP de cabeza y cuello, es el resultado de una disminución en las tasas de flujo saliva, por lo que se produce un equilibrio en la flora bacteriana.

La Xerostomía es una de las secuelas más frecuentes de la RTP de cabeza y cuello ya que las glándulas salivales son órganos radiosensibles. Una reducción en la calidad y cantidad de saliva también conduce a un desequilibrio en la microbiota y la consiguiente aparición de enfermedades (363-365). En el presente estudio, el 100% de los pacientes fueron irradiados con una dosis superior a 50 Gy, por lo que implica un mal pronóstico con respecto al regreso de la función glandular normal. Sin embargo, nuestros resultados mostraron un aumento en secreción salival con aumento post-RTP; a medida que aumentan las semanas, el flujo de las glándulas salivales también aumenta y por tanto mejoran los niveles salivales tanto en reposo como en estimulación; si nos fijamos en los resultados al mes de terminar la RTP, tenemos una media de TSG I de 17,25mm y de TSG II de 33,30mm pero a los 12 meses post-RTP, se consigue aumentar la media de TSG-I con 26,39mm y de TSG-II con 45,08mm.

Paralelamente vemos que a los 2 y 3 años post-RTP los niveles salivales de TSG-I aumentan frente al año de terminar la RTP; no sucede lo mismo con TSG-II que disminuye debido a la atrofia de las glándulas salivales donde la saliva es espesa y viscosa; podría ser debido a que la afectación de la irradiación que se produce en estas glándulas no es una afectación homogénea, es decir, hay zonas en las cuales puede existir una desestructuración total del tejido glandular y sustitución del mismo por tejido fibroadiposo y otras zonas en las que únicamente aparece una alteración mínima del tejido glandular (366). Esta distribución irregular del daño glandular ya había sido descrita por otros autores como Fajardo y Berthrong et al. (367) y Harwood et al. (368). Una vez finalizado la RTP la secreción salival raramente vuelve a los valores iniciales (340), incluso

después de haber pasado más de 5 años de haber finalizado el tratamiento (341). Así lo podemos comprobar con nuestros resultados, viendo que a los tres años los niveles salivales no se restablecen, mejoran, pero nunca vuelve a ser lo iniciales.

Se siguieron los criterios de Sulaiman et al y Jansma et al. para la realización de las extracciones post-tratamiento; es necesario demorar toda cirugía 18 meses post-RTP para disminuir el riesgo (274,275), por lo que en nuestros pacientes tras 18 meses de RTP, hemos tenido que realizar en el 51,4% al menos una extracción después de recibir dicho tratamiento, mientras que el 48,6% no hay necesitado extracciones. Este porcentaje tan alto de pacientes al que hay que hacer al menos una extracción dental post-RTP, muestra la falta de colaboración durante el tratamiento; la ausencia de higiene dental sumado a la alteración cuantitativa y cualitativa de la saliva hacen que estos pacientes presentan un deterioro completo de la corona del diente derivado de las caries post-irradiación que se inician a los tres meses de finalizar la RTP.

La ORN puede llegar a ser la complicación más grave de la RTP (81). La ORN se origina como consecuencia de una reducción de la vascularidad del periodonto, periostio y hueso que ocasiona un tejido hipovascular, hipocelular e hipóxico, donde la capacidad de reparación y regeneración ósea está severamente comprometida (83-85) .

Un tercio de los casos de ORN se producen espontáneamente aunque la mayoría de los casos suceden por exodoncias de dientes durante la RTP, o por un tiempo insuficiente de curación después de extracciones pre-RTP. Sin embargo, la literatura muestra resultados indeterminados sobre exodoncias realizadas antes y después de la irradiación o en ambos (369).

Según Starcke y Shannon et al. , Murray et al., Makkonen et al., cuando se realizan correctamente las exodoncias pre-RTP y se espera el tiempo adecuado, no se ve un aumento significativo del riesgo de ORN (93-95). En nuestro estudio, los 5 casos (33,3%) que desarrollaron ORN, en el lugar donde se habían hecho las extracciones, fue debido a que el tiempo entre la extracción y el comienzo del tratamiento con RTP, fue menor a tres semanas por lo que no había una cicatrización de la zona de extracción. Al contrario que lo recogido en la literatura, nuestro porcentaje es menor (26,7%) cuando las extracciones las realizamos 18 meses después del tratamiento, ya que la mayoría de los autores han demostrado una mayor tasa de ORN cuando se eliminan los dientes post-RTP (370,371) pero pocos estudios muestran mayor riesgo de desarrollo de ORN cuando las exodoncias se realizaron antes del tratamiento de radiación (275,372).

La dosis de radiación es un factor importante para el desarrollo de ORN; cuanto mayor sea la dosis administrada, mayor es el riesgo de desarrollar ORN (96,370,373). Todos nuestros pacientes recibieron unas dosis superiores a los 65 Gy, por lo que existe una mayor incidencia de osteoradionecrosis (99,374,375). Concretamente el estudio de Tsai et al. sugiere que la reducción de la dosis de radiación inferior a 50 Gy puede disminuir el riesgo de ORN (376).

Nuestros resultados los podemos comparar con los encontrados por Regezi et al. (372) que encontraron un 2% en 49 pacientes antes de la irradiación y un 0% en 10 pacientes irradiados tras extracciones dentales; asimismo Sulaiman et al. (275) evaluaron 77 pacientes pre-RTP con 197 dientes extraídos, y 107 pacientes irradiados en los que se realizaron 330 exodoncias y encontraron una incidencia de ORN de 2,6% asociada a extracciones pre-RTP y un 1,8% asociada a extracciones post-RTP; por

otro lado, Owosho et al. encontró una incidencia de 4,3% en una muestra de 1023 pacientes durante un periodo de 10 años (377) e Igor-Figueiredo Pereira et al. analizó la prevalencia de ORN a 10 años en 413 pacientes y encontró sólo una prevalencia del 9,7% (378). Nuestros resultados son superiores a los encontrados en la literatura, donde se recoge una incidencia entorno al 5-10% (97,377); como ya comentamos en los resultados, este porcentaje alto de ORN, se debe a que sólo pudimos valorar la ORN en 37 pacientes.

En definitiva la extracción dental es el principal factor de riesgo para el desarrollo de ORN (84,370,371,379), por lo que, ya sea por extracciones previas o posteriores al tratamiento con RTP, estos pacientes deben protocolizarse y tener un cuidado dental óptimo durante y después de todo el tratamiento.

En cuanto a la localización, el 80% de nuestras necrosis se encontraron en la mandíbula, donde la vascularización es deficiente y la densidad ósea alta (90,380,381) y el 80% de ellas también fueron una vez terminado el tratamiento con RTP sabiendo que el tiempo medio desde finalización de la RTP para el desarrollo de ORN, como se informa en la literatura, varía de 22 a 47 meses (382,383).

No hemos encontrado una asociación significativa entre la incidencia de ORN en pacientes fumadores y que consuman alcohol, sin embargo la literatura recoge que la ORN es dos veces mayor en pacientes dentados aunque la mala higiene bucal y el uso continuado de alcohol y tabaco también pueden conducir a su rápida aparición (96,378).

Hemos encontrado una relación estadísticamente significativa, en estos pacientes que presentan ORN a los tres meses después de terminar la RTP

y sus niveles estimulados de tasa salival, siendo mayores los niveles estimulados de saliva en los pacientes que presenta necrosis que en los que no presentaban necrosis, por lo que entendemos que la propia lesión podría ejercer de estimulador salival.

Después de 2 años de seguimiento, tan sólo 32 (38,6%) de los pacientes acuden a seguimiento de los 83 iniciales, y seguidamente a los tres años, hemos podido evaluar sólo a 23 pacientes (27,7%). Las pérdidas vienen dadas por falta de colaboración por parte del paciente oncológico y también por una baja supervivencia del cáncer de cabeza y cuello. La tasa de supervivencia a los 5 años es del 80% en estadios iniciales, 40% en neoplasias con afectación regional, y menos del 20% para pacientes con metástasis a distancia (101).

En cuanto a la recurrencia de enfermedad, hemos visto que el 54,2% ha tenido una recidiva del tumor primario, datos que concuerdan con lo recogido en la bibliografía, ya que la recidiva en pacientes que han padecido un COCE es generalmente de un 75% durante el primer año, por ello las revisiones mensuales durante el primer año son esenciales para prevenir recurrencias. No es hasta el quinto año libre de cáncer cuando las revisiones pueden hacerse anualmente (56). En definitiva, la tasa de supervivencia a los 3 años fue de un 47%.

La media de supervivencia de los pacientes no disminuyó significativamente a medida que el estadio clínico de la lesión avanzaba aunque en la literatura está recogido que la presencia de metástasis ganglionares es uno de los factores pronósticos más importantes para el pronóstico del paciente, reduciendo la supervivencia hasta el 50% (41).

## 5.6 Detección de la metilación en el cáncer de cabeza y cuello

La metilación del ADN puede ser utilizada como biomarcador para el diagnóstico precoz del cáncer de cabeza y cuello, así como para la clasificación, el pronóstico y el tratamiento del cáncer (164-167,180).

Tanto las cantidades como las calidades de ADN obtenidas en nuestro trabajo han sido adecuadas, en la mayoría de los casos óptimas, para poder realizar el estudio de metilación de los diversos genes.

El método de extracción de ADN mediante el enjuague bucal, es una herramienta diagnóstica útil para el campo del cáncer de cabeza y cuello, así lo ratifican otros trabajos. Khare et al., tras realizar enjuagues salivales en sus muestras, obtuvieron un cantidad de ADN de  $48,4 \pm 8,2$  (g/ml) y en la sangre fue  $142,5 \pm 45,9$  miligramos/ml (mg / ml). La pureza del ADN obtenido según la evaluación de la relación de la densidad óptica 260/280, se encontró que era óptima en 45% (9 de 20) de las muestras salivales (384), así como otros autores como Rogers et al. quienes compararon 4 métodos de recolección de ADN y demostraron que el enjuague oral y la técnica de enjuague oral usando el kit Orange®, ofrecen mejor calidad y cantidad de ADN que la citología exfoliativa y el frotis (385). Asimismo Hansen et al. comparó 3 métodos de recolección de ADN y demostraron que el enjuague oral mantenido en Orange® ofrecen mejor calidad y cantidad de ADN que la citología exfoliativa, el frotis y la sangre (386).

En cuanto a la extracción de ADN, observamos que el enjuague bucal proporciona suficiente cantidad y calidad de material para su análisis molecular en los pacientes sanos y con tumores, si bien la calidad del ADN en los pacientes irradiados disminuye de una manera estadísticamente significativa con respecto a los niveles pre-RTP. Representa una alternativa

no invasiva a las pruebas de suero siendo una modalidad eficaz para el diagnóstico y la predicción del pronóstico de diversas enfermedades como el cáncer oral, así como para controlar el estado después del tratamiento del paciente.

La investigación ha demostrado que varios genes supresores de tumores pueden ser inactivados no sólo por mecanismos genéticos como deleciones o mutaciones puntuales, sino también por metilación o mecanismos epigenéticos similares (387). Por lo tanto, la presencia de metilación podría usarse como un factor de riesgo para la detección de este tipo de cáncer (245,388,389). En el presente estudio, evaluamos la utilidad de la detección de la metilación del promotor utilizando 5 genes (p16, MGMT, TIMP-3, DAPK1, CCND2), para detectar el cáncer de cabeza y cuello y comparar estas 78 muestras con una población normal como control.

De los 23 pacientes controles estudiados, hemos encontrado metilación del gen MGMT en 1 caso y metilación de DAPK1 en 7 casos sanos. Mientras que en 43 muestras de casos pre-RTP, hemos encontrando un tasas bajas de metilación pre-RTP en los genes como, MGMT (7%), CCND2 (9,2%), TIMP-3 (9,3%), DAPK1 (14%), p16 (37,2%) y post-RTP las tasas de metilación fueron sensiblemente diferentes a las iniciales, recalcando un aumento de la metilación especialmente en TIMP-3 (31,6%) y no hubo una disminución drástica de la metilación del p16 después de todo el tratamiento, obtenido una metilación del 25,8%; bien es cierto que encontramos niveles bajos de MGMT (2,9%), DAPK1 (6%) y CCND2 (6%). No hemos encontrado grandes diferencias significativas comprando la metilación antes y después del tratamiento con RTP, ni tampoco con los controles.

Solamente hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar el estado de metilación pre-RTP de los 43 pacientes con los 23 controles con el gen P16, presentando metilación 16 de ellos frente a 0 de los controles. No se han encontrado otras asociaciones respecto a la metilación pre y post y los Gy recibidos, localización del tumor, hábitos tóxicos (alcohol y tabaco).

En estudios recientes se han encontrado tasas de metilación anormal en saliva, aunque los porcentajes de metilación sean mayores que los encontrados en nuestro estudio, hay que fijarse en el número de casos estudiados que es significativamente menor, por tanto, en nuestro estudio se refleja mayores tasas de metilación en el momento del diagnóstico del tumor en el ADN salivar. En este trabajo de Rosas et al. (205) se encontró metilación de p16 en 11 casos de 14 (79%); en DAPK1, 6 casos de 10 (60%); y en MGMT, 4 casos de 7 (50%); asimismo en el trabajo publicado por Luca Morandi et al se estudian 11 casos de COCE y tan sólo se encuentra metilación de p16 en 1 sólo caso, con un porcentaje del 9% de metilación, inferior a lo encontrado en nuestro trabajo (390).

Por otro lado, existen otros estudios donde el número de casos es significativamente mayor a nuestro estudio, como en el trabajo de Sun et al. donde analizó 185 muestras salivales de pacientes con tumores de cabeza y cuello, encontrando tasas de metilación superiores a las nuestras en los genes como MGMT (22,1%), TIMP-3 (20,5%), DAPK1 (14%) e inferiores a las nuestras en p16 con una tasas de metilación de 7,6% antes de empezar dicho tratamiento (255). Asimismo en el trabajo de Nayak et al. (391) encontraron un porcentaje alto de metilación de DAPK1, 74,2% (92 de 124) y TIMP-3 de 71,8 (89 de 124), siendo superior a lo encontrado en nuestro trabajo antes de iniciar el tratamiento con RTP.

Quizás otra manera de analizar las tasas de metilación en este tipo de pacientes sería analizar el ADN tumoral, tras la resección quirúrgica, como realizan en los trabajos de Tamandani et al. (236) donde en 76 casos encuentran metilación del gen MGMT en un 73,7% de los tumores, porcentaje de metilación superior al encontrado en nuestro estudio, es así, que identifican la metilación de este gen como un factor pronóstico en los pacientes con cáncer oral. Algunos autores han informado hallazgos similares para los pacientes con cáncer de cabeza y cuello (208,210); concretamente en el estudio de Stefano Pierini et al. (218) encontró metilación del MGMT en el 60,8% de las muestras analizadas; sin embargo otros autores como Taioli et al. demostraron que la metilación del promotor MGMT tiene una asociación significativa con un mal pronóstico en pacientes con COCE (217). Asimismo en el análisis de 90 muestras de tumores de cabeza y cuello durante la extirpación de ese tumor se encontraron las siguientes tasas de metilación, TIMP-3 (46%), MGMT (29%), p16 (29%) y DAPK1 (27%) siempre superior a las encontradas en la ADN salival.

Zuo et al. (239) analiza 94 muestras de tumores de cabeza y cuello sin tratamiento previo de QTP y RTP donde encuentra una metilación de MGMT del 18,1%, (17 casos) muy superior a la encontrada en nuestro trabajo; por otro lado en un estudio en población indú se reveló una alta frecuencia de metilación de dicho promotor (41%) involucrando a 99 casos de cáncer oral (191).

Por su parte Taoli et al, (217) sigue encontrando niveles superiores a los de nuestro estudio en cuanto al gen MGMT, con un 29,6% de metilación en muestras de tumores (26/88), sin embargo encontraron niveles bajos de p16 metilado 12,1% (7/61) siendo esto inferior a lo encontrado en nuestra serie

de casos antes de someterse a tratamiento con RTP, al igual en el estudio de Lingbao et al. (208), donde de 100 casos de tumores de cabeza y cuello, encuentran metilación de p16 en 27 (27%) muestras. Existen múltiples estudios donde se analizan las muestras de tumores de cabeza y cuello, si seguimos revisando otros estudios encontramos el de Calmon et al, donde se analizaron 43 muestras, y se encontraron valores superiores a nuestro trabajo, p16, con una metilación de 63% (27/43) y DAPK1 con un 81,3% (35/43) (212).

Así mismo Joanna Katarzyna Strzelczyk, et al. encontró en muestras de tumores, concretamente en 75 muestras, porcentajes de metilación superiores a los encontrados en nuestras muestras salivales, concretamente para p16 (58,67%) ;MGMT (58,67%) y TIMP-3 (50,67%) y en márgenes tumorales los siguientes resultados para p16 (50,67%); MGMT (37,33%) y TIMP-3 (42,67%) (392).

Quizás todas estas diferencias en cuanto porcentajes de metilación previas al tratamiento podrían deberse a las diferencias entre las poblaciones estudiadas, no olvidemos que los hábitos poblacionales cambian geográficamente y ello puede influir, como ocurre en otros tipos tumorales, en los resultados de los estudios; así como los distintos factores etiológicos, sin olvidar el material del que se parte para la obtención del material nucleico, y las técnicas utilizadas.

El trabajo de Sánchez Céspedes et al. (203) encuentra metilación en muestras de tumores de cabeza y cuello, con porcentajes para p16 (27%), MGMT (33%) Y DAP-K (18%), de acuerdo a lo encontrado en nuestra serie, difiere un poco en los porcentajes de MGMT. En el trabajo de Wong et al se demostró que CDH1, CDKN2B / p15, CDKN2A / p16 y DAPK1 se

encontraron metilados en muestras de plasma de pacientes con carcinoma de la nasofaringe, e incluso después del tratamiento, la metilación todavía se podía detectar, lo que demuestra que este análisis podría ser utilizado como un marcador tumoral serológico para la detección temprana de recurrencia locorregional (247), asimismo lo describen Tan et al. propuso que la presencia de metilación de los promotores en márgenes quirúrgicos de cáncer de cabeza y cuello puede predecir recidivas locales realizando un panel de tres genes (CDKN2A / p16, CCNA1 y DCC) (393).

Estos resultados están de acuerdo con otro autores publicados (394) y el rango de metilación de p16 va desde 9% al 63% (205,212). La metilación de p16 debe de inactivarse en el COCE. Así mismo Rettori et al. encontró en muestras salivales un porcentaje de metilación de p16 del 11,6%, antes del tratamiento y después del tratamiento un 8,5% y 6 meses después del tratamiento con RTP un porcentaje muy elevado de metilación de p16 de un 47,6% por lo que nos indica que sigue metilado aun habiendo recibido dosis de radiación y por tanto es un gen útil para detectar la recurrencia del cáncer y se asocia con una supervivencia deficiente (200,256).

En muestras de tumores de Laringe, Pierini et al encontró una metilación elevada de p16, de 100 muestras el 47,4% presentaban metilación de p16 (218). Si vamos a otras poblaciones como la India, en un estudio reciente encontraron en resecciones de tumores una metilación de dicho gen en el 47,8%, de 34 muestras analizadas, 32 tenían afectación ganglionar y metilación del gen p16, por lo que su presencia en el tumor está asociado a un mal pronóstico (395).

El silenciamiento epigenético de p16 juega un papel importante en el desarrollo temprano del cáncer de cabeza y cuello y se correlaciona con un

peor pronóstico (265,266). En cuanto a p16 se puede utilizar como un biomarcador de baja supervivencia y metástasis (186,267).

Aunque los tejidos normales sanos no muestran signos de metilación de p16, los tejidos normales de pacientes fumadores que no presentan COCE a menudo demuestran la metilación de este gen (268), sugiriendo que la metilación de p16 puede ser un evento muy temprano en el desarrollo de COCE (268). Por otro lado, en pacientes con leucoplasia, condición precancerosa, tras realizar el enjuague oral, se observó metilación de p16 en el 44% de los pacientes y la metilación aumentó con el estadio de la enfermedad (207). Asimismo en un estudio reciente la metilación de p16 se asoció con COCE avanzado y ganglio linfático metastásico (396).

La metilación de MGMT es muy elevada en casos de displasia de la mucosa, con lo que se presenta en las fases tempranas de la carcinogénesis (238). Kordi-Tamandani et al. y Taioli et al. y Shaw et al. demostraron que la metilación MGMT podría considerarse un marcador de baja supervivencia del cáncer de cabeza y cuello (214,217,236). Ya Esteller et al. encontró en 1999 patrones de metilación aberrantes de este gen en un tercio de los tumores, similares a hallazgos recientes en un número limitado de cáncer de cabeza y cuello (397). Por otra parte, Zuo et al. afirma que la metilación de MGMT se correlaciona con el pronóstico deteriorado y aumento de recurrencias del tumor (239), asimismo Sun et al. lo correlaciona en su estudio de 185 muestras salivales previas al tratamiento, donde relaciona la presencia de metilación de MGMT con una supervivencia baja (255).

En nuestro estudio las muestras analizadas post-tratamiento tenían niveles bajos de metilación de MGMT, lo que se asocia a mal pronóstico,

ya que es un gen encargado de reparar el genoma cuando sufre daño por alquilación, ya que es capaz de eliminar los grupos alquilo que se encuentran en la posición O6 de la guanina (192,197). Su silenciamiento ocurre en etapas tempranas de la carcinogénesis (197) y está relacionado con un estado avanzado de la enfermedad, metástasis en los ganglios linfáticos, un mal pronóstico y baja supervivencia del paciente (197,238).

Existe una correlación positiva entre la metilación de DAPK1 y la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos (203,212), confirmando así el papel de esta proteína en la diseminación del tumor. Supic et al, en su estudio, detectó la metilación del promotor DAPK1 en los márgenes quirúrgicos de los pacientes con carcinoma oral y se asoció significativamente con la disminución de la supervivencia global, lo que demuestra la viabilidad de este marcador molecular para el pronóstico (235). Rettori et al. encontró en muestras salivales un porcentaje de metilación de DAPK1 del 8,2% antes del tratamiento con RTP y después del tratamiento un 4,9%; 6 meses después del tratamiento con RTP un porcentaje de 10,5 % por lo que nos indica que sigue metilado aun habiendo recibido dosis de radiación y por tanto es un gen útil para detectar la recurrencia de dicho cáncer y se asocia con una supervivencia deficiente (256), por otro lado Sánchez Cespedes et al encuentra metilación en muestras de tumores de cabeza y cuello del 18% para el gen DAPK1 (203).

Se ha demostrado que la metilación del promotor de TIMP-3 es una vía hacia la carcinogénesis en los tipos de tumores pancreáticos, gástricos, renales, cerebrales, colorrectales, pulmonares, de mama y otros (398-401).

En el cáncer de cabeza y cuello, la metilación del promotor TIMP-3 está elevada y está altamente correlacionada con la metilación DAPK1, lo que

implica una relación funcional entre estos dos genes (391). Existe una asociación significativa entre la metilación de TIMP-3 y una baja predisposición a la recidiva local. En un estudio de Rettori et al. se analizó el gen TIMP-3, concretamente en muestras de saliva de pacientes que habían tenido carcinoma de cabeza y cuello recogidas 6 meses después del último tratamiento curativo y se vió una menor recidiva local por tanto un aumento de la supervivencia. El análisis multivariado confirmó por primera vez, que TIMP-3 es un promotor de metilación en el enjuague salival posterior al tratamiento como un marcador de pronóstico de supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (256). Sun et al. (255) mostró la detección de metilación TIMP-3 en muestras de enjuagues salivales recogidas en pacientes diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello y lo relacionó con una supervivencia sin recidivas. Schutter et al. encontró que la metilación del promotor de TIMP-3 predice un mejor resultado en pacientes con cáncer de cabeza y cuello tratados solo con RTP (216). Por lo que estos hallazgos justifican el uso de detección de metilación en ADN salivar como una herramienta para identificar y monitorizar grupos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello con un alto riesgo de desarrollar recurrencia local (258).

Tras comparar con otros autores se confirma que la metilación de DAPK1 parece correlacionarse con la gravedad de la enfermedad y el potencial de metástasis (216,218,261).

No hemos podido comparar nuestros resultados de metilación de CCND2 con otros autores, los estudios de este gen en el cáncer de cabeza y cuello son bajos. Por otro lado, en nuestro trabajo hemos visto que en nuestros pacientes controles ninguno presentaban metilación de dicho gen, sin embargo en un estudio donde analizan 157 pacientes sanos, el 22%

presentaban metilación de dicho gen, siendo todos ellos pacientes no fumadores (402) asimismo afirman que la metilación de este gen puede indicar a los sujetos que tienen predisposición a desarrollar un cáncer aunque no tengan factores de riesgo como el tabaco. En el estudio de Rettori et al, encontraron metilación de dicho gen en 30% de los pacientes sanos (donde analizaban 20 pacientes) (256). La inactivación de CCND2 asociada con la metilación aberrante del promotor se encontró en diferentes tipos de cáncer, como la vejiga, la próstata y riñón (403-404).

De las 43 muestras estudiadas, tan sólo hemos podido hacer el seguimiento pre-post en 11 pacientes, de ahí, recalcar el bajo grado de colaboración de estos pacientes, ya que no siguen el seguimiento para prever complicaciones. De los 5 genes que hemos estudiado, no se encontraron cambios pre/post en MGMT ni en TIMP-3. Si que encontramos cambios en el gen p16 y CCND2, principalmente han pasado a una demetilación, es decir de metilado a no metilado.

Por otro lado el gen que más variabilidad ha tenido pre/post fue el DAPK1, algunos pacientes han sufrido una demetilación y otros una metilación y sin embargo otros han mantenido sus niveles iguales. No hemos podido comparar estos resultados con otros autores, ya que no hemos encontrado otros trabajos similares donde hagan esta comparativa, quizás para poder obtener resultados más concluyentes se deberían de aumentar la muestra pre/post pero resulta complicado por el bajo nivel de colaboración por parte de estos pacientes y su elevada mortalidad.

Decepcionantemente, la supervivencia no ha mejorado marcadamente en las últimas décadas porque los pacientes aún desarrollan con frecuencia

recurrencias locorregionales, metástasis a distancia y segundos tumores primarios (1). Por lo tanto, encontrar biomarcadores que puedan identificar a los pacientes con alto riesgo de desarrollar recidivas locorregionales es primordial (256).



# 6 CONCLUSIONES





1. Un 72,3% de nuestros pacientes requirieron al menos una exodoncia antes de iniciar el tratamiento con RTP.
2. Tras el tratamiento con RTP, al 51,4% de los pacientes ha requerido la realización de al menos una extracción dental.
3. La valoración dental antes de empezar el tratamiento es fundamental para disminuir el número de complicaciones a corto-largo plazo.
4. La mayor prevalencia de mucositis se sitúa entre la quinta y sexta semana de tratamiento.
5. La prevalencia de Radiodermatitis durante el tratamiento con RTP, fue de 80,86%.
6. Existe una relación estadísticamente significativa entre candidiasis y la disminución de la saliva durante la RTP.
7. Existe una relación estadísticamente significativa entre la disminución de los niveles salivales de TSG-I y TSG-II antes y después del tratamiento con RTP.
8. A los 3 meses de la RTP, los pacientes con ORN presentaban una tasa de salivación global estimulada inferior a los pacientes que no la presentaban.
9. El 40,5% de los pacientes estudiados han desarrollado una necrosis ósea tras tres años de seguimiento.
10. De los genes estudiados en el grupos de los casos todos sufren un proceso de hipometilación tras la RTP, excepto el TIMP-3, el cual sufre hipermetilación pasando del 9,3% pre-RTP al 31,6% post-RTP, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.
11. En el grupo de los controles, sólo se determinó metilación para MGMT( 4,3%) y DAPK1(30,4%).
12. Con el tamaño muestral disponible, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el estado de metilación pre y post-RTP en casos y controles, ni tampoco relación con los parámetros clínico-patológicos.



# 7 BIBLIOGRAFÍA





- (1) Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews cancer* 2011;11(1):9.
- (2) Moore S, Pierce A, Wilson D. 'Oral cancer'—the terminology dilemma. *Oral Dis* 2000;6(3):191-193.
- (3) Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 2005.
- (4) Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol* 2010;46(6):414-417.
- (5) Ceballos A, Bullón P, Gándara J, Chimenos E, Blanco A, Martínez-Sahuquillo A, et al. *Medicina bucal práctica*. Danú, SL 2000.
- (6) Chen Y, Huang H, Lin L, Lin C. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol* 1999;35(2):173-179.
- (7) Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International journal of cancer* 2004;108(5):741-749.
- (8) Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 1995;31(5):301-309.
- (9) Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48(11):3282-3287.
- (10) Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Odontogenic cysts and tumors. *Oral and maxillofacial pathology* 2002.p.678-740.

- (11) Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among US veterans. *Cancer* 1993;72(4):1369-1375.
- (12) Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine* 1993;22(10):459-462.
- (13) Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 1998;82(7):1367-1375.
- (14) Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *International journal of cancer* 1989;43(6):992-1000.
- (15) Harras A. *Cancer rates and risks*. Washington, DC: US Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institutes of Health 1996.
- (16) Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ* 2001;65(4):328-339.
- (17) Marandas P, Marandas N. Situation actuelle des cancers des voies aéro-digestives supérieures en France et données épidémiologiques. *Cancers des voies aéro-digestives supérieures—données actuelles*. Paris: Masson 2004. p.3-20.
- (18) Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis* 1972;25(12):711-716.
- (19) Mignogna M, Fedele S, Russo LL. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *European journal of cancer prevention* 2004;13(2):139-142.

- (20) Wray A, McGuirt WF. Smokeless tobacco usage associated with oral carcinoma: incidence, treatment, outcome. *Archives of Otolaryngology—Head & Neck Surgery* 1993;119(9):929-933.
- (21) Macfarlane G, Zheng T, Marshall J, Boffetta P, Niu S, Brasure J, et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 1995;31(3):181-187.
- (22) Maier H, Sennewald E, Heller GFW, Weidauer H. Chronic alcohol consumption—the key risk factor for pharyngeal cancer. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 1994;110(2):168-173.
- (23) Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer* 1986;57(2):391-395.
- (24) Sugerman P, Shillitoe E. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. *Oral Dis* 1997;3(3):130-147.
- (25) López López J, Roselló Llabrés X, Jané Salas E, Blanco Carrión A, Chimenos Küstner E. Carcinoma escamoso y virus del papiloma humano. Actualización. *Revista Europea de Odontostomatología*, 1999;11(1):33-44.
- (26) Bascones A, Seoane J, Aguado A, Quintanilla J. Cáncer y precáncer oral. Bases clínico-quirúrgicas y moleculares. Madrid: Ediciones Avances 2003.p.157-177.
- (27) Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016 ;25(1):16-27.
- (28) Ord RA, Blanchaert RH. Oral cancer: the dentist's role in diagnosis, management, rehabilitation, and prevention. : Quintessence Pub.; 2000.
- (29) Howlander N. SEER Cancer Statistics Review 1975-2004. <https://Howlander N.SEER Cancer Statistics Review 1975-2004>.

- (30) Llewellyn C, Johnson N, Warnakulasuriya K. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people—a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001;37(5):401-418.
- (31) Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4):309-316.
- (32) Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 2000;6(2):65-74.
- (33) Silverman S. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers: the outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001;(132):7-11.
- (34) Ries LAG, Hankey B, Miller B, Hartman A, Edwards B. Cancer Statistics Review, 1973-88. NIH Publication No. 91-2789, U. S. Department of Health and Human Services. Public Health Service 1991.
- (35) Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Annals of oncology* 2005;16(3):481-488.
- (36) Black R, Bray F, Ferlay J, Parkin D. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer* 1997;33(7):1075-1107.
- (37) García-Pola Vallejo M. Cáncer oral. Magnitud del problema en España. *RCOE* 2009;14(2):167-170.
- (38) Denoix P. Tumor, node and metastasis (TNM). *Bull Inst Nat Hyg* 1944;1(1):1-69.
- (39) Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA: a cancer journal for clinicians* 2005;55(4):242-258.
- (40) Fleming ID. AJCC cancer staging manual. American Joint Committee on Cancer 1997.

- (41) Montoro, José Raphael de Moura Campos, Hicz HA, Souza Ld, Livingstone D, Melo DH, Tiveron RC, et al. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2008;74(6):861-866.
- (42) Shugars DC, Patton LL. Detecting, diagnosing, and preventing oral cancer. *Nurse Pract* 1997;22(6):105-132.
- (43) Rapidis AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer 2009.
- (44) Scully C, Malamos D, Levers BG, Porter SR, Prime SS. Sources and patterns of referrals of oral cancer: role of general practitioners. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986;293(6547):599-601.
- (45) Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis* 2009;15(6):388-399.
- (46) Cuffari L, de Siqueira, José Tadeu Tesseroli, Nemr K, Rapaport A. Pain complaint as the first symptom of oral cancer: a descriptive study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006;102(1):56-61.
- (47) Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc* 1976;92(3):571-574.
- (48) Hirata RM, Jaques DA, Chambers RG, Tuttle JR, Mahoney WD. Carcinoma of the oral cavity. An analysis of 478 cases. *Ann Surg* 1975 ;182(2):98-103.
- (49) Spencer K, Ferguson J, Wiesenfeld D. Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Aust Dent J* 2002;47(4):284-289.

- (50) Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, et al. Oral cancer treatment. Current treatment options in oncology 2003;4(1):27.
- (51) Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, Gourin CG, Shah JP, Clayman GL, et al. Elective and therapeutic selective neck dissection. Oral Oncol 2006;42(1):13-24.
- (52) Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A. Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. Oral Oncol 2006;42(1):95-100.
- (53) Marcial VA, Pajak TF. Radiation therapy alone or in combination with surgery in head and neck cancer. Cancer 1985;55(9):2259-2265.
- (54) Caballero M, Grau JJ, Casellas S, Bernal-Sprekelsen M, Blanch JL. The role of chemotherapy in advanced oral cavity cancer. Acta Otorrinolaringologica (English Edition) 2009;60(4):260-267.
- (55) Caribé Gomes F, Chimenos Küstner E, López López J, Finestres Zubeldia F, Guix Melcior B. Manejo odontológico de las complicaciones de la radioterapia y quimioterapia en el cáncer oral. Medicina Oral, 2003;8(3),178-187.
- (56) Christy AW, Bojan A. Targeted therapy: A novel approach in head and neck cancer. Indian J Dent Res 2013;24(2):261-266.
- (57) Pignon J, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. The Lancet 2000;355(9208):949-955.
- (58) Laramore GE. Role of particle radiotherapy in the management of head and neck cancer. Curr Opin Oncol 2009;21(3):224-231.
- (59) Stewart F, Bartelink H, Steel G. Basic clinical radiobiology. Basic clinical radiobiology 2002.

- (60) Cox J. Toxicity criteria of the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) 92-04. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:134-136.
- (61) Raber-Durlacher JE, Elad S, Barasch A. Oral mucositis. *Oral Oncol* 2010;46(6):452-456.
- (62) Ray-Chaudhuri A, Shah K, Porter R. The oral management of patients who have received radiotherapy to the head and neck region. *Br Dent J* 2013;214(8):387-393.
- (63) Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;46(1):15-21.
- (64) Epstein JB, Schubert M. Oropharyngeal mucositis in cancer therapy. *Oncology* 2003;17(12):1767-1776.
- (65) Scully C, Sonis S, Diz P. Oral mucositis. *Oral Dis* 2006;12(3):229-241.
- (66) Seto BG, Kim M, Wolinsky L, Mito RS, Champlin R. Oral mucositis in patients undergoing bone marrow transplantation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1985;60(5):493-497.
- (67) Singh N, Scully C, Joyston-Bechal S. Oral complications of cancer therapies: prevention and management. *Clin Oncol* 1996;8(1):15-24.
- (68) Meurman JH, Grönroos L. Oral and dental health care of oral cancer patients: hyposalivation, caries and infections. *Oral Oncol* 2010;46(6):464-467.
- (69) Dirix P, Nuyts S, Vander Poorten V, Delaere P, Van den Bogaert W. The influence of xerostomia after radiotherapy on quality of life. *Supportive care in cancer* 2008;16(2):171-179.
- (70) Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S. Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;5(31):1141-1164.

- (71) Schweiger JW. Oral complications following radiation therapy: a five-year retrospective report. *J Prosthet Dent* 1987;58(1):78-82.
- (72) Mandel ID. The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *J Am Dent Assoc* 1989;119(2):298-304.
- (73) Chambers MS, Toth BB, Martin JW, Fleming TJ, Lemon JC. Oral and dental management of the cancer patient: prevention and treatment of complications. *Supportive Care in Cancer* 1995;3(3):168-175.
- (74) Mossman K. Gustatory tissue injury in man: radiation dose response relationships and mechanisms of taste loss. *Br J Cancer* 1986;53(7):9-11.
- (75) Spielman A. Chemosensory function and dysfunction. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1998;9(3):267-291.
- (76) Cowart B. Taste dysfunction: a practical guide for oral medicine. *Oral Dis* 2011;17(1):2-6.
- (77) Tomita Y, Osaki T. Gustatory impairment and salivary gland pathophysiology in relation to oral cancer treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1990;19(5):299-304.
- (78) Andrews N, Griffiths C. Dental complications of head and neck radiotherapy: Part 1. *Aust Dent J* 2001;46(2):88-94.
- (79) Conger AD. Loss and recovery of taste acuity in patients irradiated to the oral cavity. *Radiat Res* 1973;53(2):338-347.
- (80) Jham BC, Freire, Addah Regina da Silva. Oral complications of radiotherapy in the head and neck. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 2006;72(5):704-708.
- (81) Omolehinwa TT, Akintoye SO. Chemical and Radiation-Associated Jaw Lesions. *Dent Clin North Am* 2016;60(1):265-277.
- (82) Balogh JM, Sutherland SE. Osteoradionecrosis of the mandible: a review. *J Otolaryngol* 1989;18(5):245-250.

- (83) Marx RE. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1983;41(5):283-288.
- (84) Beumer J, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Preradiation dental extractions and the incidence of bone necrosis. *Head Neck Surg* 1983;5(6):514-521.
- (85) Epstein JB, Rea G, Wong FL, Spinelli J, Stevenson-Moore P. Osteonecrosis: study of the relationship of dental extractions in patients receiving radiotherapy. *Head Neck Surg* 1987;10(1):48-54.
- (86) McLeod NM, Bater MC, Brennan PA. Management of patients at risk of osteoradionecrosis: results of survey of dentists and oral & maxillofacial surgery units in the United Kingdom, and suggestions for best practice. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2010;48(4):301-304.
- (87) Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev* 2002;28(1):65-74.
- (88) Lee IJ, Koom WS, Lee CG, Kim YB, Yoo SW, Keum KC, et al. Risk Factors and Dose-Effect Relationship for Mandibular Osteoradionecrosis in Oral and Oropharyngeal Cancer Patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 2009;75(4):1084-1091
- (89) Raguse J, Hossamo J, Tinhofer I, Hoffmeister B, Budach V, Jamil B, et al. Patient and treatment-related risk factors for osteoradionecrosis of the jaw in patients with head and neck cancer. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2016;121(3):215-221.
- (90) Brown D, Evans A, Sandor G. Hyperbaric oxygen therapy in the management of osteoradionecrosis of the mandible. *Hyperbaric Oxygen Therapy in Otorhinolaryngology*: Karger Publishers; 1998.p.14-32.

- (91) Niewald M, Mang K, Barbie O, Fleckenstein J, Holtmann H, Spitzer WJ, et al. Dental status, dental treatment procedures and radiotherapy as risk factors for infected osteoradionecrosis (IORN) in patients with oral cancer—a comparison of two 10 years' observation periods. *Springerplus* 2014;3(1):263.
- (92) Goyal S, Mohanti BK. Bilateral mandibular fracture related to osteoradionecrosis. *Indian J Dent* 2015;6(2):107-109.
- (93) Starcke E, Shannon I. How critical is the interval between extractions and irradiation in patients with head and neck malignancy? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1977;43(3):333-337.
- (94) Murray CG, Herson J, Daly TE, Zimmerman S. Radiation necrosis of the mandible: a 10 year study. Part II. Dental factors; onset, duration and management of necrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1980;6(5):549-553.
- (95) Makkonen T, Kiminki A, Makkonen T, Nordman E. Dental extractions in relation to radiation therapy of 224 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1987;16(1):56-64.
- (96) Curi MM, Lauria L. Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 1997;55(6):540-544.
- (97) Niewald M, Fleckenstein J, Mang K, Holtmann H, Spitzer WJ, Rube C. Dental status, dental rehabilitation procedures, demographic and oncological data as potential risk factors for infected osteoradionecrosis of the lower jaw after radiotherapy for oral neoplasms: a retrospective evaluation. *Radiation oncology* 2013;8(1):227.
- (98) He Y, Liu Z, Tian Z, Dai T, Qiu W, Zhang Z. Retrospective analysis of osteoradionecrosis of the mandible: proposing a novel clinical classification and staging system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015;44(12):1547-1557.

- (99) Granström G. Radiotherapy, osseointegration and hyperbaric oxygen therapy. *Periodontol* 2000 2003;33(1):145-162.
- (100) Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. *The lancet oncology* 2006;7(4):326-335.
- (101) Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999;21(2):124-130.
- (102) Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *Journal of oral and maxillofacial surgery* 2007;65(2):229-236.
- (103) Jones AS, Morar P, Phillips DE, Field JK, Husband D, Helliwell TR. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 1995;75(6):1343-1353.
- (104) de Araujo RF, Jr, Barboza CA, Clebis NK, de Moura SA, Lopes Costa Ade L. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008;13(6):344-7.
- (105) Weinberg R, Lundberg A. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35(4):531-539.
- (106) García García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral: Revisión bibliográfica. *Av Odontoestomatol* 2005;21(6):287-295.
- (107) Choi S, Myers J. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res* 2008;87(1):14-32.
- (108) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

- (109) Fragoso LR, Baltasar EH, Esparza JAR. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnología aplicada* 2004;21(2):60-69.
- (110) Lomanto Díaz LD, Ortiz Cala ÓL, Bretón Pinto CO, Gómez Lizcano ÁI, Mesa Cornejo VM. El ciclo celular. *MedUNAB* 2010;6(16):21-29.
- (111) Baserga R. Growth in size and cell DNA replication. *Exp Cell Res* 1984;151(1):1-5.
- (112) Rao PN, Johnson RT. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 1970;225(5228):159-164.
- (113) Fotedar R, Fotedar A. Cell cycle control of DNA replication. *Progress in cell cycle research*: Springer; 1995. p. 73-89.
- (114) Barnum KJ, O'Connell MJ. Cell cycle regulation by checkpoints. *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols* 2014.p. 29-40.
- (115) Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science-AAAS-Weekly Paper Edition* 1994;266(5192):1821-1828.
- (116) Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246(4930):603-608.
- (117) Kousholt A, Menzel T, Sørensen C. Pathways for genome integrity in G2 phase of the cell cycle. *Biomolecules* 2012;2(4):579-607.
- (118) Lewin B, Genes V. Oxford Univ. Press. 2000.
- (119) Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. *Biología Molecular de la Célula* Ediciones Omega. SA, Barcelona 1996.
- (120) Cooper GM, Ganem D. The Cell: A Molecular Approach. *Nat Med* 1997;3(9):1042-1042.
- (121) Zink D, Mayr C, Janz C, Wiesmuller L. Association of P53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S-phase. *Oncogene* 2003;8;22(18):2856

- (122) Orlowski CC, Furlanetto RW. The mammalian cell cycle in normal and abnormal growth. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996;25(3):491-502.
- (123) Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematology/Oncology Clinics* 2001;15(5):931-956.
- (124) Ley MDI. Fundamentos de ciclo celular y conceptos básicos sobre de su regulación 2018. <https://Fundamentos de ciclo celular y conceptos básicos sobre de su regulación>
- (125) Soeda A, Inagaki A, Oka N, Ikegame Y, Aoki H, Yoshimura S, et al. Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J Biol Chem* 2008;283(16):10958-10966.
- (126) Peralta-Zaragoza O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez CE, Madrid-Marina V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México* 1997;39(5):451-462.
- (127) Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366(6456):704-707.
- (128) Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(39):14228-14233.
- (129) Pérez R, Carlos J. Las bases moleculares del cáncer. *Acta Universitaria* 2006;16(1).
- (130) Meza-Junco J, Montaña-Loza A, Aguayo-González A. Bases moleculares del cáncer. *Revista de investigación clínica* 2006;58(1):56-70.
- (131) Sousa, Fernando Augusto Cervantes Garcia de, Brandão AAH, Almeida JD, Rosa LEB. Alterações gênicas e câncer bucal: uma breve revisão. *Rev.bras.patol.oral* 2004;3(1):20-25.

- (132) Sidransky D. Molecular markers in cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1995;17:27-29.
- (133) Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(6):613-23.
- (134) López-Martínez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre J, Martínez de Pancorbo M. Aplicaciones clínicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. *Med Oral* 2002;7:108-120.
- (135) Lee WH. Tumor suppressor genes--the hope. *FASEB J* 1993;7(10):819.
- (136) Yokota J, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J* 1993;7(10):920-925.
- (137) Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics* 1993;9(4):138-141.
- (138) Vera-Sempere F, Navarro-Hervas M. Sobreexpresión del gen supensor p53 en el cáncer oral. *Med Oral* 1997;2:283-296.
- (139) Lukas J, Parry D, Aagaard L, Mann DJ, Bartkova J, Strauss M, et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* 1995;375(6531):503-506.
- (140) Moyzis RK. El telómero humano. *Investig Ciencia* 1997;181:211-216.
- (141) Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes to Cells* 2002;7(6):523-534.
- (142) Korkolopoulou P, Christodoulou P, Kapralos P, Exarchakos M, Bisbiroula A, Hadjiyannakis M, et al. The role of p53, MDM2 and c-erb B-2 oncoproteins, epidermal growth factor receptor and proliferation markers in the prognosis of urinary bladder cancer. *Pathology-Research and Practice* 1997;193(11-12):767-775.

- (143) Rebret T. Correlation between p53 overexpression and response to bacillus Calmette-Guerin therapy in a high risk select population of patients with T1G3 bladder cancer. *J Urol* 1998;159:788-791.
- (144) Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35(3):333-342.
- (145) Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Kaneda T, Sato S, Takekoshi T, et al. p27Kip1 accumulation by inhibition of proteasome function induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2000;6(3):916-923.
- (146) Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D 1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36(4):334-339.
- (147) Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999;187(1):112-126.
- (148) Schreiber M, Kolbus A, Piu F, Szabowski A, Mohle-Steinlein U, Tian J, et al. Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev* 1999;13(5):607-619.
- (149) Collavin L, Lazarevič D, Utrera R, Marzinotto S, Monte M, Schneider C. wt p53 dependent expression of a membrane-associated isoform of adenylate kinase. *Oncogene* 1999;18(43):5879.
- (150) Saiz A. Bases moleculares del cáncer oral. *Medicina Oral* 2001;6(5):342-349.
- (151) Kapoor M, Hamm R, Wen Y, Taya Y, Lozano G. Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. *Oncogene* 2000;19(3):358.
- (152) Di Leonardo A, Linke SP, Clarkin K, Wahl GM. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term

- induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev* 1994;8(21):2540-2551.
- (153) Sakai E, Rikimaru K, Ueda M, Matsumoto Y, Ishii N, Enomoto S, et al. The p53 tumor-suppressor gene and ras oncogene mutations in oral squamous-cell carcinoma. *International journal of cancer* 1992;52(6):867-872.
- (154) Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine* 1999;28(5):226-232.
- (155) Zariwala M, Schmid S, Pfaltz M, Ohgaki H, Kleihues P, Schäfer R. p53 gene mutations in oropharyngeal carcinomas: A comparison of solitary and multiple primary tumours and lymph-node metastases. *International journal of cancer* 1994;56(6):807-811.
- (156) Field J, Spandidos D, Malliri A, Gosney J, Yiagnisis M, Stell P. Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991;64(3):573-577.
- (157) Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332(11):712-717.
- (158) Regezi J, Dekker N, McMillan A, Ramirez-Amador V, Meneses-Garcia A, Rivera LR, et al. p53, p21, Rb, and MDM2 proteins in tongue carcinoma from patients 35 versus 75 years. *Oral Oncol* 1999;35(4):379-383.
- (159) Castle JT, Cardinali M, Kratochvil FJ, Abbondanzo SL, Kessler HP, Auclair PL, et al. P53 and cyclin D1 staining patterns of malignant and premalignant oral lesions in age-dependent

- populations. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1999;88(3):326-332.
- (160) Dijkema I, Struikmans H, Dullens H, Kal H, Van der Tweel I, Battermann J. Influence of p53 and bcl-2 on proliferative activity and treatment outcome in head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2000;36(1):54-60.
- (161) Obata A, Eura M, Sasaki J, Saya H, Chikamatsu K, Tada M, et al. Clinical significance of p53 functional loss in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *International journal of cancer* 2000;89(2):187-193.
- (162) Temam S, Flahault A, Périé S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of Clinical Oncology* 2000;18(2):385-385.
- (163) Warnakulasuriya S, Jia C, Johnson N, Houghton J. p53 and P-glycoprotein expression are significant prognostic markers in advanced head and neck cancer treated with chemo/radiotherapy. *J Pathol* 2000;191(1):33-38.
- (164) Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(2):392-394.
- (165) Tang W, Ho S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2007;8(2):173-182.
- (166) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002 ;1;16(1):6-21.
- (167) Vaissière T, Sawan C, Hecceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 2008;659(1):40-48.

- (168) Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010;28(10):1057-1068.
- (169) Esteller M. Epigenetic changes in cancer. *Biol Rep* 2011;3:9-9.
- (170) Rodríguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011:330-339.
- (171) Worm J, Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *Journal of oral pathology & medicine* 2002;31(8):443-449.
- (172) Lahtz C, Pfeifer GP. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *Journal of molecular cell biology* 2011;3(1):51-58.
- (173) Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H. CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 1992;13(4):1095-1107.
- (174) Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *The lancet oncology* 2006;7(1):77-82.
- (175) Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* 2008;9(6):465-476.
- (176) Ballestar E, Esteller M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochemistry and cell biology* 2005;83(3):374-384.
- (177) Ballestar E, Paz MF, Valle L, Wei S, Fraga MF, Espada J, et al. Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer. *EMBO J* 2003;22(23):6335-6345.
- (178) Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, Esteller M. A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res* 2006;66(17):8342-8346.

- (179) Jones PL, Veenstra GCJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19(2):187-191.
- (180) Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61(8):3225-3229.
- (181) Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice Oncology* 2005;2(1):4-11.
- (182) Chen J, Xu X. Diet, epigenetic, and cancer prevention. *Adv Genet* 2010;71:237-255.
- (183) Mathers JC, Strathdee G, Relton CL. Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. *Adv Genet* 2010;71:3-39.
- (184) Ross S. Evidence for the relationship between diet and cancer. *Exp Oncol* 2010;32(3):137-142.
- (185) Shaw R. The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006;35(2):101-108.
- (186) Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007;45(8):617-622.
- (187) Supic G, Kozomara R, Branković-Magić M, Jović N, Magić Z. Gene hypermethylation in tumor tissue of advanced oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009;45(12):1051-1057.
- (188) Supic G, Jovic N, Kozomara R, Zeljic K, Magic Z. Interaction between the MTHFR C677T polymorphism and alcohol--impact on oral cancer risk and multiple DNA methylation of tumor-related genes. *J Dent Res* 2011;90(1):65-70.
- (189) Arantes L, de Carvalho AC, Melendez ME, Centrone CC, Gois-Filho J, Toporcov T, et al. Validation of methylation markers for diagnosis of oral cavity cancer. *Eur J Cancer* 2015;51(5):632-641.

- (190) Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13(12):1501-1512.
- (191) Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. *International journal of cancer* 2003;105(1):41-46.
- (192) Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol* 2004;40(2):145-153.
- (193) Huang M, Yeh K, Shih H, Wang Y, Lin T, Chang J, et al. The correlation between CpG methylation and protein expression of P16 in oral squamous cell carcinomas. *Int J Mol Med* 2002;10(5):551-554.
- (194) Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2001;26;163(2):221-228.
- (195) Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002 ;8(10):3164-3171.
- (196) Maruya S, Issa JP, Weber RS, Rosenthal DI, Haviland JC, Lotan R, et al. Differential methylation status of tumor-associated genes in head and neck squamous carcinoma: incidence and potential implications. *Clin Cancer Res* 2004 ;10(11):3825-3830.
- (197) Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006;132(11):735-743.

- (198) Su P, Huang W, Wu H, Wu C, Liu T, Kao S. P16INK4A promoter hypermethylation is associated with invasiveness and prognosis of oral squamous cell carcinoma in an age-dependent manner. *Oral Oncol* 2010;46(10):734-739.
- (199) Ishida E, Nakamura M, Ikuta M, Shimada K, Matsuyoshi S, Kirita T, et al. Promotor hypermethylation of p14 ARF is a key alteration for progression of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41(6):614-622.
- (200) Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16INK4A and p14ARF genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(2):414-420.
- (201) Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, et al. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1(7):686-692.
- (202) El-Naggar AK, Lai S, Clayman G, Lee JK, Luna MA, Goepfert H, et al. Methylation, a major mechanism of p16/CDKN2 gene inactivation in head and neck squamous carcinoma. *Am J Pathol* 1997;151(6):1767-1774.
- (203) Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2000;60(4):892-895.
- (204) Hibi K, Taguchi M, Nakayama H, Takase T, Kasai Y, Ito K, et al. Molecular detection of p16 promoter methylation in the serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001 ;7(10):3135-3138.
- (205) Rosas SL, Koch W, da Costa Carvalho MG, Wu L, Califano J, Westra W, et al. Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated

- protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res* 2001;61(3):939-942.
- (206) Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002;21(27):4231-4236.
- (207) Lopez M, Aguirre J, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients—a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer* 2003;39(16):2306-2309.
- (208) Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Modern pathology* 2003;16(9):944.
- (209) Tran TN, Liu Y, Takagi M, Yamaguchi A, Fujii H. Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and p16INK4a and infrequent allelic loss other than 9p21 in betel-associated oral carcinoma in a Vietnamese non-smoking/non-drinking female population. *Journal of oral pathology & medicine* 2005;34(3):150-156.
- (210) Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Otolaryngol* 2005;26(1):12-17.
- (211) Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, et al. Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence. *Clin Cancer Res* 2007; 15;13(4):1179-1185.
- (212) Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, et al. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007;173(1):31-37.

- (213) Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. *Cancer* 2007;109(4):703-712.
- (214) Shaw RJ, Hall GL, Lowe D, Liloglou T, Field JK, Sloan P, et al. The role of pyrosequencing in head and neck cancer epigenetics: correlation of quantitative methylation data with gene expression. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery* 2008;134(3):251-256.
- (215) Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, et al. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2009;107(1):81-91.
- (216) De Schutter H, Geeraerts H, Verbeken E, Nuyts S. Promoter methylation of TIMP3 and CDH1 predicts better outcome in head and neck squamous cell carcinoma treated by radiotherapy only. *Oncol Rep* 2009;21(2):507-513.
- (217) Taioli E, Ragin C, Wang X, Chen J, Langevin SM, Brown AR, et al. Recurrence in oral and pharyngeal cancer is associated with quantitative MGMT promoter methylation. *BMC Cancer* 2009;9(1):354.
- (218) Pierini S, Jordanov SH, Mitkova AV, Chalakov IJ, Melnicharov MB, Kunev KV, et al. Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients. *Head Neck* 2014;36(8):1103-1108.
- (219) Daa T, Kashima K, Kondo Y, Yada N, Suzuki M, Yokoyama S. Aberrant methylation in promoter regions of cyclin-dependent kinase inhibitor genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *APMIS* 2008;116(1):21-26.

- (220) D'Souza W, Saranath D. Clinical implications of epigenetic regulation in oral cancer. *Oral Oncol* 2015;51(12):1061-1068.
- (221) Takeshima M, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, et al. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *Journal of oral pathology & medicine* 2008;37(8):475-479.
- (222) Yeh K, Chang J, Lin T, Wang Y, Tien N, Chang J, et al. Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol Rep* 2003;10(3):659-663.
- (223) Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;351(6326):453-456.
- (224) Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993;53(19):4477-4480.
- (225) Caamano J, Zhang SY, Rosvold EA, Bauer B, Klein-Szanto AJ. P53 Alterations in Human Squamous Cell Carcinomas and Carcinoma Cell Lines. *Am J Pathol* 1993;142(4):1131-1139.
- (226) Baral R, Patnaik S, Das BR. Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stages of betel-and tobacco-related oral squamous cell carcinomas from eastern India. *Eur J Oral Sci* 1998;106(5):907-913.
- (227) Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G, et al. P53 Expressions: Predicting Recurrence and Second Primary Tumors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 17;88(8):519-529.
- (228) Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, et al. Promoter methylation of P16, RAR $\beta$ , E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 2006;94(4):561-568.

- (229) Gao S, Eiberg H, Krogdahl A, Liu C, Sørensen JA. Cytoplasmic expression of E-cadherin and  $\beta$ -Catenin correlated with LOH and hypermethylation of the APC gene in oral squamous cell carcinomas. *Journal of oral pathology & medicine* 2005;34(2):116-119.
- (230) Uesugi H, Uzawa K, Kawasaki K, Shimada K, Moriya T, Tada A, et al. Status of reduced expression and hypermethylation of the APC tumor suppressor gene in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* 2005;15(4):597-602.
- (231) Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 1991;251(5000):1451-1455.
- (232) Thomas GJ, Speight PM. Cell adhesion molecules and oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12(6):479-498.
- (233) Chang HW, Chow V, Lam KY, Wei WI, Wing Yuen AP. Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance. *Cancer* 2002;94(2):386-392.
- (234) Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhae MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5455-5463.
- (235) Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2011;47(8):702-708.
- (236) Kordi-Tamandani DM, Moazeni-Roodi A, Rigi-Ladiz M, Hashemi M, Birjandian E, Torkamanzechi A. Promoter hypermethylation and expression profile of MGMT and CDH1 genes in oral cavity cancer. *Arch Oral Biol* 2010;55(10):809-814.
- (237) Roth MJ, Abnet CC, Hu N, Wang Q, Wei W, Green L, et al. p16, MGMT, RAR $\beta$ 2, CLDN3, CRBP and MT1G gene methylation in

- esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Oncol Rep* 2006;15(6):1591-1597.
- (238) Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, et al. MGMT expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with progression, nodal metastasis and poor prognosis. *Oral Oncol* 2007;43(5):515-522.
- (239) Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen JY, Hanna E, Brent TP, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(6):967-975.
- (240) Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, et al. Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* 2006;132(6):668-677.
- (241) Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS, et al. Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2664-2672.
- (242) Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2009;15(3):206-213.
- (243) Gonzalez-Ramirez I, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho M, Sánchez-Pérez Y, Anaya-Saavedra G, Granados-García M, et al. hMLH1 promoter methylation is an early event in oral cancer. *Oral Oncol* 2011;47(1):22-26.
- (244) Liu K, Huang H, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan C. Promoter hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2002;126(5):548-553.

- (245) Liu K, Zuo C, Luo QK, Suen JY, Hanna E, Fan C. Promoter hypermethylation and inactivation of hMLH1, a DNA mismatch repair gene, in head and neck squamous cell carcinoma. *Diagnostic Molecular Pathology* 2003;12(1):50-56.
- (246) Demokan S, Chuang A, Suoğlu Y, Uluşan M, Yalınız Z, Califano JA, et al. Promoter methylation and loss of p16INK4a gene expression in head and neck cancer. *Head Neck* 2012;34(10):1470-1475.
- (247) Wong TS, Kwong DL, Sham JS, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(7):2401-2406.
- (248) Radhakrishnan R, Kabekkodu S, Satyamoorthy K. DNA hypermethylation as an epigenetic mark for oral cancer diagnosis. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2011;40(9):665-676.
- (249) Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997;390(6656):180.
- (250) Li C, Wang L, Su J, Zhang R, Fu L, Zhou Y. mRNA expression and hypermethylation of tumor suppressor genes apoptosis protease activating factor-1 and death-associated protein kinase in oral squamous cell carcinoma. *Oncology letters* 2013;6(1):280-286.
- (251) Huang KH, Huang SF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL. Methylation of RASSF1A, RASSF2A, and HIN-1 is associated with poor outcome after radiotherapy, but not surgery, in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(12):4174-4180.
- (252) Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(5):1733-1742.

- (253) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol* 1997;74(2):111-122.
- (254) de Carvalho AC, Kowalski LP, Campos, Antônio Hugo José Fróes Marques, Soares FA, Carvalho AL, Vettore AL. Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2012;48(3):240-248.
- (255) Sun W, Zaboli D, Wang H, Liu Y, Arnaoutakis D, Khan T, et al. Detection of TIMP3 promoter hypermethylation in salivary rinse as an independent predictor of local recurrence-free survival in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(4):1082-1091.
- (256) Rettori MM, de Carvalho AC, Longo ALB, de Oliveira CZ, Kowalski LP, Carvalho AL, et al. Prognostic significance of TIMP3 hypermethylation in post-treatment salivary rinse from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Carcinogenesis* 2013;34(1):20-27.
- (257) Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000;60(21):5954-5958.
- (258) Arantes L, De Carvalho A, Melendez M, Carvalho A, Goloni-Bertollo E. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. *Oral Oncol* 2014;50(6):587-592.
- (259) Longo ALB, Rettori MM, Carvalho AC, Kowalski LP, Carvalho AL, Vettore AL. Evaluation of the methylation profile of exfoliated cell samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2014;36(5):631-637.
- (260) Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(1):97-107.

- (261) Poage GM, Christensen BC, Houseman EA, McClean MD, Wiencke JK, Posner MR, et al. Genetic and epigenetic somatic alterations in head and neck squamous cell carcinomas are globally coordinated but not locally targeted. *PloS one* 2010;5(3):9651.
- (262) Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2009;22(6):1519.
- (263) Tzao C, Hsu H, Sun G, Lai H, Wang Y, Tung H, et al. Promoter methylation of the hMLH1 gene and protein expression of human mutL homolog 1 and human mutS homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(5):1371.
- (264) González-Ramírez I, García-Cuellar C, Sánchez-Pérez Y, Granados-García M. DNA methylation in oral squamous cell carcinoma: molecular mechanisms and clinical implications. *Oral Dis* 2011;17(8):771-778.
- (265) Loughran O, Malliri A, Owens D, Gallimore PH, Stanley MA, Ozanne B, et al. Association of CDKN2A/p16INK4A with human head and neck keratinocyte replicative senescence: relationship of dysfunction to immortality and neoplasia. *Oncogene* 1996;13(3):561-568.
- (266) Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14(15):1799-1803.
- (267) Dong Y, Wang J, Dong F, Wang X, Zhang Y. The correlations between alteration of p16 gene and clinicopathological factors and prognosis in squamous cell carcinomas of the buccal mucosa. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012;41(6):463-469.
- (268) Ventorin von Zeidler S, Miracca E, Nagai M, Birman E. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med* 2004;14(5):807-811.

- (269) Hall GL, Shaw RJ, Field EA, Rogers SN, Sutton DN, Woolgar JA, et al. p16 Promoter methylation is a potential predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(8):2174-2179.
- (270) Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, et al. Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue. *Head Neck* 2009;31(11):1423-1430.
- (271) Silness J, Løe H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica* 1964;22(1):121-135.
- (272) López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Bermejo-Fenoll A. A simple test for salivary gland hypofunction using Oral Schirmer's test. *Journal of oral pathology & medicine* 2006;35(4):244-248.
- (273) Epstein J, Stevenson-Moore P. Periodontal disease and periodontal management in patients with cancer. *Oral Oncol* 2001;37(8):613-619.
- (274) Jansma J, Vissink A, Spijkervet FK, Roodenburg JL, Panders AK, Vermey A, et al. Protocol for the prevention and treatment of oral sequelae resulting from head and neck radiation therapy. *Cancer* 1992;70(8):2171-2180.
- (275) Sulaiman F, Huryn JM, Zlotolow IM. Dental extractions in the irradiated head and neck patient: a retrospective analysis of Memorial Sloan-Kettering Cancer Center protocols, criteria, and end results. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 2003;61(10):1123-1131.
- (276) Silvestre-Donat F, Plaza A, Serrano M. Revisión y tratamiento de las complicaciones derivadas de la radioterapia en pacientes con tumores de cabeza y cuello. *Medicina Oral* 1998;3(3):136-147.

- (277) Bruins HH, Koole R, Jolly DE. Pretherapy dental decisions in patients with head and neck cancer: a proposed model for dental decision support. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998;86(3):256-267.
- (278) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;1;89(5):1827-1831.
- (279) Wang RY, Gehrke CW, Ehrlich M. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res* 1980;8(20):4777-4790.
- (280) López M, Diniz M, Otero E, Peñamaría M, Blanco A. Factores de riesgo y prevención del cáncer oral. *Actitud del odontólogo. RCOE* 2013;18(2):73-83.
- (281) Wang W, Songlin P, Sun Y, Zhang B, Jinhui W. miR-21 inhibitor sensitizes human OSCC cells to cisplatin. *Mol Biol Rep* 2012;39(5):5481-5485.
- (282) Russo G, Haddad R, Posner M, Machtay M. Radiation treatment breaks and ulcerative mucositis in head and neck cancer. *Oncologist* 2008 ;13(8):886-898.
- (283) Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer* 2006;106(2):329-336.
- (284) Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, Eggeling Fv, Müller-Richter U, Kosmehl H, et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 2007;5(12):1095-1100.
- (285) Kosicki DM, Riva C, Pajarola GF, Burkhardt A, Gratz KW. OralCDx brush biopsy--a tool for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007;117(3):222-227.

- (286) Remmerbach TW, Hemprich A, Bocking A. Minimally invasive brush-biopsy: innovative method for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2007;117(9):926-940.
- (287) Robinson PN, Mickelson AR. Early diagnosis of oral cavity cancers. *Otolaryngol Clin North Am* 2006;39(2):295-306.
- (288) Devi S, Singh N. Dental care during and after radiotherapy in head and neck cancer. *Natl J Maxillofac Surg* 2014;5(2):117-125.
- (289) Scully C, Epstein JB. Oral health care for the cancer patient. *European Journal of Cancer. Part B: Oral Oncology* 1996;32(5):281-292.
- (290) da Silva, Ricardo Henrique Alves, de Oliveira RN. Forensic anthropology and molecular biology: independent or complementary sciences in forensic dentistry? An overview. *Brazilian Journal of Oral Sciences* 2008;7(25):1571-1574.
- (291) Ng DP, Koh D, Choo SG, Ng V, Fu Q. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clinica chimica acta* 2004;343(1):191-194.
- (292) Fabian T, Fejerdy P, Csermely P. Salivary genomics, transcriptomics and proteomics: the emerging concept of the oral ecosystem and their use in the early diagnosis of cancer and other diseases. *Curr Genomics* 2008;9(1):11-21.
- (293) Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am* 2011;55(1):159-178.
- (294) Matthews AM, Kaur H, Dodd M, D'Souza J, Liloglou T, Shaw RJ, et al. Saliva collection methods for DNA biomarker analysis in oral cancer patients. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2013;51(5):394-398.
- (295) Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation

- status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(18):9821-9826.
- (296) Escoda-Francolí J, Rodríguez-Rodríguez A, Pérez-García S, Gargallo-Albiol J, Gay-Escoda C. Dental implications in oral cancer patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(4):508-13.
- (297) Bonan PRF, Lopes MA, Pires FR, Almeida OPd. Dental management of low socioeconomic level patients before radiotherapy of the head and neck with special emphasis on the prevention of osteoradionecrosis. *Braz Dent J* 2006;17(4):336-342.
- (298) Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran A, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol* 2000;36(4):387-389.
- (299) Bagan JV, Scully C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol* 2008;44(2):103-108.
- (300) Cheng A, Cox D, Schmidt BL. Oral squamous cell carcinoma margin discrepancy after resection and pathologic processing. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2008;66(3):523-529.
- (301) Oliver A, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery* 1996;54(8):949-954.
- (302) Crissman JD, Gluckman J, Whiteley J, Quenelle D. Squamous-cell carcinoma of the floor of the mouth. *Head Neck* 1980;3(1):2-7.
- (303) Epstein J, Emerton S, Lunn R, Le N, Wong F. Pretreatment assessment and dental management of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35(1):33-39.
- (304) Bundgaard T, Bentzen S, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 1994;30(5):323-328.

- (305) Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontology* 2004;98(5):546-552.
- (306) Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol* 2007;43(9):894-897.
- (307) Feng G, Wang D, Chen H, Hu J, He J. A new method to induce multi-drug resistance to carboplatin in a mouse model of human tongue squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37(12):1141-1147.
- (308) Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco ML, Cabrini RL, Lanfranchi HE. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Age (in years)* 2008;40(3):9.
- (309) Jham BC, Reis PM, Miranda EL, Lopes RC, Carvalho AL, Scheper MA, et al. Oral health status of 207 head and neck cancer patients before, during and after radiotherapy. *Clin Oral Investig* 2008;12(1):19-24.
- (310) Schmidt M, Murphy MP. The importance of early diagnosis and treatment. *Case Manager* 1997;8(3):109-114.
- (311) Ribeiro ACP, Silva ARS, Simonato LE, Salzedas LMP, Sundefeld, Maria Lucia Marçal Mazza, Soubhia AMP. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009;47(2):95-98.
- (312) Kufra K, Forman M, Swisher-McClure S, Sollecito TP, Panchal N. Pre-Radiation dental considerations and management for head and neck cancer patients. *Oral Oncol* 2018 ;76:42-51.
- (313) Beech N, Robinson S, Porceddu S, Batstone M. Dental management of patients irradiated for head and neck cancer. *Aust Dent J* 2014;59(1):20-28.

- (314) Lockhart PB, Clark J. Pretherapy dental status of patients with malignant conditions of the head and neck. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 1994;77(3):236-241.
- (315) Martínez Gavidia E, Bueso Medio S, Bagán Sebastián JV. Valoración del estado bucodental del paciente con cáncer en la región cérvicofacial previo inicio de la radioterapia. *Avances en Odontoestomatología* 2000;16(3):153-159.
- (316) Velly A, Franco E, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BVd, et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol* 1998;34(4):284-291.
- (317) Zheng T, Boyle P, Hu H, Duan J, Jiang P, Ma D, et al. Dentition, oral hygiene, and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes and Control* 1990;1(3):235-241.
- (318) Maier H, Zöller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller W. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 1993;108(6):655-661.
- (319) Azizi A, Rezaei M. Prevalence of *Candida* species in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2009 Summer;3(3):78-81.
- (320) Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Silva EB, Akiti T, Nucci M, et al. Relationship between salivary flow rates and *Candida* counts in subjects with xerostomia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2002;93(2):149-154.
- (321) Navazesh M, Wood GJ, Brightman VJ. Relationship between salivary flow rates and *Candida albicans* counts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1995;80(3):284-288.
- (322) Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun R, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change,

- fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer medicine* 2017;6(12):2918-2931.
- (323) Larsson M, Hedelin B, Johansson I, Athlin E. Eating problems and weight loss for patients with head and neck cancer: a chart review from diagnosis until one year after treatment. *Cancer Nurs* 2005;28(6):425-435.
- (324) Nelson GM. Biology of taste buds and the clinical problem of taste loss. *Anat Rec* 1998;253(3):70-78.
- (325) Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, et al. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 2003;66(3):253-262.
- (326) Buglione M, Cavagnini R, Di Rosario F, Sottocornola L, Maddalo M, Vassalli L, et al. Oral toxicity management in head and neck cancer patients treated with chemotherapy and radiation: Dental pathologies and osteoradionecrosis (Part 1) literature review and consensus statement. *Crit Rev Oncol* 2016;97:131-142.
- (327) Cawley MM, Benson LM. Current trends in managing oral mucositis. *Clin J Oncol Nurs* 2005;9(5):584-592.
- (328) Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Management of oral mucositis in patients who have cancer. *Dent Clin North Am* 2008;52(1):61-77.
- (329) De Sanctis V, Bossi P, Sanguineti G, Trippa F, Ferrari D, Bacigalupo A, et al. Mucositis in head and neck cancer patients treated with radiotherapy and systemic therapies: Literature review and consensus statements. *Crit Rev Oncol* 2016;100:147-166.
- (330) Peterson D, Bensadoun R, Roila F, ESMO Guidelines Working Group. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of oncology* 2011;22(6):78-84.
- (331) Sonis ST. Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol* 2004;6(3):3-8.

- (332) Thomson P, Greenwood M, Meechan J. General medicine and surgery for dental practitioners. Part 6—cancer, radiotherapy and chemotherapy. *Br Dent J* 2010;209(2):65.
- (333) Jensen SB, Pedersen AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. Supportive care in cancer 2010;18(8):1039-1060.
- (334) Karbach J, Walter C, Al-Nawas B. Evaluation of saliva flow rates, Candida colonization and susceptibility of Candida strains after head and neck radiation. *Clin Oral Investig* 2012;16(4):1305-1312.
- (335) Blanco AI, Chao KS, El Naqa I, Franklin GE, Zakarian K, Vicic M, et al. Dose-volume modeling of salivary function in patients with head-and-neck cancer receiving radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62(4):1055-1069.
- (336) Rubin P, Casarett G. A direction for clinical radiation pathology. *Radiation Effects and Tolerance, Normal Tissue*: Karger Publishers; 1972. p. 1-16.
- (337) Mira JG, Wescott WB, Starcke EN, Shannon IL. Some factors influencing salivary function when treating with radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1981;7(4):535-541.
- (338) Mossman K, Shatzman A, Chencharick J. Long-term effects of radiotherapy on taste and salivary function in man. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1982;8(6):991-997.
- (339) Eneroth C, Henrikson C, Jakobsson PA. Pre-irradiation qualities of a parotid gland predicting the grade of functional disturbance by radiotherapy. *Acta Otolaryngol* 1972;74(1-6):436-444.
- (340) Moss WT, Brand WN. *Radiation oncology*. St Louis, CV Mosby Co, 1973.p.85-88.
- (341) Frank R, Herdly J, Philippe E. Acquired dental defects and salivary gland lesions after irradiation for carcinoma. *J Am Dent Assoc* 1965;70(4):868-883.

- (342) Tolentino EdS, Centurion BS, Ferreira LHC, Souza APd, Damante JH, Rubira-Bullen IRF. Oral adverse effects of head and neck radiotherapy: literature review and suggestion of a clinical oral care guideline for irradiated patients. *Journal of Applied Oral Science* 2011;19(5):448-454.
- (343) Burket LW, Greenberg MS, Glick M. *Burket's oral medicine: diagnosis & treatment.* : PMPH-USA; 2003.
- (344) Ellepola A, Samaranayake L. The postantifungal effect (PAFE) of antimycotics on oral *C. albicans* isolates and its impact on candidal adhesion. *Oral Dis* 1998;4(4):260-267.
- (345) Epstein JB, Chin EA, Jacobson JJ, Rishiraj B, Le N. The relationships among fluoride, cariogenic oral flora, and salivary flow rate during radiation therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998;86(3):286-292.
- (346) Silverman S,Jr, Luangjarmekorn L, Greenspan D. Occurrence of oral *Candida* in irradiated head and neck cancer patients. *J Oral Med* 1984 ;39(4):194-196.
- (347) Coronado-Castellote L, Jimenez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent* 2013;5(5):279-86.
- (348) Redding SW, Pfaller MA, Messer SA, Smith JA, Prows J, Bradley LL, et al. Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infection. *J Clin Microbiol* 1997;35(7):1761-1765.
- (349) Silverman S,Jr. Diagnosis and management of oral mucositis. *J Support Oncol* 2007 ;2 (1):13-21.
- (350) Kurnatowski P, Moqbil S, Kaczmarczyk D. Signs, symptoms and the prevalence of fungi detected from the oral cavity and pharynx of radiotherapy subjects with head and neck tumors, and their

- susceptibility to chemotherapeutics. *Annals of parasitology* 2014;60(3).
- (351) Dambroso D, Svidzinski TIE, Svidzinski AE, Dalalio M, Machado DO, Moliterno RA. Radiotherapy effect on frequency of *Candida* spp. and on virulence of *C. albicans* isolated from the oral cavity of head and neck cancer patients. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2009;30(2):153-159.
- (352) Jain M, Shah R, Chandolia B, Mathur A, Chauhan Y, Chawda J, et al. The Oral Carriage of *Candida* in Oral Cancer Patients of Indian Origin Undergoing Radiotherapy and/or Chemotherapy. *J Clin Diagn Res* 2016 ;10(2):17-20.
- (353) Hafner MF, Fetzner L, Hassel JC, Debus J, Potthoff K. Prophylaxis of acute radiation dermatitis with an innovative FDA-approved two-step skin care system in a patient with head and neck cancer undergoing a platin-based radiochemotherapy: a case report and review of the literature. *Dermatology* 2013;227(2):171-174.
- (354) Porock D. Factors influencing the severity of radiation skin and oral mucosal reactions: development of a conceptual framework. *European journal of cancer care* 2002;11(1):33-43.
- (355) Lee N, Chuang C, Quivey JM, Phillips TL, Akazawa P, Verhey LJ, et al. Skin toxicity due to intensity-modulated radiotherapy for head-and-neck carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53(3):630-637.
- (356) Trotti A. Toxicity in head and neck cancer: a review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47(1):1-12.
- (357) Harper JL, Franklin LE, Jenrette JM, Aguero EG. Skin toxicity during breast irradiation: pathophysiology and management. *South Med J* 2004;97(10):989-994.
- (358) Hancock PJ, Epstein JB, Sadler GR. Oral and dental management related to radiation therapy for head and neck cancer. *Journal-Canadian Dental Association* 2003;69(9):585-590.

- (359) Chambers MS, Keene HJ, Toth BB, Lemon JC, Gallagher SC, Martin CG, et al. Mutans streptococci in xerostomic cancer patients after pilocarpine therapy: A pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 2005;99(2):180-184.
- (360) Chambers MS, Garden AS, Kies MS, Martin JW. Radiation-induced Xerostomia in patients with head and neck cancer: Pathogenesis, impact on quality of life, and management. *Head Neck* 2004;26(9):796-807.
- (361) Million RR, Cassisi NJ. Management of head and neck cancer: a multidisciplinary approach. : Lippincott Williams & Wilkins; 1994.
- (362) Dreizen S. Oral complications of cancer therapies. Description and incidence of oral complications. *NCI Monogr* 1990;(9):11-15.
- (363) Pontes CdB, Polizello ACM, Spadaro ACC. Clinical and biochemical evaluation of the saliva of patients with xerostomia induced by radiotherapy. *Brazilian oral research* 2004;18(1):69-74.
- (364) Spolidorio DMP, Spolidorio LC, Barbeiro RH, HÖFLING JF, Bernardo WLC, Pavan S. Avaliação quantitativa de Streptococcus do grupo mutans e Candida sp e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. *Pesquisa Odontológica Brasileira* 2001;15(4):354-358.
- (365) Lopes MA, Coletta RD, Alves FdA, Abbade N, Rossi Junior A. Reconhecendo e controlando os efeitos colaterais da radioterapia. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1998;52(3):241-244.
- (366) Pérez Fernández CA. Efecto de la radioterapia en glándulas salivales accesorias. : Universitat de València; 2005.
- (367) Fajardo LF, Berthrong M. Radiation injury in surgical pathology Part III. Salivary glands, pancreas and skin. *Am J Surg Pathol* 1981;5(3):279-296.

- (368) Harwood TR, Staley CJ, Yokoo H. Histopathology of irradiated and obstructed submandibular salivary glands. *Arch Pathol* 1973;96(3):189-191.
- (369) Silvestre-Rangil J, Silvestre F. Clinico-therapeutic management of osteoradionecrosis: a literature review and update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(7):900-904.
- (370) Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(10):1088-93.
- (371) Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology* 1987;64(4):379-390.
- (372) Regezi JA, Courtney RM, Kerr DA. Dental management of patients irradiated for oral cancer. *Cancer* 1976;38(2):994-1000.
- (373) Widmark G, Sagne S, Heikel P. Osteoradionecrosis of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1989;18(5):302-306.
- (374) Kojima Y, Yanamoto S, Umeda M, Kawashita Y, Saito I, Hasegawa T, et al. Relationship between dental status and development of osteoradionecrosis of the jaw: a multicenter retrospective study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2017;124(2):139-145.
- (375) Chang DT, Sandow PR, Morris CG, Hollander R, Scarborough L, Amdur RJ, et al. Do pre-irradiation dental extractions reduce the risk of osteoradionecrosis of the mandible? *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 2007;29(6):528-536.
- (376) Tsai CJ, Hofstede TM, Sturgis EM, Garden AS, Lindberg ME, Wei Q, et al. Osteoradionecrosis and Radiation Dose to the Mandible in Patients With Oropharyngeal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013;2(85):415-420.

- (377) Owosho AA, Tsai CJ, Lee RS, Freymiller H, Kadempour A, Varthis S, et al. The prevalence and risk factors associated with osteoradionecrosis of the jaw in oral and oropharyngeal cancer patients treated with intensity-modulated radiation therapy (IMRT): The Memorial Sloan Kettering Cancer Center experience. *Oral Oncol* 2017;64:44-51.
- (378) Pereira IF, Firmino RT, Meira HC, Vasconcelos BC, Noronha VR, Santos VR. Osteoradionecrosis prevalence and associated factors: A ten years retrospective study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018;23(6):633-638.
- (379) Daly TE, Drane JB, MacComb WS. Management of problems of the teeth and jaw in patients undergoing irradiation. *Am J Surg* 1972 ;124(4):539-542.
- (380) Wanifuchi S, Akashi M, Ejima Y, Shinomiya H, Minamikawa T, Furudo S, et al. Cause and occurrence timing of osteoradionecrosis of the jaw: a retrospective study focusing on prophylactic tooth extraction. *Oral and maxillofacial surgery* 2016;20(4):337-342.
- (381) Nabil S, Samman N. Risk factors for osteoradionecrosis after head and neck radiation: a systematic review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology* 2012;113(1):54-69.
- (382) Oh HK, Chambers MS, Martin JW, Lim HJ, Park HJ. Osteoradionecrosis of the mandible: treatment outcomes and factors influencing the progress of osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2009 ;67(7):1378-1386.
- (383) Alam DS, Nuara M, Christian J. Analysis of outcomes of vascularized flap reconstruction in patients with advanced mandibular osteoradionecrosis. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery* 2009;141(2):196-201.
- (384) Khare P, Raj V, Chandra S, Agarwal S. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *J Forensic Dent Sci* 2014;6(2):81-85.

- (385) Rogers NL, Cole SA, Lan H, Crossa A, Demerath EW. New saliva DNA collection method compared to buccal cell collection techniques for epidemiological studies. *Am J Hum Biol* 2007;19(3):319-326.
- (386) Hansen TV, Simonsen MK, Nielsen FC, Hundrup YA. Collection of blood, saliva, and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16(10):2072-2076.
- (387) Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 2007;16(1):50-59.
- (388) Wang J, Qin Y, Li B, Sun Z, Yang B. Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1 in the tumor and serum of Chinese human primary hepatocellular carcinoma patients. *Clin Biochem* 2006;39(4):344-348.
- (389) Li J, El-Naggar A, Mao L. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* 2005;104(4):771-776.
- (390) Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Monti V, Del Corso G, et al. DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2015;43(8):1494-1500.
- (391) Nayak CS, Carvalho AL, Jeronimo C, Henrique R, Kim MM, Hoque MO, et al. Positive Correlation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 and Death-Associated Protein Kinase Hypermethylation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Laryngoscope* 2007;117(8):1376-1380.
- (392) Strzelczyk JK, Krakowczyk Ł, Owczarek AJ. Aberrant DNA methylation of the p16, APC, MGMT, TIMP3 and CDH1 gene

- promoters in tumours and the surgical margins of patients with oral cavity cancer. *Journal of Cancer* 2018;9(11):1896.
- (393) Tan H, Saulnier P, Auperin A, Lacroix L, Casiraghi O, Janot F, et al. Quantitative methylation analyses of resection margins predict local recurrences and disease-specific deaths in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Br J Cancer* 2008;99(2):357-363.
- (394) Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(16):3630-3633.
- (395) Kaur J, Demokan S, Tripathi SC, Macha MA, Begum S, Califano JA, et al. Promoter hypermethylation in Indian primary oral squamous cell carcinoma. *International journal of cancer* 2010;127(10):2367-2373.
- (396) Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García, A. p16INK4A/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough?. *Cancer letters* 2001;306(2):134-141.
- (397) Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, Herman JG. Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 1999;59(4):793-797.
- (398) Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavenee WK, et al. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999;59(4):798-802.
- (399) Brueckl WM, Grombach J, Wein A, Ruckert S, Porzner M, Dietmaier W, et al. Alterations in the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) are found frequently in human

- colorectal tumours displaying either microsatellite stability (MSS) or instability (MSI). *Cancer Lett* 2005;223(1):137-142.
- (400) Yokoyama T, Nakamura H, Otani Y, Kubota T, Fujimoto N, Seiki M, et al. Differences between scirrhous and non-scirrhous human gastric carcinomas from the aspect of proMMP-2 activation regulated by TIMP-3. *Clin Exp Metastasis* 2004;21(3):223.
- (401) Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 2001;61(1):249-255.
- (402) Brait M, Ford JG, Papaiahgari S, Garza MA, Lee JI, Loyo M, et al. Association between lifestyle factors and CpG island methylation in a cancer-free population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(11):2984-2991.
- (403) Brait M, Begum S, Carvalho AL, Dasgupta S, Vettore AL, Czerniak B, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes during pathogenesis of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 ;17(10):2786-2794.
- (404) Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, et al. A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8472-8478.



# 8 ANEXOS





## 8.1 Anexo I Aprobación del comité de ética



Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; oer@sergas.es



### DICTAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

#### CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 20/10/2014 o estudo:

**Título:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cáncer de cabeza y cuello  
**Promotor:** Mario Pérez-Sayáns García  
**Tipo de estudo:** Outros  
**Versión:**  
**Código do Promotor:** 699865781-06-14  
**Código de Rexistro:** 2014/304

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emito un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
Universidade de Santiago de Compostela	Mario Pérez-Sayáns García

En Santiago de Compostela, a 27 de outubro de 2014

O secretario

juan.manuel.vazquez.lago@sergas.es  
vazquez.lago@sergas.es  
vazquez.lago@sergas.es

Caratula do Informe de Consentimento Informado  
Número de identificación do SNG  
Número de identificación do SNG  
Número de identificación do SNG  
Número de identificación do SNG  
Número de identificación do SNG







## PRE-RADIOTERAPIA

✓ QUESTIONARIO CALIDAD DE VIDA OIHP-14

PREGUNTAS	Nunca (1)	Casi nunca (2)	Ocasional mente (3)	Bastante a menudo (4)	Muy a menudo (5)
1.- ¿Ha tenido problemas al pronunciar algunas palabras debido a problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
2.- ¿Ha notado que su sentido del gusto ha empeorado debido a problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
3.- ¿Ha tenido molestias o dolores en su boca?					
4.- ¿Ha encontrado molestias al comer algún tipo de alimento debido a problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
5.- ¿Es consciente del problema que tiene con sus dientes, boca?					
6.- ¿Se ha sentido tenso debido a problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
7.- ¿Ha sido su dieta inadecuada por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
8.- ¿Ha tenido que interrumpir las comidas por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
9.- ¿Ha encontrado difícil relajarse por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
10.- ¿Se ha encontrado en alguna situación embarazosa por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
11.- ¿Ha estado un poco irritable con otras personas por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
12.- ¿Ha encontrado dificultad para realizar su trabajo habitual por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
13.- ¿Ha notado que la vida en general es menos satisfactoria por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					
14.- ¿Ha sido totalmente incapaz de llevar su vida normal por problemas con sus dientes, boca o aparato de ortodoncia?					

## PRE-RADIOTERAPIA

### PLAN DE TRATAMIENTO

EXODONCIAS: \_\_\_\_\_ n° \_\_\_\_\_ Férula para flúor \_\_\_\_\_   
 Obturaciones / endodoncias: \_\_\_\_\_ n° O \_\_\_\_\_ / n° E \_\_\_\_\_ Fluorización tópica \_\_\_\_\_   
 Otros: \_\_\_\_\_ Tartrectomía \_\_\_\_\_

### VISITAS PRE-RTP



Se informa al paciente del plan de tratamiento antes de La radioterapia que consiste en un tratamiento conservador y de exodoncias dentales según los criterios de otros protocolos publicados en la literatura científica.

Firma Alumno

Firma Profesor

Firma Paciente

## DURANTE LA RADIOTERAPIA

### **SITUACIÓN ORAL Y ESTADO DEL PACIENTE**

ESTADO DEL PACIENTE 1ª	ESTADO DEL PACIENTE 2ª	ESTADO DEL PACIENTE 3ª
ESTADO DEL PACIENTE 4ª	ESTADO DEL PACIENTE 5ª	ESTADO DEL PACIENTE 6ª
ESTADO DEL PACIENTE 7ª	ESTADO DEL PACIENTE 8ª	

## DURANTE LA RADIOTERAPIA

### FOTOS

#### TEST GLOBAL DE SALIVA (mm)

- VALORACIÓN SEMANAL

Semana nº	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
FECHA:								
TSG I								
TSG II								

### FROTIS Y CULTIVOS

**FROTIS:** POSITIVO  / NEGATIVO

- DURANTE RADIOTERAPIA. Semana n°: \_\_\_\_\_ (A la mitad)

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:		FECHA: ____ / ____ / ____	FORMA CLÍNICA: _____
48 H					
72 H					

**FROTIS:** POSITIVO  / NEGATIVO

- DURANTE RADIOTERAPIA. Semana n°: \_\_\_\_\_ (Al final)

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:		FECHA: ____ / ____ / ____	FORMA CLÍNICA: _____
48 H					
72 H					

### MUCOSITIS

Semana nº	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
FECHA:								
GRADO:								

(0: nada / Grado 1: eritema /

Grado 3: eritema, edema, úlceras, dieta sólo líquidos /

Grado 2: eritema, úlceras, dieta con sólidos /

Grado 4: requiere soporte enteral o parenteral.)

### RADIODERMITIS

Semana nº	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª
FECHA:								
TIPO:								

(Grado 0: ninguna / Grado 1: eritema / Grado 2: descamación seca / Grado 3: descamación húmeda.)

### ATM

A la mitad del TTO RTP

Al final del TTO RTP

- Trismus: Distancia interincisal

- \_\_\_\_\_ mm.

- Trismus: Distancia interincisal

- \_\_\_\_\_ mm.

## POST-RADIOTERAPIA

FOTOCOPIA DEL INFORME POST-RADIOTERAPIA: SI  NO

**FOTOS**

### ESTADO DEL PACIENTE

<b>1 MES</b>	<b>3 MESES</b>	<b>6 MESES</b>
<b>9 MESES</b>	<b>12 MESES</b>	<b>ORN</b> Si <input type="checkbox"/> / No <input type="checkbox"/> Fecha: _____

### TEST GLOBAL DE SALIVA

	1 ME S	3 MES ES	6 MES ES	9 MES ES	12 ME SES
TSG I					
TGS II					
FECHA					

### MUCOSITIS/ RADIODERMITIS

Mes	1°	3°	6°	9°	12°
FECHA:					
GRADO (MUCO.)					
GRADO (DERM.)					

#### FROTIS Y CULTIVO 1er mes

Fecha: \_\_\_\_\_ FROTIS POSITIVO  / NEGATIVO

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:
48 H		
72 H		

FORMA CLÍNICA: \_\_\_\_\_

#### FROTIS Y CULTIVO 3er mes

Fecha: \_\_\_\_\_ FROTIS POSITIVO  / NEGATIVO

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:
48 H		
72 H		

FORMA CLÍNICA: \_\_\_\_\_

#### FROTIS Y CULTIVO 6° mes

Fecha: \_\_\_\_\_ FROTIS POSITIVO  / NEGATIVO

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:
48 H		
72 H		

FORMA CLÍNICA: \_\_\_\_\_

#### FROTIS Y CULTIVO 12°mes

Fecha: \_\_\_\_\_ FROTIS POSITIVO  / NEGATIVO

24 H		AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN:
48 H		
72 H		

FORMA CLÍNICA: \_\_\_\_\_

## POST-RADIOTERAPIA

### TRISMUS

(la media de tres medidas)

	1 MES	3 MESES	6 MESES	9 MESES	12 MESES
MDI	mm	mm	mm	mm	mm
FECHA					

### SITUACIÓN ORAL DEL PACIENTE DESPUÉS DE LA RADIOTERAPIA

**- CPTIN: código**

- 0: SANO.
- 1: SANGRADO.
- 2: TÁRTARO.
- 3: BOLSA (3-6mm).
- 4: BOLSA (>6mm).
- X: SEXTANTE EXCLUIDO.

**Higiene:**

- buena
- normal
- deficiente
- pésima

- |                   |
|-------------------|
| C: caries         |
| E: endodoncia     |
| P: periodontal    |
| X: ausente        |
| I: incluido       |
| PF: protesis fija |
| O : obturado      |

**1<sup>o</sup>mes**

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**3<sup>o</sup>mes**

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**6<sup>o</sup>mes**

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**12<sup>o</sup>mes**

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**-CPTIN**

6-4	3-3	4-6

6-4	3-3	4-6

6-4	3-3	4-6

6-4	3-3	4-6

6-4	3-3	4-6

1 MES

3 MESES

6 MESES

9 MESES

12 MESES

Pre-RTP

3meses

6meses

1año

2años

#### Cuestionarios de Calidad de Vida Post-RTP

(marcar el recuadro de cada mes)

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

**VISITAS DESPUÉS DE UN AÑO**



### **8.3 Anexo III Consentimiento informado de la parte retrospectiva en castellano**

#### **HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello. Fase retrospectiva

**INVESTIGADOR** Mario Pérez-Sayáns García

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Facultad de Odontología de la USC.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

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 llevar 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 tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

#### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El propósito de este estudio es describir los efectos de la radioterapia de cabeza y cuello. Evaluar al paciente con cáncer de cabeza y cuello antes, durante y después de la radioterapia.

### **¿Por qué me ofrecen participar a mí?**

Ud. es invitado a participar porque padece un carcinoma de cabeza y cuello.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Se le realizará una historia clínica completa donde se recogerán los siguientes datos : edad, sexo, uso de la CTP, estadio TNM, sesiones RTP, cirugía previa, sesiones de quimioterapia, tipo histológico del tumor, localización, recurrencia de la enfermedad y supervivencia y se le harán las siguientes pruebas : prueba completa de la saliva inicial (TSG-I) y en reposo (TSG-II), presencia de candida, nivel de higiene, hábitos tóxicos (tabaco y alcohol), exodoncias (ubicación, número y razón), necesidad de un tratamiento conservador, profiláctico o quirúrgico, cultivo a los 6 meses, TSG I y II semanales, mucositis semanal, radiodermatitis semanal, ORN tras RTP, especie de candida.

Su participación tendrá una duración total estimada de 20 minutos cada vez que acuda a la Unidad Docente de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Es una visita que forma parte del protocolo de manejo de los pacientes que van a recibir radioterapia. Será una vez a la semana durante el tiempo que dure el tratamiento con radioterapia. Una vez terminada la radioterapia el paciente acudirá al mes de terminar el tratamiento, a los tres meses, a los 6 meses, a los 9 meses y al año de terminar el tratamiento.

### **¿Qué molestias o inconvenientes tiene?**

Los efectos secundarios que pueden presentarse son derivados del tratamiento con radioterapia.

### **¿Obtendré algún beneficio por participar?**

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio.

### **¿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 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.

### **¿Se publicarán 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.

### **¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?**

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede 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, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo: Codificados, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es Mario Pérez-Sayáns García, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es Facultad de Odontología. Máster de Medicina Oral. Cirugía Oral e Implología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán Anonimizadas, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.

### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Esta investigación es promovida por el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Impantología de la Faculta de Odontología de la USC con fondos aportados por Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Impantología de la Faculta de Odontología de la USC

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

Ud. no será retribuido por participar.

### **¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?**

Ud. puede contactar con Mario Pérez-Sayáns García en el teléfono. nº teléfono 981563100 Ext. 12357 o correo electrónico perezsayans@gmail.com

Muchas gracias por su colaboración

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude 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.

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la participante,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

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

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo \_\_\_\_\_, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó \_\_\_\_\_ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener 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.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/a testigo

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_, representante legal de  
\_\_\_\_\_ :

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con \_\_\_\_\_ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la representante legal,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## **8.4 Anexo IV Consentimiento informado de la parte retrospectiva en galego**

### **FOLLA DE INFORMACIÓN AO PARTICIPANTE ADULTO/A**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo. Fase retrospectiva

**INVESTIGADOR** Mario Pérez-Sayáns García

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía. Facultade de Odontoloxía da USC

Este documento ten por obxecto facilitarlle información sobre un estudo de investigación no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo.

Se decide participar neste, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre este. Se así o desexa, pode levar o documento, consultalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vostede pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen ter que dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á súa relación co médico nin á asistencia sanitaria á que vostede ten dereito.

#### **¿Cal é o propósito do estudo?**

O propósito deste estudo é describir os efectos da radioterapia de cabeza e colo. Evaluar o paciente con cancro de cabeza e colo antes, durante e despóis da radioterapia.

### **¿Por que me ofrecen participar a min?**

Vostede é convidado a participar porque padece un carcinoma de cabeza e colo.

### **¿En que consiste a miña participación?**

Realizaráselle unha historia clínica completa onde se recollerán os seguintes datos : idade, sexo, uso da CTP, estadiaxe TNM, sesións RTP, ciruxía previa, sesións de quimioterapia, tipo histolóxico do tumor, localización, recurrencia da enfermidade e supervivencia e se farán as seguintes probas : proba completa da saliva inicial (TSG-I) e en reposo (TSG-II), presenza de cándida, nivel da hixiene, hábitos tóxicos (tabaco e alcohol), exodoncias (ubicación, número e razón), necesidade d un tratamento conservador, profiláctico o quirúrxico, cultivo aos 6 meses, TSG I y II semanais, mucositis semanal, radiodermatitis semanal, ORN tras RTP, especie de cándida.

A súa participación terá unha duración total estimada de 20 minutos cada vez que acuda á Unidade Docente de Medicina Oral, Ciruxía Oral e Implantoloxía. É unha visita que forma parte do protocolo de manexo dos pacientes que recibirán radioterapia. Será unha vez á seman durante ó tiempo que dure o tratamento con radioterapia. Unha vez terminada a radioterapia o paciente acudirá ao mes de terminar o tratamento, aos tres meses, aos 6 meses, aos 9 meses e ó ano de terminar o tratamento.

### **¿Que molestias ou inconvenientes ten?**

Os efectos secundarios que pode presentar son os derivados do tratamento con radioterapia.

### **¿Obtere algún beneficio por participar?**

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo.

### **¿Recibirei a información que se obteña do estudo?**

Se vostede deséxao, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden

non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispoñer deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

### **¿Publicaranse os resultados deste estudo?**

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

### **¿Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?**

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal. En todo momento, vostede poderá acceder aos seus datos, corrixilos ou cancelalos, solicitándoo ante o investigador.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Pódese transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados ata finalizar o estudo de modo: Codificados, que quere dicir que posúen un código co que o equipo investigador poderá coñecer a quen pertencen.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Mario Pérez-Sayáns García, e o lugar de realización das análises previstas neste estudo é Facultade de Odontoloxía. Máster de Medicina Oral. Cirurxía Oral e Implantoloxía e Departamento de Anatomía Patolóxica do Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán Anonimizadas, é dicir, que rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doadora da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

### **¿Existen intereses económicos neste estudo?**

Esta investigación é promovida polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Implantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC con fondos

achegados polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC

O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vostede non será retribuído por participar.

¿Como contactar co equipo investigador deste estudo?

Vostede pode contactar con Mario Pérez-Sayáns García no teléfono 981563100 Extensión12357 ou correo electrónico [perezsayans@gmail.com](mailto:perezsayans@gmail.com)

Moitas grazas pola súa colaboración



## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita  
o consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (para os casos nos que o participante non poida leer/escribir)**

O testigo imparcial identificaráse y será unha persoa axena ao equipo investigador

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu \_\_\_\_\_, como testigo imparcial, afirmo que en miña presenza:

- Léuselle \_\_\_\_\_ a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se lle entregou, e poido facer todas as preguntas sobre o estudo.
- Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto a la conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudo

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_ Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_, representante legal de \_\_\_\_\_ :

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercute nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Nome e apelidos: \_\_\_\_\_

Data:

Data:

## **8.5 Anexo V Consentimiento informado de los casos en castellano**

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

**INVESTIGADOR** Mario Pérez-Sayáns García

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Facultad de Odontología de la USC.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

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 llevar 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 tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

#### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El propósito de este estudio es describir los efectos de la radioterapia de cabeza y cuello y estudiar los diversos genes que causan el cáncer de

cabeza y cuello, antes y después de la radioterapia. Pretendemos demostrar la alteración en los genes para establecer tratamientos antitumorales.

### **¿Por qué me ofrecen participar a mí?**

Ud. es invitado a participar porque padece un carcinoma de cabeza y cuello.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Se le realizará un enjuague con solución antiséptica sin alcohol (10 ml) para confirmar el estado de algunos genes. El enjuague se realizará una hora después del último cepillado, durante un periodo de 5 minutos antes de empezar con el tratamiento de radioterapia y un mes después de finalizar dicho tratamiento repetiremos el enjuague.

Su participación tendrá una duración total estimada de 10 minutos, es una visita que forma parte del protocolo de manejo de los pacientes con cáncer de cabeza y cuello que van a recibir radioterapia. El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir a su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

### **¿Qué molestias o inconvenientes tiene?**

Los efectos secundarios que puede presentar son los derivados del enjuague. Puede presentar molestias durante el enjuague, picor e incapacidad de enjuagarse durante 5 minutos.

### **¿Obtendré algún beneficio por participar?**

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la metilación en el cáncer de cabeza y cuello. 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 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.

### **¿Se publicarán 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.

### **¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?**

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede 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, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo: Codificados, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es Mario Pérez-Sayáns García, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es Facultad de Odontología. Máster de Medicina Oral. Cirugía Oral e Implantología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán Anonimizadas, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.

### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Esta investigación es promovida por el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la USC con fondos aportados por Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la USC

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio. Ud. no será retribuido por participar.

### **¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?**

Ud. puede contactar con Mario Pérez-Sayáns García en el teléfono. nº teléfono 981563100 Ext. 12357 o correo electrónico [perezsayans@gmail.com](mailto:perezsayans@gmail.com)

Muchas gracias por su colaboración

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude 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.

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.

Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la participante,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

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

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo \_\_\_\_\_ como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener 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.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.

Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/a testigo

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_, representante legal de \_:

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con\_y hacer todas las preguntas sobre el estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio

Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la representante legal,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:



## 8.6 Anexo VI Consentimiento informado de los casos en galego

### FOLLA DE INFORMACIÓN AO PARTICIPANTE ADULTO/A

**TÍTULO DO ESTUDO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

**INVESTIGADOR** *Mario Pérez-Sayáns García*

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía. Facultade de Odontoloxía da USC

Este documento ten por obxecto facilitarlle información sobre un estudo de investigación no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo.

Se decide participar neste, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre este. Se así o desexa, pode levar o documento, consultalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vostede pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen ter que dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á súa relación co médico nin á asistencia sanitaria á que vostede ten dereito.

#### ¿Cal é o propósito do estudo?

O propósito deste estudo é describir os efectos da radioterapia de cabeza e colo e estudar os diversos xenes que causan o cancro de cabeza e colo,

antes e despois da radioterapia. Pretendemos demostrar a alteración nos xenes para establecer tratamentos antitumorais.

### **¿Por que me ofrecen participar a min?**

Vostede é convidado a participar porque padece un carcinoma de cabeza e colo.

### **¿En que consiste a miña participación?**

Realizaráselle unha enxaugadura con solución de clorhexidina ao 0.12% sen alcohol (10 ml) para confirmar o patrón de metilación de determinados xenes diana. A enxaugadura realizarase unha hora despois do último cepillado, durante un período de 5 minutos antes de empezar co tratamento de radioterapia e un mes despois de finalizar o devandito tratamento repetiremos a enxaugadura.

A súa participación terá unha duración total estimada de 10 minutos, é unha visita que forma parte do protocolo de manexo dos pacientes con cancro de cabeza e colo que recibir que van a recibir radioterapia. O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada

### **¿Que molestias ou inconvenientes ten?**

Os efectos secundarios que pode presentar son os derivados da enxaugadura. Pode presentar molestias durante a enxaugadura, picor e incapacidade de enxaugarse durante 5 minutos.

### **¿Obtere algún beneficio por participar?**

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre a metilación no cancro de cabeza e colo. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

### **¿Recibirei a información que se obteña do estudo?**

Se vostede deséxao, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispoñer deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

### **¿Publicaranse os resultados deste estudo?**

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

### **¿Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?**

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal. En todo momento, vostede poderá acceder aos seus datos, corrixilos ou cancelalos, solicitándoo ante o investigador.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Pódese transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados ata finalizar o estudo de modo: Codificados, que quere dicir que posúen un código co que o equipo investigador poderá coñecer a quen pertencen.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Mario Pérez-Sayáns García, e o lugar de realización das análises previstas neste estudo é Facultade de Odontoloxía. Máster de Medicina Oral. Cirurxía Oral e Implatology e Departamento de Anatomía Patolóxica do Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán Anonimizadas, é dicir, que rompeu todo vínculo que poida

identificar a persoa doadora da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

### **¿Existen intereses económicos neste estudo?**

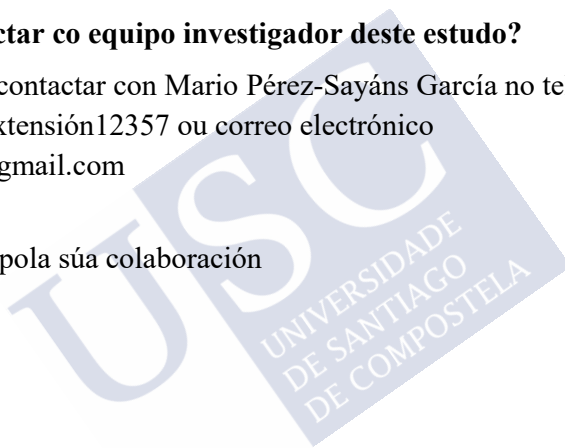
Esta investigación é promovida polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC con fondos achegados polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC

O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo. Vostede non será retribuído por participar.

### **¿Como contactar co equipo investigador deste estudo?**

Vostede pode contactar con Mario Pérez-Sayáns García no teléfono 981563100 Extensión12357 ou correo electrónico [perezsayans@gmail.com](mailto:perezsayans@gmail.com)

Moitas grazas pola súa colaboración



## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podó retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercute nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (para os casos nos que o participante non poida leer/escribir)**

O testigo imparcial identificaráse y será unha persoa axena ao equipo investigador

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu \_\_\_\_\_, como testigo imparcial, afirmo que en miña presenza:

- Léuselle \_\_\_\_\_ a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se lle entregou, e poido facer todas as preguntas sobre o estudo.
- Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

*Respecto a la conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudo*

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_, representante legal de \_\_\_\_\_):

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:



## **8.7 Anexo VII Consentimiento informado de los controles en castellano**

### **HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A**

**TÍTULO DEL ESTUDIO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados en cáncer de cabeza y cuello.

**INVESTIGADOR** *Mario Pérez-Sayáns García*

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Facultad de Odontología de la USC.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

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 llevar 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 tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

#### **¿Cuál es el propósito del estudio?**

El propósito de este estudio es describir los efectos de la radioterapia de cabeza y cuello y estudiar los diversos genes que causan el cáncer de

cabeza y cuello, antes y después de la radioterapia. Pretendemos demostrar la alteración en los genes para establecer tratamientos antitumorales.

### **¿Por qué me ofrecen participar a mí?**

Ud. es invitado a participar porque es un grupo control ya que no padece un carcinoma de cabeza y cuello.

### **¿En qué consiste mi participación?**

Se le realizará un enjuague con solución de clorhexidina al 0.12 % sin alcohol (10 ml) para confirmar el patrón de metilación de determinados genes diana. El enjuague se realizará una hora después del último cepillado, durante un periodo de 5 minutos.

Su participación tendrá una duración total estimada de 5 minutos. El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir a su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

### **¿Qué molestias o inconvenientes tiene?**

Los efectos secundarios que puede presentar son los derivados del enjuague. Puede presentar molestias durante el enjuague, picor e incapacidad de enjuagarse durante 5 minutos.

### **¿Obtendré algún beneficio por participar?**

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la metilación en el cáncer de cabeza y cuello. 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 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.

### **¿Se publicarán 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.

### **¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?**

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede 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, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo: Codificados, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es *Mario Pérez-Sayáns García*, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es *Facultad de Odontología. Máster de Medicina Oral. Cirugía Oral e Implología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela*.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán *Anonimizadas, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda*

*identificar a la persona donante de la muestra, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.*

### **¿Existen intereses económicos en este estudio?**

Esta investigación es promovida por el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la USC con fondos aportados por Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología de la Facultad de Odontología de la USC

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

Ud. no será retribuido por participar.

### **¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?**

Ud. puede contactar con Mario Pérez-Sayáns García en el teléfono. nº teléfono 981563100 Ext. 12357 o correo electrónico [perezsayans@gmail.com](mailto:perezsayans@gmail.com)

**Muchas gracias por su colaboración**

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Patrón de metilación en pacientes irradiado en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude 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.

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la participante,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

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

*El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador*

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiado en cáncer de cabeza y cuello.

Yo \_\_\_\_\_, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó \_\_\_\_\_ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener 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.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la testigo

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiado en cáncer de cabeza y cuello.

Yo, \_\_\_\_\_, representante legal de  
\_\_\_\_\_):

- Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con \_\_\_\_\_ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la representante legal,

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

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:



## 8.8 Anexo VIII Consentimiento informado de los controles en galego

### FOLLA DE INFORMACIÓN AO PARTICIPANTE ADULTO/A

**TÍTULO DO ESTUDO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

**INVESTIGADOR** *Mario Pérez-Sayáns García*

**CENTRO:** Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía. Facultade de Odontoloxía da USC

Este documento ten por obxecto facilitarlle información sobre un estudo de investigación no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo.

Se decide participar neste, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre este. Se así o desexa, pode levar o documento, consultalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vostede pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen ter que dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á súa relación co médico nin á asistencia sanitaria á que vostede ten dereito.

#### ¿Cal é o propósito do estudo?

O propósito deste estudo é describir os efectos da radioterapia de cabeza e colo e estudar os diversos xenes que causan o cancro de cabeza e colo,

antes e despois da radioterapia. Pretendemos demostrar a alteración nos xenes para establecer tratamentos antitumorais.

### **¿Por que me ofrecen participar a min?**

Vostede é convidado a participar porque é un grupo control xa que non padece un carcinoma de cabeza e colo.

### **¿En que consiste a miña participación?**

Realizaráselle unha enxaugadura con solución de clorhexidina ao 0.12% sen alcohol (10 ml) para confirmar o patrón de metilación de determinados xenes diana. A enxaugadura realizarase unha hora despois do último cepillado, durante un período de 5 minutos.

A súa participación terá unha duración total estimada de 5 minutos. O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada

### **¿Que molestias ou inconvenientes ten?**

Os efectos secundarios que pode presentar son os derivados da enxaugadura. Pode presentar molestias durante a enxaugadura, picor e incapacidade de enxaugarse durante 5 minutos.

### **¿Obterei algún beneficio por participar?**

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir aspectos descoñecidos ou pouco claros sobre a metilación no cancro de cabeza e colo. Esta información poderá ser de utilidade nun futuro para outras persoas.

### **¿Recibirei a información que se obteña do estudo?**

Se vostede deséxao, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo.

Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispoñer deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

### **¿Publicaranse os resultados deste estudo?**

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

### **¿Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?**

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal. En todo momento, vostede poderá acceder aos seus datos, corrixilos ou cancelalos, solicitándoo ante o investigador.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Pódese transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados ata finalizar o estudo de modo: Codificados, que quere dicir que posúen un código co que o equipo investigador poderá coñecer a quen pertencen.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Mario Pérez-Sayáns García, e o lugar de realización das análises previstas neste estudo é Facultade de Odontoloxía. Máster de Medicina Oral. Cirurxía Oral e Implátología e Departamento de Anatomía Patolóxica do Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán Anonimizadas, é dicir, que rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doadora da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

### **¿Existen intereses económicos neste estudo?**

Esta investigación é promovida polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC con fondos achegados polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC

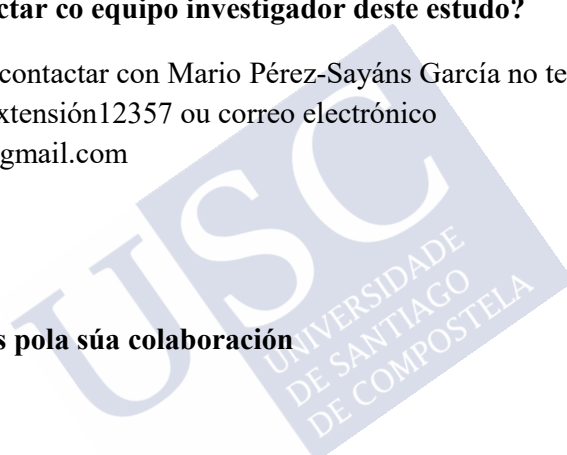
O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.

Vostede non será retribuído por participar.

### **¿Como contactar co equipo investigador deste estudo?**

Vostede pode contactar con Mario Pérez-Sayáns García no teléfono 981563100 Extensión12357 ou correo electrónico [perezsayans@gmail.com](mailto:perezsayans@gmail.com)

**Moitas grazas pola súa colaboración**



## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podó retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercute nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (para os casos nos que o participante non poida leer/escribir)**

O testigo imparcial identificaráse y será unha persoa axena ao equipo investigador

**TÍTULO:** Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu \_\_\_\_\_, como testigo imparcial, afirmo que en miña presenza:

- Léuselle \_\_\_\_\_ a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se lle entregou, e poido facer todas as preguntas sobre o estudo.
- Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

*Respecto a la conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudo*

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha:

Fecha:

## DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

*TÍTULO:* Patrón de metilación en pacientes irradiados con cancro de cabeza e colo.

Eu, \_\_\_\_\_, representante legal de \_\_\_\_\_):

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: \_\_\_\_\_ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podó retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercute nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante,

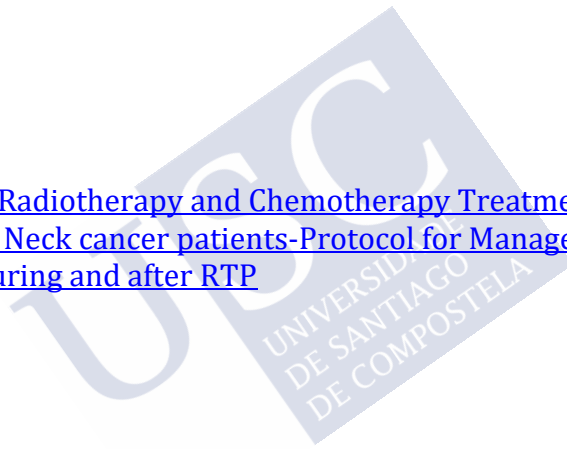
Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_ Nombre y apellidos: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

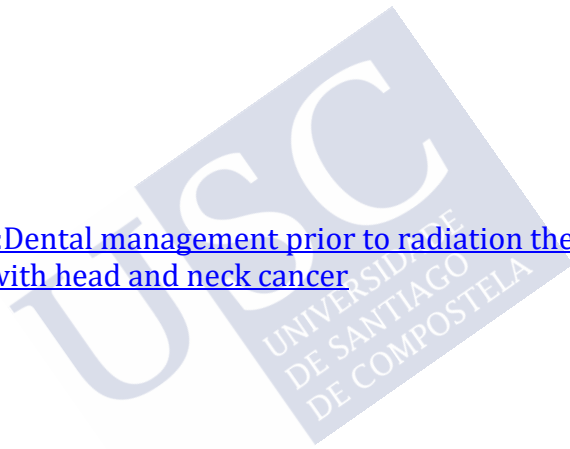


[Capitulo: Radiotherapy and Chemotherapy Treatments in Head and Neck cancer patients-Protocol for Management Before, during and after RTP](#)



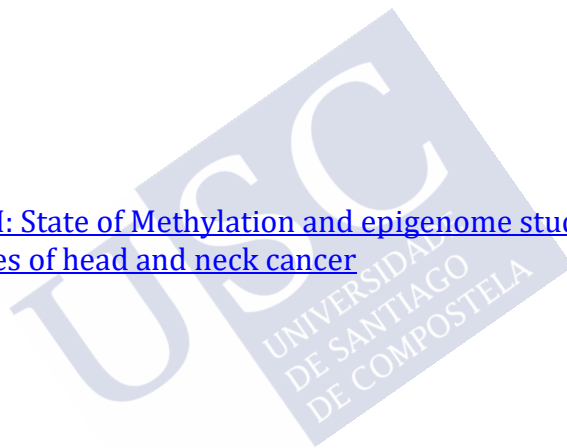


[Artículo I: Dental management prior to radiation therapy in patients with head and neck cancer](#)





[Artículo II: State of Methylation and epigenome studies in some types of head and neck cancer](#)





## 8.12 Anexo XII. Permisos para reproducir imágenes

### OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 10, 2018

This Agreement between calle perez cepeda 10 ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4485570544595
License date	Dec 10, 2018
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Journal of Molecular Cell Biology
Licensed Content Title	Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer
Licensed Content Author	Lahtz, Christoph; Pfeifer, Gerd P.
Licensed Content Date	Feb 1, 2011
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello
Publisher of your work	master de medicina oral, cirugía e implantología
Expected publication date	Dec 2018
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
<b>Total</b>	<b>0.00 EUR</b>
Title	Evaluación clínica y molecular de los efectos de la radioterapia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello
Institution name	master de medicina oral, cirugía e implantología
Expected presentation date	Dec 2018
Order reference number	Figure 1
Portions	Figure 1
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	calle perez cepeda 10 calle perez cepeda 10  a coruña, a coruña 15004 Spain Attn: calle perez cepeda 10
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	calle perez cepeda 10 calle perez cepeda 10

a coruña, Spain 15004  
Attn: calle perez cepeda 10

Total

**0.00 EUR**

[Terms and Conditions](#)

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
  2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
  3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
  4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
  5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.
  6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from [www.oxfordjournals.org](http://www.oxfordjournals.org) Should there be a problem clearing these rights, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)
  7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.
  8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
  9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.
  10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
  11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
  12. Other Terms and Conditions:
- v1.4

Questions? [customer@copyright.com](mailto:customer@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Estimada Paula Boñar Álvarez,  
Reciba usted un cordial saludo,

Como revista MedUNAB, podemos otorgar el permiso para utilizar las ilustraciones del artículo que fue publicado en nuestra revista en el año 2003 de la edición 6(16) para su tesis doctoral, teniendo como condición que usted pueda comprometerse por escrito que indicará de manera adecuada el origen de la ilustración a utilizar del artículo: **Lomanto Díaz, L., Ortiz Cala, Óscar, Bretón Pinto, C., Gómez Lizcano, Álvaro, & Mesa Cornejo, V. (1). El ciclo celular. *MedUNAB*, 6(16), 21-29. <https://doi.org/10.29375/01237047.266>**

En el trabajo escrito de su tesis, deberá hacer la aclaración que la imagen es autorizada para su uso por la Revista MedUNAB y poner la cita del artículo en el que se publicó. Puede utilizar la cita que le enviamos en el presente correo subrayada en amarillo.

A continuación el link que la llevará al artículo y encontrará información de los autores y sobre como citar que puede serle de utilidad: <https://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/article/view/266>

Quedamos atentos a su respuesta.

Muchas gracias,

Comité Editorial Revista MedUNAB  
\*\*\*\*\*

Universidad Autónoma de Bucaramanga UNAB  
Facultad de Ciencias de la Salud UNAB  
**Revista MedUNAB**  
(7) 6571800 Ext. 549 - 529  
[medunab@unab.edu.co](mailto:medunab@unab.edu.co)

**MedUNAB**  
<https://revistas.unab.edu.co/index.php/medunab/index>  
Calle 157 No. 19-55 Cañaveral Parque  
Campus El Bosque, Floridablanca-Santander  
Código postal: 680003

### 8.13 Anexo XIII. Material suplementario

En las siguientes tablas se especifica de cada muestra la concentración y la pureza con los valores de absorbancia 260/280 y 260/230 tanto para los casos como para los controles.

Características de las muestras del grupo de casos Pre-RTP (NaN).

Caso	Ng/microl	260/280	260/230
1	148,72	1,86	0,91
2	946,76	1,28	1,39
4	474,24	1,88	6,72
5	214,11	2,06	2,37
6	83,46	2,00	1,50
7	96,97	1,72	1,50
8	287,25	1,97	1,29
12	349,87	1,84	1,83
13	756,6	1,86	0,98
18	931,42	2,02	1,61
19	878,24	2,00	1,53
34	351,72	1,79	1,07
41	825,27	2,72	1,11
42	413,42	2,29	1,00
43	719,46	1,82	1,60
44	713,19	1,73	0,79
45	920,24	1,84	0,82
46	699,88	2,05	0,98
49	107,62	2,08	0,31
51	334,39	1,84	0,76
52	345,94	1,92	0,69
54	108,53	1,81	0,44
55	303,22	1,91	0,51
59	545,36	1,78	1,16
62	241,72	2,10	0,97
63	925,58	1,91	1,22
64	924,32	1,92	1,24
70	617,22	1,59	1,64
71	760,68	2,92	1,10
72	995	2,80	1,19
73	897	1,81	0,95
74	974	1,72	0,54
75	887,96	1,88	1,08
76	244,98	1,67	0,47
78	153,24	1,54	0,30
79	844,67	1,74	0,55
80	169,33	1,89	0,39
81	957,16	2,26	1,07
83	800,17	2,13	0,83
84	714,94	1,91	0,89
85	879,28	2,09	0,99
87	942,78	1,89	0,90

## Características de las muestras del grupo de casos Post-RTP (NaN)

Caso	Ng/micoroL	260/280	260/230
10	147,81	1,79	0,98
15	135,67	1,74	0,82
16	498,95	2,15	1,30
17	929,9	2,00	1,50
20	451,76	1,45	1,21
21	273,23	1,58	0,94
22	299,86	1,70	0,90
23	539,24	1,53	1,12
24	750	1,89	1,49
25	167,95	2,23	1,05
26	280	1,83	1,73
28	920,2	1,72	1,54
29	420,97	1,47	1,06
30	519,19	1,69	1,21
31	236,57	1,82	1,35
33	434,56	1,76	1,16
35	323,9	1,79	1,02
37	416,05	1,73	1,27
39	336,37	2,60	1,35
40	818,36	2,35	1,10
47	860,53	1,95	2,00
48	566,2	1,79	1,27
50	453,8	1,91	0,87
53	454,07	2,17	0,82
56	956,45	2,15	1,02
57	975,77	1,68	0,84
58	159,61	1,46	1,49
60	438,97	2,22	1,01
61	920,72	2,10	1,19
65	960,2	1,34	1,35
67	135,24	1,59	0,44
68	935,17	1,65	0,90
77	278,6	1,74	0,57
82	437,1	2,21	1,29
86	766,28	2,53	1,53

## Características de las muestras del grupo control (NaN)

Control	Ng/micoroL	260/280	260/230
1	195	1,80	0,76
3	163,78	1,84	0,78
4	269,82	1,77	1,09
5	647,61	1,93	1,07
6	106,72	1,67	0,56
7	925,6	1,75	1,93
9	792	1,78	1,00
11	381,27	1,64	1,31
13	287,72	1,70	0,82
14	349,66	1,97	0,88
15	94	1,51	0,74
17	91	1,82	1,53
18	533,92	1,92	1,69
20	546,48	1,71	1,10
21	287,23	1,49	1,28
22	884,89	1,80	1,11
25	460,85	1,83	1,79
26	486,65	2,00	1,52
27	976,02	1,96	1,51
28	302,66	1,94	1,52
29	347,55	1,88	1,10
34	170,25	1,81	0,98
35	100,86	1,77	0,53